

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Günter U. Höglinger, FEAN



**Zellkulturelle Untersuchungen zur Rolle meningealer  
Fibroblasten bei der Pathogenerkennung und  
Immunaktivierung im Leptomeningealraum**

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

vorgelegt von  
Linda Marie  
Ercegovac  
aus  
Dachau

Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ködel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Patrick N. Harter

PD Dr. Stefan Kastenbauer

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Dr. Susanne Dyckhoff-Shen

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract (English) .....</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1 Epidemiologie und Prognose der bakteriellen Meningitis.....	11
1.2 Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis .....	12
1.2.1 Bakterielle Invasion des Leptomeningealraums.....	12
1.2.2 Der Virulenzfaktor Pneumolysin .....	13
1.2.3 Pathogenerkennung .....	14
1.2.4 Aktivierung des NFκB-Signalwegs.....	16
1.2.5 Expression proinflammatorischer Mediatoren.....	17
1.2.6 Leukozyteneinwanderung und Gewebeschädigung .....	19
1.3 Mögliche zelluläre Sensoren einer Pneumokokken-Infektion im leptomeningealen Raum.....	21
1.3.1 Anatomie und Immunologie des leptomeningealen Raums.....	21
1.3.2 Residente Immunzellen .....	23
1.3.3 Meningeale Fibroblasten .....	23
1.3.3.1 Kurzer Überblick über die ZNS-Fibroblastenpopulation .....	23
1.3.3.2 Bisherige Erkenntnisse über die Rolle von Fibroblasten bei der bakteriellen Meningitis .....	25
<b>2. Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1 Material .....	27
3.1.1 Zellen.....	27
3.1.2 Zellkulturmedien, Reagenzien und Chemikalien .....	27
3.1.3 Bakterienstämme.....	28
3.1.4 Inhibitoren.....	28
3.1.5 Proteinchemie .....	29
3.1.6 Molekularbiologie .....	29
3.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.8 Apparaturen und Geräte.....	30
3.1.9 Bioinformatik.....	31
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Zellkulturversuche.....	31
3.2.1.1 Humane Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1.....	31
3.2.1.2 Primäre humane meningeale Zellen .....	32
3.2.1.3 Monozyten-Zelllinie THP-1.....	33
3.2.1.4 Stimulationsversuche mit Pneumokokken.....	34
3.2.1.4.1 Zellaussaat und Stimulationsmedien .....	34
3.2.1.4.2 Kokultursystem mit THP-1-Zellen .....	36

3.2.1.4.3 Stimulationdurchführung.....	37
3.2.1.4.4 Serotypen .....	37
3.2.1.4.5 Hämolysin-Test .....	37
3.2.1.4.6 Inhibitoren.....	38
3.2.1.5 Photometrische Verfahren zur Bestimmung von Zellvitalität und Zelltod.....	39
3.2.1.5.1 WST-1 Zellproliferationsassay.....	39
3.2.1.5.2 LDH als Zelltodmarker .....	39
3.2.1.6 Detektion der Expressionslevel multipler Zytokine mittels Antikörper-Array..	40
3.2.1.7 Messung der Entzündungsmarker IL-6, -1 $\beta$ und -8 mittels ELISA .....	41
3.2.1.8 PCR-Analyse .....	41
3.2.2 Statistische Analyse.....	42
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Untersuchungen zur Reaktion der meningealen Zelllinie Ben-Men-1 sowie primärer humaner meningealer Zellen auf eine Exposition mit Pneumokokken .....	43
4.1.1 Pneumokokken wirken zytotoxisch auf Ben-Men-1-Zellen.....	43
4.1.2 Ben-Men-1-Zellen setzen bei Kontakt mit Pneumokokken Zytokine frei .....	44
4.1.3 Nur hohe Pneumokokken-Konzentrationen wirken auf primäre humane meningeale Zellen zytotoxisch.....	47
4.1.4 Pneumokokken bewirken eine Freisetzung selektiver Zytokine aus primären humanen meningealen Zellen .....	48
4.2 Analyse der an der Pneumokokken-induzierten IL-6-Produktion beteiligten Signalwege mithilfe ausgewählter pharmakologischer Hemmstoffe.....	50
4.2.1 BET-Inhibition verringert die IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen.....	50
4.2.2 Ben-Men-1-Zellen und primäre humane meningeale Zellen exprimieren weder TLR2 noch TLR4 oder TLR8.....	52
4.3 Interaktion von Ben-Men-1-Zellen und humanen meningealen Zellen mit Makrophagen .....	53
4.4 Einfluss des Kulturmediums auf die Reaktion von Ben-Men-1-Zellen und primären humanen meningealen Zellen auf eine Pneumokokken-Infektion.....	56
4.4.1 Ben-Men-1-Zellen reagieren im MCM bereits auf niedrigere Pneumokokken-Konzentrationen als im DMEM.....	56
4.4.2 Ben-Men-1-Zellen reagieren in humanem CSF stärker auf Pneumokokken als im MCM.....	59
4.4.3 Pneumokokken wirken auf humane meningeale Zellen im CSF zytotoxischer als im MCM.....	60
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>63</b>
5.1 Immunantwort und Zelltod meningealer Zellen .....	63
5.2 Effekte einer Inhibition regulierender Signalmoleküle der IL-6-Expression .....	66
5.3 Modulierte Zytokinexpression meningealer Zellen und Makrophagen im Kokultursystem.....	68
5.4 Auswirkung der Zellkulturbedingungen auf lytischen Zelltod und Zytokinproduktion durch meningeale Zellen .....	69
5.5 Schlussfolgerungen für Anknüpfungspunkte in Zellmodell und Klinik.....	70
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>

---

<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>
<b>Affidavit .....</b>	<b>98</b>

## Abstract (English):

### Meningeal cells participate in regulating the immune response to pneumococcal infection

L. Ercegovic<sup>1</sup>, S. Dyckhoff-Shen<sup>1</sup>, B. Angele<sup>1</sup>, S. Hammerschmidt<sup>2</sup>, T. Kohler<sup>2</sup>, M. Klein<sup>1</sup>,  
H.W. Pfister<sup>1</sup>, U. Ködel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LMU Klinikum - Munich (Germany), <sup>2</sup> Universität Greifswald - Greifswald (Germany)

**Background:** Pneumococcal infection of the central nervous system generates a massive inflammatory reaction which can cause brain damage and thus contributes to unfavourable disease outcome. The host immune response is triggered by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors, predominantly Toll-like receptors (TLRs). Whereas the molecular mechanisms of immune activation have been characterized to a great extent, there is still uncertainty about the major cellular sentinels of pneumococcal infection in the leptomeningeal space. In this study, we aimed to investigate the role of meningeal fibroblasts in pathogen recognition and cytokine production.

**Methods:** The reaction to exposure to antibiotic-lysed *S. pneumoniae* was examined in an *in vitro* model based on the culture of benign meningothelial meningioma cells (Ben-Men-1 cell line) and primary human meningeal cells. These were stimulated with varying duration, bacterial concentration and serotypes (D39, D39  $\Delta$ PLY, 6B, 7F). Subsequently, we measured cell proliferation and cell death via WST- and LDH-assay as well as production of interleukin-6, -1 $\beta$  and -8. Furthermore, we evaluated the effect of a set of pharmacological inhibitors (such as blocking antibodies for TLR2) and co-cultivation with THP-1 cells.

**Results:** Following challenge with pneumococci, both Ben-Men-1 and primary meningeal cells showed cell death and cytokine secretion in correlation to duration of stimulation and bacterial load. PLY-deficiency led to attenuated cell death and cytokine levels. Weakened cytokine responses of Ben-Men-1 cells were achieved with a BET-inhibitor, while no effective inhibitor was identified for primary meningeal cells. Interestingly, inhibition of TLR2 and TLR4 had no significant effect on these endpoints. Co-cultivation of both meningeal cell types with THP-1 cells caused an up to 100-fold increase in IL-6-production. Inversely, IL-1 $\beta$  was secreted more by THP-1 cells alone than in additional presence of meningeal cells.

**Conclusion:** The data suggest that meningeal cells actively participate in the inflammatory response during pneumococcal meningitis, seemingly via a TLR-independent pathway. Therefore future investigation into meningeal immunity offers potential targets for drug intervention.

## Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
Ben-Men-1	<i>Benign-Meningioma-1</i>
BET	<i>Bromodomain and extra-terminal domain</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRD	Bromodomänen-haltiges Protein ( <i>bromodomain-containing protein</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
CBP	CREB-bindendes Protein
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Coll $\alpha$ 1	Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CSF	Liquor cerebrospinalis ( <i>cerebrospinal fluid</i> )
CXCL	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Diethiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECDC	Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten ( <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
F-12	Ham's F-12-Medium
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FN	Fibronektin
FSP-1	Fibroblasten-spezifisches Protein-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

---

<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> Typ B
HIC1	<i>Hypermethylated in cancer</i>
HMC	<i>Human Meningeal Cells</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1 protein</i>
hTERT	Humane Telomerase-Reverse-Transkriptase
ICP	Intrakranieller Druck ( <i>intracranial pressure</i> )
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IPD	Invasive Pneumokokken-Erkrankung ( <i>invasive pneumococcal disease</i> )
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IκB	Inhibitorisches κB-Protein
JAK	Janus-Kinase
KBE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCGS	<i>Meningeal Cell Growth Supplement</i>
MCM	<i>Meningeal Cell Medium</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRP14	<i>Myeloid-related protein-14</i>
MS	Multiple Sklerose
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup> /NADH+H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NanA	Neuraminidase A
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NF-IL6	<i>Nuclear factor IL-6</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

---

NLRP	Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne (NOD) Leucin-reiche Wiederholungsregionen-enthaltende Proteine
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAFR	Plättchenaktivierender Faktor-Rezeptor
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCho	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV	Pneumokokken-Konjugatimpfstoff ( <i>pneumococcal conjugate vaccine</i> )
PCW	Pneumokokken-Zellwandkomponente
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDTC	<i>Pyrrolidinedithiocarbamate ammonium</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K9	Phosphoinositol-3-Kinase
PIgR	Polymerer Immunglobulinrezeptor
PKB	Protein-Kinase-B
PLL	Poly-L-Lysin
PLY	Pneumolysin
PM	Pneumokokken-Meningitis
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PspA	<i>Pneumococcal surface protein A</i>
rcf	Relative Fliehkraft ( <i>relative centrifugal force</i> )
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
Regnase-1	Regulatorische RNase 1
RNS	Reaktive Stickstoffspezies ( <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )

---

ST	Serotyp
STAT3	<i>Signal transducer and transcription-3</i>
T/E	Trypsin/EDTA
THP-1	<i>Tohoku Hospital Pediatrics-1</i>
THY	<i>Todd Hewitt Broth and Yeast Extract</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
WST	Wasserlösliches Tetrazolium-Salz ( <i>water-soluble tetrazolium</i> )
xg	Mal Schwerkraft ( <i>times gravity</i> )
ZNS	Zentralnervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Prognose der bakteriellen Meningitis

Weltweit kommt es jährlich zu über 2 Millionen Fällen von bakterieller Meningitis mit nahezu 200000 Todesopfern (GBD 2016 Meningitis Collaborators 2018). In den westlichen Industrienationen ist die bakterielle Meningitis mit 0,9-3 Fällen pro 100000 Einwohner eine seltene Erkrankung (Bijlsma et al. 2016; McIntyre et al. 2012; van de Beek et al. 2016; van de Beek et al. 2021), während in Ländern mit niedrigerem Bruttosozialprodukt, insbesondere in den südlich an die Sahara angrenzenden Ländern Afrikas, über 200 Verdachtsfälle pro 100000 Einwohner jährlich gemeldet werden (Kambiré et al. 2016; van de Beek et al. 2021; GBD 2016 Meningitis Collaborators 2018).

Mit der Einführung der Konjugatimpfstoffe in die klinische Praxis änderte sich das Erregerspektrum und das Haupterkrankungsalter der bakteriellen Meningitis. In der Vergangenheit war *Haemophilus influenzae* Typ B (Hib) in den USA und Westeuropa der häufigste Erreger der bakteriellen Meningitis, gefolgt von *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis* (Dery et al. 2007; Koedel, Scheld, et al. 2002). Mit der Einführung des Hib-Konjugatimpfstoffs wurde dieses Bakterium in der westlichen Welt zunehmend von *S. pneumoniae* als häufigster Meningitis-Erreger abgelöst; *S. pneumoniae* ist mittlerweile für bis zu 72 % der Krankheitsfälle verantwortlich (Castelblanco et al. 2014; Bijlsma et al. 2016; Dery et al. 2007; Wall et al. 2021). Überdies ist die bakterielle Meningitis heute mit einem medianen Patientenalter von 61 Jahren primär eine Erkrankung des Erwachsenenalters (Bijlsma et al. 2016; van de Beek et al. 2016; Koedel, Scheld, et al. 2002).

Trotz optimierter Therapie und intensivmedizinischer Versorgung ist die Letalität der Pneumokokken-Meningitis (PM) mit Werten bis zu 20 % in den USA und Westeuropa weiterhin hoch (Koelman et al. 2022). Zudem sind bis zu 50 % der überlebenden Patienten von neurologischen und otologischen Defiziten betroffen (Buchholz et al. 2016). Ursächlich für die neurologischen Folgeschäden sind im Krankheitsverlauf auftretende intrakranielle Komplikationen (Buchholz et al. 2016; Lucas et al. 2016; Koelman et al. 2022). Zu den häufigsten Komplikationen der PM zählen Hirnödeme (15 %), epileptische Anfälle (15-31 %), zerebrale Ischämien (13 %), Hydrozephalus (4-11 %), Vaskulopathien (40-43 %) sowie Hörverlust (22-69 %) (Buchholz et al. 2016; Lucas et al. 2016; Klein et al. 2011). Systemische Komplikationen wie Kreislaufversagen oder respiratorische Insuffizienz sind bei 33 % der Patienten zu beobachten (Koelman et al. 2022). Auch langfristig sind Patienten mit PM in ihrer Lebensqualität und allgemeinen Gesundheit beeinträchtigt. Noch bis zu 5 Jahre nach einer akuten Infektion weist ein Drittel der Patienten neurologische Defizite auf, hierunter insbesondere eine Hörminderung und kognitive Defizite (Kloek et al. 2020; Lucas et al. 2016).

Im Gegensatz zur Hib-Impfung konnten präventive Ansätze mit Konjugatimpfstoffen bisher die Inzidenz der PM nicht konsequent senken (Brouwer et al. 2018). Klinische Studien berichteten initial zwar von einem mäßigen bis deutlichen Rückgang der Inzidenz invasiver Pneumokokken-Erkrankungen (IPD) bzw. der PM nach Implementierung von Impfprogrammen mit dem heptavalenten (PCV7) und dem zuletzt eingeführten 13-valenten Konjugatimpfstoff (PCV13) (Whitney

et al. 2003; Imöhl et al. 2015; Hanquet et al. 2019; Moore et al. 2015). Allerdings scheinen die Impfprogramme keinen dauerhaften Effekt zu entfalten (Alexandre et al. 2010). Überdies scheint durch den Einsatz von PCV13 kein weiterer Rückgang der Inzidenz im Vergleich zu PCV7 erzielt zu werden (Galanis et al. 2016; Olarte et al. 2015). Als limitierender Faktor für den Impferfolg gilt unter anderem, dass infolge eines sogenannten Serotypen-Replacements Infektionen zunehmend durch Serotypen verursacht werden, die nicht durch die Impfstoffe abgedeckt sind und die vor deren Einführung lediglich eine untergeordnete Rolle als Verursacher von IPD spielten (Koelman et al. 2022; Waight et al. 2015; Raboba et al. 2021; McIntyre et al. 2012; van de Beek et al. 2016; Naucler et al. 2017). In England und Wales sind diese Serotypen mittlerweile für über 40 % der IPD verantwortlich (Ladhani et al. 2018).

Eine weitere Herausforderung sind Penicillin-resistente *S. pneumoniae*-Stämme, die seit 2017 auf der Prioritätenliste Antibiotika-resistenter Bakterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stehen (Tacconelli et al. 2018). Der Surveillance Report des Europäischen Zentrums für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten (ECDC) gab für das Jahr 2019 eine europaweite Rate Penicillin- und Makrolid-unempfindlicher Stämme von 6,2 % an (ECDC 2020). In einer japanischen Studie zur Charakterisierung nicht-invasiver Pneumokokken-Isolate wurden 2,2 % der Stämme als resistent und 33,8 % als intermediär gegen Penicillin eingestuft (Kawaguchiya et al. 2020). Auch in den USA werden geschätzt mehr als 1,2 Millionen Infektionen pro Jahr durch Antibiotika-resistente *S. pneumoniae*-Stämme verursacht und steigende Resistenzraten im zweistelligen Bereich beobachtet (Cherazard et al. 2017).

Zusammenfassend stellt die bakterielle Meningitis und insbesondere die PM weiterhin eine globale, ernstzunehmende Infektionskrankheit dar (Brouwer et al. 2010). Dementsprechend werden in Zukunft neue adjuvante Therapieoptionen sowie Impfstoffe mit erweitertem Serotypenspektrum benötigt (Koelman et al. 2020; Wall et al. 2021).

## 1.2 Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis

### 1.2.1 Bakterielle Invasion des Leptomeningealraums

Pneumokokken können den Liquorraum entweder ausgehend von einem benachbarten Infektionsherd (per continuitatem; der häufigste Infektionsweg im Erwachsenenalter) oder hämatogen über den Blutkreislauf erreichen (Koedel, Klein, et al. 2009; Østergaard et al. 2005; Koelman et al. 2022). Um hämatogen eine Meningitis zu verursachen, muss der Erreger die Blut-Hirnschranke (BHS) überwinden. Diese besteht aus mikrovaskulären Endothelzellen mit Basalmembran und Tight Junctions, die im Zusammenspiel mit Perizyten und Astrozytenfortsätzen eine Schutzbarriere zwischen Blutbahn und Hirnparenchym sowie Liquorraum bilden (Serlin et al. 2015; Sweeney et al. 2019; Liebner et al. 2018; Sharif et al. 2018). Die wichtigste Eintrittspforte für Pneumokokken befindet sich im Bereich postkapillärer Venolen und Venen innerhalb des subarachnoidalen und perivaskulären Raums (van de Beek et al. 2016; Iovino et al. 2013). Es gibt Hinweise auf einen transzellulären Transportweg in Vakuolen sowie auf eine parazelluläre Migration durch Störung der Tight Junctions (Iovino et al. 2013; Attali et al. 2008; Radin et al. 2005;

McGill et al. 2016; Barichello et al. 2013). Über bakterielle Adhäsine wie das bakterielle Oberflächenprotein PspA und Neuraminidase (NanA) entsteht eine Bindung an den Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptor (PAFR), Laminin-Rezeptor, polymeren Immunglobulinrezeptor (PIgR) und das *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) der Endothelzellen, welche hierdurch aktiviert werden (van de Beek et al. 2016; McGill et al. 2016; Iovino et al. 2017; Orihuela et al. 2009; Mook-Kanamori et al. 2011; Yau et al. 2018). Nachfolgend bindet PAFR an Phosphorylcholin (PCho) auf der Oberfläche von *S. pneumoniae*, sodass das Bakterium schließlich in die Endothelzellen eindringen kann (van de Beek et al. 2016; van de Beek et al. 2021). Das intrazelluläre Überleben von Pneumokokken wird während der transzellulären Migration über die BHS durch den Virulenzfaktor Pneumolysin (PLY) gefördert (Surve et al. 2018; Chen et al. 2019; Yau et al. 2018).

### 1.2.2 Der Virulenzfaktor Pneumolysin

Das Toxin PLY gehört neben der Polysaccharid-Kapsel, verschiedenen Oberflächenproteinen und Enzymen zu den von *S. pneumoniae* exprimierten Virulenzfaktoren und wird zum Überleben der Bakterien im Blutstrom und Auslösen einer schweren IPD benötigt (Orihuela et al. 2004; Zafar et al. 2017; van de Beek et al. 2016). Im Liquor cerebrospinalis (CSF) kommt es zur autolytischen PLY-Freisetzung, wenn die bakterielle Replikation eine stationäre Phase erreicht oder die Bakterien mit lytischen antimikrobiellen Substanzen bekämpft werden (Hupp et al. 2022). Anschließend bindet PLY an Cholesterol in der Zellmembran von Wirtszellen und generiert ringförmige Poren (Iliev et al. 2007).

PLY hat eine ausgeprägte proinflammatorische Wirkung (McNeela et al. 2010; Zafar et al. 2017; Pereira et al. 2022). So wurde gezeigt, dass epitheliale Zellen durch eine sublethale Dosis von PLY zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Anlockung von Neutrophilen bereits im Frühstadium einer Infektion angeregt werden (Ratner et al. 2006; Pereira et al. 2022). Darüber hinaus führt PLY zu mitochondrialen Schäden und bewirkt eine Apoptose von Makrophagen, Neuroblastomzellen, Fibroblasten und primären Astrozyten (Pereira et al. 2022; Braun et al. 2007; Iliev et al. 2009; Bewley et al. 2014).

In hohen lytischen Konzentrationen kommt es durch die gebildeten Poren zur Störung der zellulären Homöostase, sodass die Zellen irreversibel geschädigt und verschiedene Zelltodsignalwege ausgelöst werden (Pereira et al. 2022; Nishimoto et al. 2020). Neben der direkt zytotoxisch vermittelten, unkontrollierten Nekrose kann PLY beispielsweise in Mikrogliazellen einen pyroptotischen Zelltod sowie eine IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Sekretion bewirken (Hoegen et al. 2011; Subramanian et al. 2019; Kim et al. 2015; McNeela et al. 2010; Witzentrath et al. 2011; Nishimoto et al. 2020; Karmakar et al. 2015). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass PLY in Makrophagen und Endothelzellen zur Nekroptose führen kann (Gilley et al. 2016; Kitur et al. 2015; González-Juarbe et al. 2015; Riegler et al. 2019). Während die Nekroptose eine kontrollierte Nekrose bezeichnet und durch den *receptor-interacting protein kinase 1* (RIPK1)-RIPK3-Komplex vermittelt wird, gründet die Pyroptose auf der Aktivität des Enzyms Caspase-1 (Lamkanfi et al. 2014; Kaczmarek et al. 2013; Kesavardhana et al. 2020). Alle genannten Zelltodmechanismen sind durch Plasmamembrandefekte gekennzeichnet und gehen mit der Freisetzung zellulärer Alarmmoleküle (wie

z.B. *high mobility group box 1 protein*, HMGB1) und/oder proinflammatorischer Faktoren (wie IL-1 $\beta$ ) einher und entsprechen somit hoch inflammatorischen Prozessen (Kitur et al. 2015; Lamkanfi 2011; Galluzzi et al. 2018).

Im Mausmodell lassen sich bei PLY-defizienten Pneumokokken eine deutlich attenuierte Virulenz, ein erniedrigter systemischer Bakterientiter sowie eine weniger ausgeprägte Klinik beobachten (Wellmer et al. 2002; Hoegen et al. 2011; Hirst et al. 2008). Auch wurde demonstriert, dass in murinen Knochenmarksmakrophagen und THP-1-Makrophagen ohne PLY eine IL-1 $\beta$ -Sekretion ausbleibt (Hoegen et al. 2011). In klinischer Korrelation ist eine Studie zur PM mit Vergleich von Liquorproben Überlebender und Nicht-Überlebender anzuführen; die verstorbenen Patienten wiesen höhere PLY-Konzentrationen sowie eine höhere Bakterienlast auf (Wall et al. 2012).

### 1.2.3 Pathogenerkennung

Im Rahmen der bakteriellen Autolyse kommt es zur Freisetzung stark immunogener Zellbestandteile (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Doran et al. 2016; Hanke et al. 2011; van de Beek et al. 2016; Koedel et al. 2010). Diese werden von *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt, die sich auf der Oberfläche, im Zytoplasma und in intrazellulären Organellen wie den Endosomen immunkompetenter Zellen befinden (Doran et al. 2016; Klein, Koedel, et al. 2006; van de Beek et al. 2016; Fitzgerald et al. 2020; Ampie et al. 2022; Hanke et al. 2011). Zu relevanten PRRs gehören unter anderem Toll-like-Rezeptoren (TLR), wovon im Menschen zehn und in der Maus zwölf verschiedene identifiziert sind (Koppe et al. 2012; Fitzgerald et al. 2020; Ampie et al. 2022; Hanamsagar et al. 2012; Koedel et al. 2010). Diese führen ausgehend von individuellen Stimuli über bestimmte Adaptermoleküle und Transkriptionsfaktoren zur Zytokinausschüttung (Abb. 1, S. 19) (Koppe et al. 2012; Satoh et al. 2016; Koedel et al. 2010).

In den 1980er-Jahren demonstrierten bahnbrechende Experimente von E. Tuomanen und Mitarbeitern, dass die Injektion von Pneumokokken-Zellwandkomponenten (PCW) in den Liquor von Labortieren ausreicht, um eine Meningitis auszulösen (Tuomanen, Liu, et al. 1985). In Einklang mit diesen Befunden wurde berichtet, dass hohe PCW-Konzentrationen im Liquor bei Patienten mit PM mit ungünstigen klinischen Verläufen assoziiert sind (Schneider et al. 1999). In den letzten 20 Jahren wurde eine Handvoll PRRs identifiziert, die zur Detektion von *S. pneumoniae* im Liquor beitragen, wobei TLR die dominierende PRR-Familie sind (van de Beek et al. 2016; van de Beek et al. 2021).

Der oberflächengebundene TLR2 wurde mit dem Nachweis von Pneumokokken-Komponenten wie Lipoproteinen in Verbindung gebracht (Gisch et al. 2013; Shu et al. 2020). Es wurde berichtet, dass PLY mit oberflächengebundenem TLR4 interagiert (Malley et al. 2003); allerdings ist dies nach Befunden anderer Arbeitsgruppen immer noch Gegenstand von Debatten (McNeela et al. 2010). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass TLR9 durch genomische Pneumokokken-DNA unter *in vitro*-Bedingungen aktiviert wird (Mogensen et al. 2006). Kürzlich wurde gezeigt, dass endosomales TLR13 in Mäusen und TLR8 in Menschen die Präsenz Gram-positiver Bakte-

rien wie *S. pneumoniae* dadurch erkennen, dass sie mit bakteriellen ssRNA-Segmenten interagieren (Deshmukh et al. 2011; Oldenburg et al. 2012; Eigenbrod et al. 2015; Moen et al. 2019; Famà et al. 2020).

Um einen ersten Hinweis auf die funktionelle Relevanz von TLR bei der PM zu erhalten, analysierte unsere Arbeitsgruppe zunächst den Krankheits-Phänotyp von Mäusen mit einer genetischen Defizienz von MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*, Myd88<sup>-/-</sup>), einem zentralen Adaptermolekül in der Signalkaskade aller TLR mit Ausnahme von TLR3 (Zhang et al. 2017; Fitzgerald et al. 2020; Hanke et al. 2011; Albiger et al. 2007) im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Myd88<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine massive Reduktion der Entzündungsreaktion im Zentralnervensystem (ZNS), die mit einer starken Abschwächung Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen und Gewebeschäden einherging (Koedel et al. 2004; Klein et al. 2007). Um die für diesen Phänotyp verantwortlichen TLR zu identifizieren, untersuchte unsere Arbeitsgruppe in der Folge zunächst den Krankheitsverlauf von Mäusestämmen, denen entweder TLR2, TLR4, TLR2 und TLR4 (TLR2/4<sup>-/-</sup>) oder TLR2 und TLR4 und TLR9 (TLR2/4/9<sup>-/-</sup>) fehlten. Während der Krankheitsverlauf durch die alleinige Defizienz von TLR2 oder TLR4 nicht entscheidend beeinflusst wurde, zeigten TLR2/4<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Reduktion der meningealen Inflammation und zerebralen Gewebeschäden; die zusätzliche Defizienz von TLR9 bedingte keine weitere Abschwächung der Hirnpathologie (Koedel et al. 2003; Klein et al. 2008). Allerdings war die Veränderung des Krankheitsphänotyps bei TLR2/4<sup>-/-</sup>-Mäusen weniger stark ausgeprägt als bei Myd88<sup>-/-</sup>-Mäusen, was auf eine Beteiligung weiterer MyD88-abhängiger TLR bei der Pneumokokken-Erkennung im Liquorraum hindeutete. Zur Klärung dieses Aspektes bestimmten wir anschließend den Krankheits-Phänotyp von Mäusen mit weiteren Defizienzen in der TLR-Signalkaskade, nämlich 3d/TLR2/4<sup>-/-</sup> (diese Mäuse weisen neben einer TLR2- und TLR4-Doppel-Defizienz einen Ausfall endosomaler TLR-Signalwege infolge einer inaktivierenden UNC93B1-Mutation auf (Tabeta et al. 2006; Lee et al. 2013; Pelka et al. 2018), 3d<sup>-/-</sup>, TLR3/7/9<sup>-/-</sup>, TLR2/3/4/7/9<sup>-/-/-/-</sup>, TLR2/4/13<sup>-/-</sup> und TLR2/13<sup>-/-</sup>-Mäuse. In dieser Versuchsreihe beobachteten wir eine Übereinstimmung des Krankheitsphänotyps von Myd88<sup>-/-</sup>, 3d/TLR2/4<sup>-/-</sup>, TLR2/4/13<sup>-/-</sup> und TLR2/13<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese Mäusestämme zeigten eine vergleichbare Reduktion der Entzündungsreaktion und Meningitis-assoziiierter intrakranieller Komplikationen (Dyckhoff et al. 2019; Dyckhoff et al. 2018), was letztlich für eine zentrale Bedeutung von TLR2 und TLR13 bei der murinen PM spricht.

Neben TLR sind Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne (NOD) Leucin-reiche Wiederholungsregionen-enthaltende Proteine (NLRP, wie NLRP3), die zytoplasmatische PAMPs binden, weitere potenzielle Sensoren für Pneumokokken-Infektionen des leptomeningealen Raums (Surabhi et al. 2020). In Zellkulturexperimenten wurde festgestellt, dass die NLRP3-Aktivierung durch porenbildende bakterielle Toxine wie PLY induziert wird (McNeela et al. 2010; Witzernath et al. 2011). In einem Maus-Meningitis-Modell war ein NLRP3-Mangel mit einer verminderten Immunantwort auf eine Pneumokokken-Infektion verbunden und die NLRP3-abhängige Sekretion von Interleukin (IL)-1 $\beta$  in den Liquor war nach einer Infektion mit PLY-defizienten *S. pneumoniae* wesentlich geringer als mit PLY-produzierenden *S. pneumoniae* (Hoegen et al. 2011; Geldhoff et al. 2013).

Diese Befunde illustrieren, dass wir heute über ein sehr gutes Wissen über die Erkennungsmechanismen einer Pneumokokken-Infektion des Liquorraums verfügen.

#### 1.2.4 Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs

Die Interaktion zwischen PAMPs und TLR führt zu einer von intrazellulären Adaptermolekülen (z.B. MyD88) abhängigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuklearfaktor (NF)- $\kappa$ B. Der induzierbare Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Entzündungs- und Immunantwort bei Säugetieren. Der prototypische NF- $\kappa$ B-Komplex (das Heterodimer von p50 und RelA) wird durch Komplexbildung mit dem Inhibitorprotein I $\kappa$ B $\alpha$  im Zytoplasma festgehalten. Bei adäquater Stimulation, beispielsweise mit TLR-Liganden, wird der I $\kappa$ B-Kinase-Komplex aktiviert; dieser phosphoryliert in der Folge I $\kappa$ B $\alpha$ , was zum Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  sowie der Kerntranslokation des NF- $\kappa$ B-Komplexes mit konsekutiver Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Zielgenen führt, wie beispielsweise der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie des Chemokine (C-X-C Motif) Ligands 8 (CXCL8, IL-8) (Mitchell et al. 2016; Zhang et al. 2017; Yu et al. 2020; Tanaka et al. 2014). Die optimale transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B für bestimmte Zielgene erfordert überdies die Interaktion mit koaktivierenden Proteinen wie dem CREB (*cAMP-response element binding protein*)-bindenden Protein (CBP) oder p300 sowie dem Chromatin-Bindeprotein Bromodomänen-haltiges Protein 4 (BRD4), einen Mitglied der BET (*bromodomain and extra terminal domain*)-Proteinfamilie (Huang et al. 2009; Bao et al. 2017; Devaiah et al. 2016). Aktiviertes CREB dagegen scheint die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B inhibieren zu können, vermutlich indem es mit NF- $\kappa$ B um die koaktivierenden Proteine CBP/p300 konkurriert (Wen et al. 2010).

Im Rattenmodell der PM wurde eine Zunahme der NF- $\kappa$ B-Aktivität nach intrazisternaler Infektion mit *S. pneumoniae* beobachtet, und zwar vor allem in Immunzellen des Subarachnoidalraums sowie im Ventrikel- und kortikalen Gefäßsystem (Koedel et al. 2000). Eine Behandlung mit NF- $\kappa$ B-Inhibitoren führte zu einer Reduktion der Krankheitszeichen, der intrakraniellen Komplikationen sowie der Liquor-Pleozytose; auch kam es zu einer reduzierten zerebralen Expression von IL-6 (Koedel et al. 2000). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam eine Studie in einem murinen PM-Modell (Chen et al. 2017). Wie oben beschrieben ging die Infektion mit *S. pneumoniae* mit einer verstärkten MyD88-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung einher. Folglich wurden die Zytokine und Chemokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und MCP-1 (CC-Chemokin-Ligand 2, CCL2) vermehrt ausgeschüttet. In Gegenzug senkte die gezielte Inhibition von NF- $\kappa$ B deren Produktion. Auch ließ sich eine Abnahme der Blut-Hirn-Schrankenstörung und ein besserer klinischer Zustand beobachten (Chen et al. 2017). Somit scheint NF- $\kappa$ B einer der bedeutendsten Signalwege für die Immunantwort innerhalb des ZNS auf eine Invasion durch Pneumokokken und der damit verbundenen Krankheitsausprägung zu sein.

### 1.2.5 Expression proinflammatorischer Mediatoren

Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B steuern die Expression zahlreicher Gene, die für bestimmte Adhäsionsmoleküle, Chemokine und proinflammatorische Zytokine kodieren.

Im Liquor von Patienten mit einer PM finden sich signifikant erhöhte Konzentrationen zahlreicher Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, MIF, TNF- $\alpha$ ), Chemokine (ENA-78 (CXCL5), GRO (CXCL1), CXCL8, IP-10 (CXCL10), NAP-2 (CXCL7), CCL2, MCP-2 (CCL8), MIP-3a (CCL20)) sowie Wachstumsfaktoren (Kastenbauer et al. 2005; Zwijnenburg, de Bie, et al. 2003; Brivet et al. 2005; Spanaus et al. 1997; Østergaard et al. 2004; Wall et al. 2014). Analog zur klinischen Situation wurden auch im Tiermodell der PM erhöhte Zytokin- und Chemokin-Spiegel beobachtet, unter anderem von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , KC (CXCL1), MIP-2 (CXCL2), XCL-1, CXCL10, CXCL16, CCL2 oder CCL20 (Barichello et al. 2010; Barichello et al. 2011; Klein, Paul, et al. 2006).

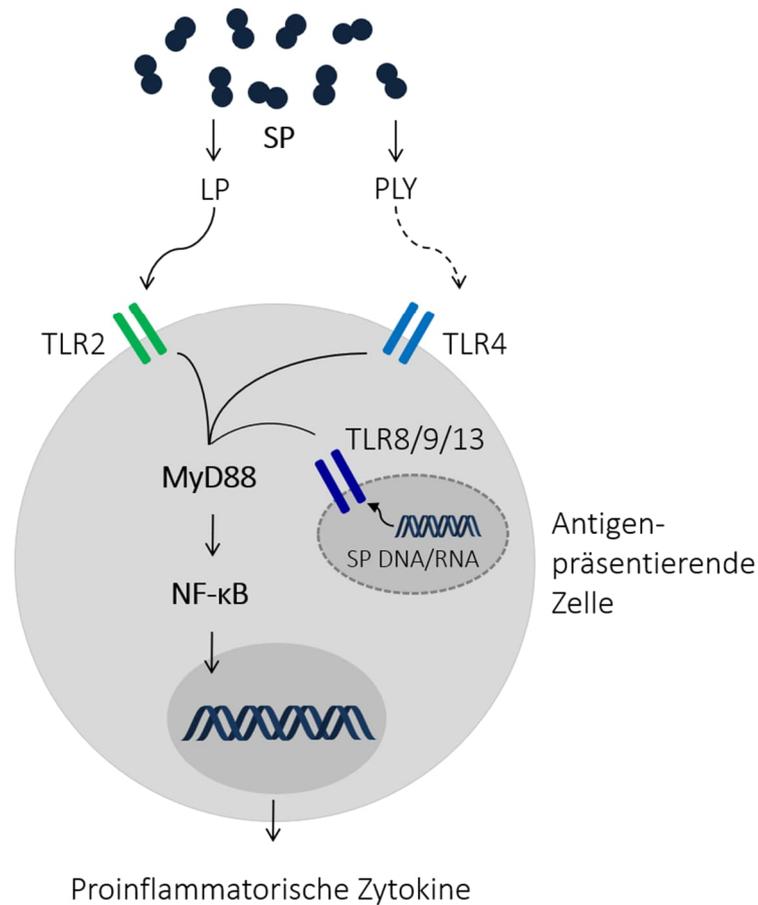
IL-6 ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, das von einer Vielzahl von Zellen wie Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert wird (Tanaka et al. 2014; Mihara et al. 2012; Chen et al. 2022; Hirano 2021; Hasegawa et al. 2016). IL-6 ist an der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse beteiligt, einschließlich Akute-Phase-Antwort, Entzündung, Immunantwort, Mechanismen der Wirtsabwehr, Hämatopoese und Zellwachstum (Tanaka et al. 2014; Hirano 2021; Del Valle et al. 2020; Chen et al. 2022; Rose-John 2018; Scheller et al. 2011; Jones 2005; Jones et al. 2018; Kany et al. 2019; McLoughlin et al. 2005; Fielding et al. 2008). Die IL-6-Spiegel werden weitgehend auf der Expressionsebene reguliert. Das menschliche IL-6-Gen enthält mehrere Elemente für die Transkriptionsfaktorbindung, einschließlich NF- $\kappa$ B, Aktivator-Protein-1 (AP-1), C/EBP $\beta$  und CREB, wobei insbesondere NF- $\kappa$ B bei der Induktion der IL-6-Transkription eine herausragende Rolle zu spielen scheint (s. 1.2.4) (Tanaka et al. 2014; Hirano 2021; Wolf et al. 2014; Luo et al. 2016). NF- $\kappa$ B-aktivierende Faktoren, einschließlich Lipopolysaccharid (LPS), IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , induzieren effizient die IL-6-Transkription (Tanaka et al. 2014). Im Mausmodell einer intrakraniellen Pneumokokken-Infektion war die Überlebenszeit von IL-6<sup>-/-</sup>-Mäusen kürzer und ihre Sterblichkeit höher als die infizierter Wildtyp-Mäuse (Albrecht et al. 2016). Der ungünstigere klinische Verlauf war mit einer höheren Bakterienlast im Gehirn, im Blut und in der Milz vergesellschaftet (Albrecht et al. 2016). In einer weiteren Studie, in der die Pneumokokken in den Liquorraum der Zisterna magna injiziert wurden, wurde beobachtet, dass sowohl durch eine pharmakologische Neutralisation von IL-6 als auch dessen genetische Ausschaltung die Meningitis-assoziierte Blut-Hirn-Schrankenstörung und folglich der Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) und die Hirnödembildung reduziert werden konnten (Paul et al. 2003). Darüber hinaus wiesen sowohl anti-IL-6-behandelte als auch IL-6-defiziente Tiere höhere Leukozytenzahlen im Liquor und dazu passend eine erhöhte Expression bestimmter proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf (Paul et al. 2003; Scheller et al. 2011). Diese Befunde sprechen für eine wichtige Funktion von IL-6 in der Immunpathogenese der (experimentellen) PM.

Für die Granulozytenrekrutierung ist insbesondere das Chemokin CXCL8 relevant (Spanaus et al. 1997; Kany et al. 2019). Ähnlich wie IL-6 wird CXCL8 unter anderem TLR-vermittelt über den NF- $\kappa$ B- und AP-1-Signalweg exprimiert und bindet anschließend an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 (Kany et al. 2019; Fousek et al. 2021). Es gibt Hinweise auf eine lokale Produktion innerhalb des ZNS (Østergaard, Yieng-Kow, Benfield, et al. 2000) sowie

auf eine Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen (Cockeran et al. 2002; Fousek et al. 2021). Im PM-Modell in Kaninchen zeigte sich, dass die Leukozytenzahl im Liquor nach intravenöser Applikation eines CXCL8-Antikörpers deutlich niedriger ist, jedoch nicht nach intrazisternaler Gabe (Ostergaard, Yieng-Kow, Larsen, et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass CXCL8 seine Hauptwirkung in mikrovaskulären Endothelzellen des Blutstroms entfaltet (Ostergaard, Yieng-Kow, Larsen, et al. 2000; Mook-Kanamori et al. 2011). Im Mausmodell der PM konnte durch systemische Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen die murinen CXCL8-Homologe CXCL1 und CXCL2 die Liquorpleozytose stark vermindert und der klinische Status der Tiere erheblich verbessert werden (Woehrl et al. 2011). Diese Daten sprechen für eine zentrale klinische Bedeutung der Granulozyten(rekrutierung) bei der (experimentellen) PM.

IL-1 $\beta$  ist ein relevantes proinflammatorisches Zytokin aus der IL-1-Superfamilie, das unter anderem von Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Mikrogliazellen produziert werden kann (Dinarello 2005b; Basu et al. 2004; Mook-Kanamori et al. 2011; Behzadi et al. 2022; Arend et al. 2008; Garlanda et al. 2013; Sims et al. 2010; Kany et al. 2019). Die Synthese wird durch endogene Stimuli wie beispielsweise Lipoproteine, Komplementfaktoren oder Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-18 und TNF- $\alpha$  nach Bindung an die entsprechenden Rezeptoren (z.B. TLR oder den IL-1-Rezeptor, IL-1R) ausgelöst (Dinarello 2011; Behzadi et al. 2022; Sims et al. 2010). Anschließend muss die inaktive Form durch ausgewählte Proteasen, wie z.B. der Caspase-1, in die aktive Form gespalten werden (Dinarello 2011, 2005a; Mook-Kanamori et al. 2011; Koedel, Winkler, et al. 2002; Behzadi et al. 2022; Garlanda et al. 2013). Die Aktivierung der Caspase-1 erfolgt in sogenannten Inflammasomen, wie dem NLRP3-Inflammasom-Multiproteinkomplex, der unter anderem durch PLY aktiviert werden kann (van de Beek et al. 2016; Hoegen et al. 2011; McNeela et al. 2010; Kany et al. 2019; Barichello et al. 2013). In der angeborenen Immunabwehr spielt IL-1 $\beta$  eine entscheidende Rolle insbesondere bei der Stimulierung von dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten durch Bindung an den IL-1R ((Behzadi et al. 2022; Kany et al. 2019). Der Inflammasom-/IL-1-Signalweg gilt als Schlüsselfaktor in der Immunpathogenese der PM. IL-1R-, Caspase-1-, ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*)- und NLRP3-defiziente Mäuse wiesen eine geringere Entzündungsreaktion, mildere intrakranielle Komplikationen und einen besseren klinischen Verlauf als entsprechende Wildtyp-Tiere auf (Zwijnenburg, van der Poll, et al. 2003; Koedel, Winkler, et al. 2002; Hoegen et al. 2011). Eine ähnliche protektive Wirkung wurde im Tiermodell durch Gabe des IL-1R-Antagonisten Anakinra erzielt (Hoegen et al. 2011). Bei Patienten mit einer bakteriellen Meningitis korrelierten die Liquorspiegel von IL-1 $\beta$  mit dem klinischen Verlauf (Mustafa et al. 1989).

Die Produktion großer Mengen an proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen bedingt die Einwanderung einer großen Anzahl von Leukozyten und insbesondere neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn in den Liquorraum.



**Abbildung 1: Mechanismen der Pathogenerkennung bei einer Infektion des Liquorraums mit *S. pneumoniae* (SP).** LP wird durch TLR2 erkannt, während TLR4 möglicherweise PLY auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen des Wirtsorganismus erkennt. TLR8, TLR9 und TLR13 detektieren bakterielle Nukleinsäuren. Hierauf folgt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB über eine vom Adaptermolekül MyD88 abhängige Signalkaskade. Nachfolgend kommt es zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6. Basierend auf Koppe et al. 2007 und Fitzgerald et al. 2020.

### 1.2.6 Leukozyteneinwanderung und Gewebeschädigung

Die Zytokin-/Chemokinproduktion führt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und in geringerem Umfang anderer Leukozytenpopulationen in den Liquorraum (Loughran et al. 2019; Yau et al. 2018). Um eingedrungene Krankheitserreger zu bekämpfen, können neutrophile Granulozyten verschiedene antimikrobielle Substanzen freisetzen, welche jedoch auch zu Kollateralschäden am Wirtsgewebe führen können. Starke Hinweise für eine schädliche Rolle neutrophiler Granulozyten bei der PM stammen aus Untersuchungen in Mausmodellen: dabei wurde eine erhebliche Verringerung der vaskulären und neuronalen Schädigung nach einer pharmakologischen Depletion dieser Zellpopulation beobachtet (Hoffmann et al. 2007; Koedel, Frankenberg, et al. 2009). Zu den von aktivierten neutrophilen Granulozyten ausgeschütteten Substanzen gehören starke Oxidationsmittel und proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Oxidative Veränderungen an lebenswichtigen Wirtsmakromolekülen wie DNA wurden

in Gehirnproben nachgewiesen, die sowohl von Patienten, die an einer Meningitis starben, als auch in entsprechenden Tiermodellen gewonnen wurden (Klein, Koedel, et al. 2006). Bei Menschen mit einer bakteriellen Meningitis sind hohe Liquor-Spiegel von Biomarkern für oxidativen Stress mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf vergesellschaftet (Kastenbauer et al. 2002a). Darüber hinaus haben Studien in Tiermodellen wesentliche Beweise dafür geliefert, dass eine Behandlung mit Antioxidantien vor Meningitis-assoziiierter Hirnschädigung schützen kann (Klein, Koedel, et al. 2006). Des Weiteren ist bezüglich der MMP nachgewiesen, dass deren erhöhte Aktivität die Permeabilität der Blut-Hirn-/Liquor-Schranke steigern und zu neuronaler Zellschädigung beitragen kann (Rosenberg 2009; Schaefer 2014). Signifikant erhöhte Konzentrationen verschiedener MMP einschließlich MMP-3, -8 und -9 wurden in Liquor- und/oder Gehirnproben von Patienten und Tieren mit einer bakteriellen Meningitis gefunden (Green et al. 2011; Leib et al. 2000). Hohe Liquor-MMP-Konzentrationen wurden als Risikofaktor für die Entwicklung neurologischer Folgeerscheinungen nach einer bakteriellen Meningitis beschrieben (Leppert et al. 2000). In Übereinstimmung hiermit haben Tierstudien gezeigt, dass MMP-Inhibitoren in der Lage sind, sowohl Gewebeschäden als auch die Letalität bei einer PM zu senken (Liechti et al. 2015). Zusätzlich zu entzündungsinduzierten Kollateralschäden scheint eine direkte bakterielle Toxizität zum neuronalen Zelluntergang im Verlauf einer bakterieller Meningitis beizutragen (Hirst et al. 2004). Zum Beispiel wurde festgestellt, dass die intrazisternale Injektion von Stämmen, die kein PLY, Autolysin oder Wasserstoffperoxid produzieren können, mit einer geringer ausgeprägten neuronalen Schädigung einhergeht als die Infektion mit einem Wildtyp-Stamm (Braun et al. 2002; Hirst et al. 2008). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass PLY eine signifikante synaptotoxische und dendritotoxische Rolle bei der PM spielt, indem es die Glutamatfreisetzung aus Astrozyten initiiert, was zu einer nachfolgenden Glutamat-abhängigen Synapsenschädigung führt (Wippel et al. 2013). Kombiniert scheint die konzertierte Wirkung von bakteriellen und vom Wirt stammenden Toxinen für die direkte Zellschädigung bei der PM verantwortlich zu sein.

### **Verstärkung von Entzündungen und Hirnschäden**

Gestresste oder geschädigte Zellen wiederum können Alarmsignale (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) freisetzen. Die DAMP-Familie besteht aus strukturell unterschiedlichen und evolutionär nicht verwandten multifunktionellen endogenen Molekülen, die unterschiedliche physiologische Funktionen in gesunden Zellen ausüben und nach Zellstress und/oder Zelltod in den Extrazellulärraum gelangen (Chan et al. 2012; van Zoelen et al. 2009; Gadani et al. 2015). Beispiele für DAMPs sind das HMGB1 und Proteine der S100-Klasse (z.B. *myeloid-related protein 14*, MRP14), die an spezifische Rezeptoren binden und Entzündungen nach Stress und/oder Verletzungen fördern können. Kürzlich wurden deutlich erhöhte Konzentrationen sowohl von HMGB1 als auch von MRP14 in Liquorproben von Patienten sowie bei Mäusen mit einer PM nachgewiesen (Tang et al. 2008; Asano et al. 2011; Höhne et al. 2013; Wache et al. 2015). Im Mausmodell hatte die Behandlung mit HMGB1-Antagonisten oder einem MRP14-Inhibitor sowie ein genetischer MRP14-Mangel keinen Einfluss auf die Entstehung einer Meningitis, war aber mit einem besseren Abklingen der Entzündung unter Antibiotikatherapie verbunden. Diese Daten legen nahe, dass DAMPs, die vermutlich aus sterbenden Zellen freigesetzt werden,

als Propagatoren der Entzündungsreaktion bei der PM fungieren können. Dies könnte eine Erklärung für die empirische Beobachtung liefern, dass eine Entzündung über Tage anhalten kann, obwohl eine Antibiotikatherapie den Liquor schnell sterilisiert und mit einer Eliminierung der Pneumokokkenabbauprodukte innerhalb von Stunden einhergeht (Blazer et al. 1983; Viallon et al. 2005; Kanegaye et al. 2001; Gerber et al. 2003; Stucki et al. 2007).

### **Das Hauptangriffsziel der Entzündungsreaktion: das zerebrale Gefäßsystem**

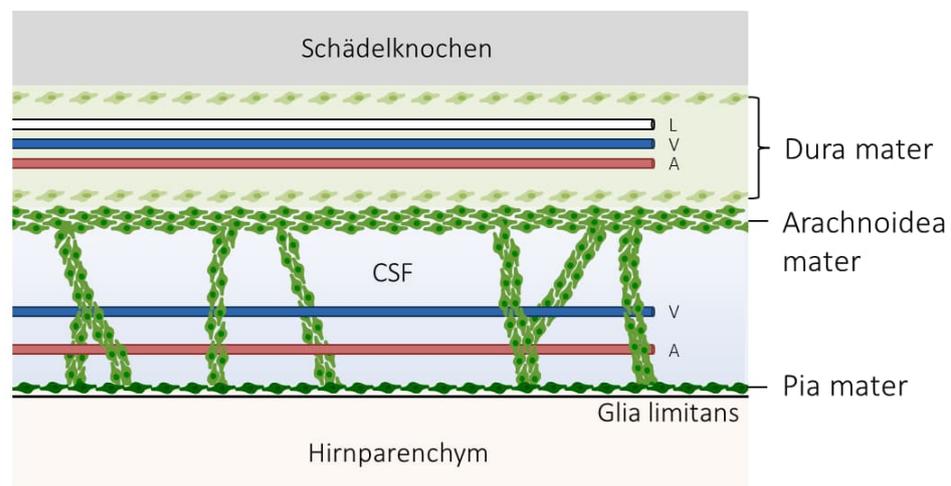
In Obduktionsstudien wurde *S. pneumoniae* im Subarachnoidalraum sowie in den perivaskulären und ventrikulären Räumen nachgewiesen, aber im Allgemeinen nicht (außer im seltenen Fall einer Abszessbildung) im Hirnparenchym (Rodriguez et al. 1991; Chiavolini et al. 2004; Guarner et al. 2013). Eine Leukozyteninfiltration in das Hirnparenchym wurde nur während der späten Infektion und in unmittelbarer Nähe der flüssigkeitsgefüllten Räume beobachtet (Rodriguez et al. 1991; Rorke et al. 1963; Dodge et al. 1965b, 1965a; Klein, Paul, et al. 2006; Brouwer et al. 2014). Dieses Verteilungsmuster spricht gegen eine dominante Rolle der direkten, bakteriellen und vom Wirt stammenden Toxin-induzierten Zytotoxizität bei Meningitis-assoziierten Hirnschäden. Stattdessen dürften Hirnschädigungen eher durch pathologische Veränderungen im Gefäßsystem vermittelt werden (Schaper et al. 2002). Der vorherrschende Befund bei Patienten ist eine arterielle Stenose aufgrund einer schweren Entzündung der Gefäßwand (Vaskulitis) und/oder eines Vasospasmus, was zu zerebraler Minderdurchblutung und Ischämie führen kann (Kastenbauer et al. 2003; Pfister et al. 1992; Weisfelt et al. 2006; Klein et al. 2011). Ein Hirninfarkt kann auch als Folge einer Thrombose und/oder eines embolischen Gefäßverschlusses auftreten (Schut et al. 2009; Schut et al. 2012; Vergouwen et al. 2010). Darüber hinaus kann eine Gefäßschädigung zu einem Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation (die als Aufrechterhaltung eines konstanten zerebralen Blutflusses trotz Schwankungen des zerebralen Perfusionsdrucks definiert ist) und der Integrität der BHS führen (Kastenbauer et al. 2003; Klein et al. 2011; Tureen et al. 1990; Møller et al. 2000). Durch die Öffnung der BHS können Plasmabestandteile in das Gehirn entweichen, was zu einem vasogenen Hirnödem und in der Folge zu einem Anstieg des ICP führt. Letzteres kann für Patienten mit einer bakteriellen Meningitis gefährlich sein, da in Folge der zerebrale Perfusionsdruck gesenkt und damit die zerebrale Perfusion reduziert werden kann, insbesondere wenn die zerebrovaskuläre Autoregulation gestört ist. Ein stark erhöhter ICP kann zur zerebralen Herniation mit nachfolgender Unterbrechung der Blutversorgung und folglich massiver Hirnschädigung führen.

## **1.3 Mögliche zelluläre Sensoren einer Pneumokokken-Infektion im leptomeningealen Raum**

### **1.3.1 Anatomie und Immunologie des leptomeningealen Raums**

Das ZNS bei Wirbeltieren ist von drei Gewebeschichten umhüllt, die zusammen die Hirnhäute und somit den Ort der Infektion bei der PM bilden (Abb. 2) (Weller 2005; Decimo et al. 2021;

Wang et al. 2022). Die Dura mater (Pachymeninx), die starke äußere Schicht der Hirnhäute, besteht hauptsächlich aus unterschiedlichen Fibroblasten-Untergruppen und Kollagenfasern, die die Dura mater am Schädel befestigen (Pikor et al. 2017). Die Dura mater beherbergt gefensterete Blut- und Lymphgefäße, die diese meningeale Schicht mit der Peripherie verbinden (Pikor et al. 2017; Wang et al. 2022). Unterhalb der Dura mater befindet sich die Arachnoidea mater, die aus einer oberen Schicht epithelähnlicher Zellen besteht, welche enge und adhärenente Verbindungen aufweisen (Dorrier et al. 2022). Diese Sperrschicht ist Teil der Blut-Liquor-Schranke und verhindert die freie Bewegung von Molekülen zwischen Dura mater und leptomeningealem Raum. Die tiefere Schicht der Arachnoidea mater besteht aus locker angeordneten Fibroblasten und Kollagen, die die Arachnoidaltrabekel bilden. Diese überspannen den Liquor-gefüllten leptomeningealen Raum und verbinden sich mit der darunter liegenden Pia mater (Wang et al. 2022; Pikor et al. 2017; Decimo et al. 2012). Die Pia mater enthält eine dünne Schicht abgeflachter Fibroblasten, unter der sich eine Basalmembran aus Kollagen und elastischen Fasern befindet, die die Pia mater und die Glia limitans trennt (Pikor et al. 2017). Diese bezeichnet die Schicht zwischen den Hirnhäuten und dem Hirnparenchym und wird von Astrozyten-Endfüßen gebildet (Pikor et al. 2017). Der Subarachnoidalraum enthält auch nicht gefensterete Blutgefäße, die von Fibroblasten bedeckt sind (Xu et al. 2021). Zusammen mit eindringenden Blutgefäßen führt die Pia mater in das Hirnparenchym. Daher finden sich Fibroblasten auch in perivaskulären Virchow-Robin-Räumen (Pikor et al. 2017; Decimo et al. 2012; Derk et al. 2021). Abgesehen von der bei weitem größten Zellpopulation von Fibroblasten beherbergen die Meningen verschiedene andere Zellpopulationen, nämlich ansässige Immunzellen wie Makrophagen und Mastzellen, andere Stromazellen wie Perizyten und neurale Vorläufer (Decimo et al. 2021; Derk et al. 2021; Alves de Lima et al. 2020).



**Abbildung 2: Struktur der Meningen.** Die Glia limitans liegt dem Hirnparenchym an und wird zum CSF-gefüllten Subarachnoidalraum hin von der einschichtigen Pia mater begrenzt. Den Subarachnoidalraum durchziehen meningeale Arterien (A) und Venen (V). Die Arachnoidea mater bildet ein Trabekelwerk sowie mit ihrer äußeren Schicht die Grenze zwischen Subarachnoidalraum und Dura mater, welche ein Blut- und Lymphgefäßsystem (L) enthält und dem Schädelknochen anliegt. Basierend auf Engelhardt et al. 2017 und Alves de Lima et al. 2020.

### 1.3.2 Residente Immunzellen

Bei der Suche nach den zellulären Sensoren einer Pneumokokken-Infektion der Leptomeningen lag der Fokus bisher auf residenten Immunzellen. Bisher wurden zwei Studien veröffentlicht, die sich mit der Auswirkung der residenten Makrophagendepletion auf eine experimentelle PM befassen (Trostdorf et al. 1999; Polfliet et al. 2001; Mustafa et al. 1989). In einem erwachsenen Kaninchenmodell hatte die intrazisternale Applikation von Clodronat-Liposomen keinen signifikanten Einfluss auf die Leukozyten- und Zytokinkonzentrationen im Liquor (Trostdorf et al. 1999). In einem erwachsenen Rattenmodell der PM war die intraventrikuläre Verabreichung von Clodronat-Liposomen mit einem signifikant verringerten Leukozyteneinstrom in den Liquor, aber erhöhten Zytokinspiegeln im Liquor verbunden (Polfliet et al. 2001). Unter Verwendung eines Maus-Meningitis-Modells beobachtete unsere Gruppe 24 Stunden nach der Pneumokokken-Infektion einen signifikanten Anstieg der Liquor-Pleozytose bei Tieren, die intrazisternal mit Clodronat-Liposomen behandelt worden waren. Noch bemerkenswerter war ein dramatischer Anstieg der Hirnpathologie und Mortalität bei fortgeschrittener Erkrankung (zwischen der 24. und 42. Stunde nach Meningitis-Induktion) bei Mäusen, bei denen entweder durch eine topische Clodronat-Liposomen-Verabreichung oder eine systemische Gabe des CSFR1-Inhibitors PLX5622 die Makrophagenpopulation hochsignifikant reduziert worden war (Händle et al. 2022). Zusammengenommen sind die bestehenden Erkenntnisse über die Rolle residenter Makrophagen bei der PM uneinheitlich. Dies kann – zumindest teilweise – durch Unterschiede zwischen den Studien in der Dosierung, dem Zeitpunkt und dem Injektionsweg von Clodronat-Liposomen, der Tierart, den verwendeten Pneumokokken-Serotypen und der Versuchsdauer erklärt werden. Trotz dieser uneinheitlichen Datenlage deuten die Studien darauf hin, dass [i] die Depletion residenter Makrophagen zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs führen kann und [ii] die Pneumokokken-Infektion trotz Depletion der Makrophagen (um etwa 75-95 %) immer noch eine massive Immunantwort verursacht. Folglich scheinen entweder kleinste Makrophagenzahlen – allein oder in Zusammenarbeit mit anderen Zelltypen – zur Initiierung einer Immunantwort auszureichen, oder aber andere Zelltypen könnten primär für die Induktion der Immunantwort verantwortlich sein.

Auf der Suche nach anderen beteiligten Zelltypen untersuchte unsere Arbeitsgruppe zunächst die Rolle von Mastzellen bei der PM (Fritscher et al. 2018). Obwohl murine Mastzellen auf eine Pneumokokken-Provokation mit Degranulation und Zytokinproduktion *in vitro* reagierten, hatten weder zwei verschiedene Mastzell-defiziente Kit-Mutanten-Mausstämme noch eine pharmakologische Mastzellstabilisierung mit Cromoglycat einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsphänotyp (Fritscher et al. 2018). Daher scheinen Mastzellen nicht als Wächterzellen einer Pneumokokken-Infektion innerhalb des leptomeningealen Raums zu fungieren.

### 1.3.3 Meningeale Fibroblasten

#### 1.3.3.1 Kurzer Überblick über die ZNS-Fibroblastenpopulation

Fibroblasten stellen die häufigste Zellpopulation in den Leptomeningen (meningeale Fibroblasten) dar und sind auch in den Virchow-Robin-Räumen entlang von Arterien, Arteriolen, Venolen und Venen (perivaskuläre Fibroblasten) vorhanden (Xu et al. 2021; Davidson et al. 2021; Dorrier

et al. 2022). Fibroblasten sind Bindegewebszellen von spindelförmiger Morphologie, die von der von ihnen sezernierten extrazellulären Matrix (ECM) umgeben sind (Schuster et al. 2021). Zu den Merkmalen, die für die Einordnung von Zellen als Fibroblasten-ähnlich verwendet werden, gehören die Expression von Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1 (Coll1 $\alpha$ 1) sowie gemeinsame Markermoleküle wie z.B. der sogenannte *platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$*  (PDGFR- $\alpha$ ) und HIC1 (*hypermethylated in cancer*) (Dorrier et al. 2022). Andere Fibroblasten-Marker, die in der Regel kontextabhängig verwendet werden, sind Vimentin, CD90 (Thy-1), der Transkriptionsfaktor TCF, Fibroblasten-spezifisches Protein-1 (FSP-1/S100A4), Osteopontin (SPP1) und Podoplanin (GP38) (Xu et al. 2021; Davidson et al. 2021; Dorrier et al. 2022; Schuster et al. 2021; Krausgruber et al. 2020; Månberg et al. 2021). Viele dieser Marker werden von diesen Zellen weder einheitlich noch ausschließlich exprimiert (Xu et al. 2021; Davidson et al. 2021; Dorrier et al. 2022), was dafür spricht, dass Fibroblasten heterogene Zellen sind, die funktionell unterschiedliche Populationen umfassen (Muhl et al. 2020; Buechler et al. 2021). Die Phänotypen unterscheiden sich je nach Herkunftsgewebe und bleiben sogar *ex vivo* in Zellkultur erhalten (Davidson et al. 2021; McGettrick et al. 2012; Forte et al. 2022). Letzteres legt nahe, dass Fibroblasten eine Positionsidentität aufweisen (Davidson et al. 2021). Eine solche Prägung erfolgt während der Entwicklung und wird postnatal durch epigenetische Regulation von HOX-Genen aufrechterhalten (Davidson et al. 2021; McGettrick et al. 2012). Diese ortsspezifischen Transkriptionsprogramme spiegeln wahrscheinlich die individuellen funktionellen Anforderungen des umgebenden Gewebes wider (Davidson et al. 2021; McGettrick et al. 2012).

Die Rolle von ZNS-Fibroblasten bei Gesundheit und Krankheit wird erst seit einigen Jahren intensiver untersucht. Eine wichtige Funktion von Fibroblasten besteht darin, das ZNS-Bindegewebe durch die Sekretion von ECM-Komponenten strukturell zu unterstützen (Dorrier et al. 2022). Nach einer ZNS-Verletzung proliferieren, wandern und sezernieren Fibroblasten aktiv ECM-Proteine und bioaktive Moleküle und tragen so zur Bildung fibrotischer Narben nach zerebraler Ischämie, traumatischer Hirnverletzung, Rückenmarksverletzung und bei Multipler Sklerose (MS) bei (Dorrier et al. 2022; Makiyama et al. 2015; Komuta et al. 2010; Soderblom et al. 2013; Yahn et al. 2020). Zusätzlich zur möglichen Rolle bei der Narbenbildung könnte die frühzeitige Aktivierung perivaskulärer Fibroblasten zum Fortschreiten der Amyotrophen Lateralsklerose (bei Mensch und im Mausmodell) beitragen, indem diese Aktivierung zur Freisetzung von Molekülen führt, die die BHS stören (Månberg et al. 2021). In der Peripherie scheinen Fibroblasten als Immunwächterzellen zu fungieren (Davidson et al. 2021). Wie Makrophagen können periphere Fibroblasten DAMPs und PAMPs durch spezifische PRRs wahrnehmen, was zur Aktivierung entzündungsfördernder Signalwege führt, die wiederum die Rekrutierung von Leukozyten und die Regulierung der Leukozyten-Aktivität sowie des -Überlebens unterstützen können (Cho et al. 2007; Bombardieri et al. 2011; Brentano et al. 2005; Frank-Bertoncelj et al. 2018; Bajénoff et al. 2006). Abgesehen von einer direkten Reaktion von Fibroblasten auf Gefahrensignale können periphere Fibroblasten nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine, die von Makrophagen/Monozyten bei Exposition mit PAMPs und/oder DAMPs freigesetzt werden, einen entzündlichen Phänotyp annehmen (Davidson et al. 2021; Schuster et al. 2021; Ploeger et al. 2013; Holt et al. 2010). Nach einer peripheren Entzündung bildet sich in Lymphknoten ein fibroblastisches retikuläres Netzwerk, das als Immunzell-Nische dient (Bajénoff et al. 2006). Ein ähnliches Netzwerk findet sich auch in den Hirnhäuten bei MS und nach einer viralen ZNS-Infektion

(Magliozzi et al. 2007; Kim et al. 2009). Diese Netzwerke bestehen aus T-, B- und anderen Immunzellen, die mit Fibroblasten interagieren und alle durch von den Fibroblasten sezernierte ECM zusammengehalten werden; ihre funktionelle Rolle bei ZNS-Infektionen muss noch geklärt werden (Dorrier et al. 2022).

### 1.3.3.2 Bisherige Erkenntnisse über die Rolle von Fibroblasten bei der bakteriellen Meningitis

Verschiedene *in vitro*-Studien haben versucht, einen Einblick in die mögliche Rolle meningealer Fibroblasten bei bakteriellen ZNS-Infektionen zu gewinnen. Nach Stimulation mit *Escherichia coli* LPS wurde eine Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  aus meningealen Zellen der Ratte beobachtet (Wu et al. 2005). Zusätzlich zur induzierbaren Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen wurden leptomeningeale Zellen (vom humanen WHO-Grad-I-Meningiom abgeleitete, hTERT-immortalisierte Zellen, Ben-Men-1 genannt) als hochaktive „Phagozyten“ beschrieben, die große Mengen an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien aufnehmen können (Fan et al. 2012). Darüber hinaus wurde berichtet, dass leptomeningeale Zellen (isoliert aus chirurgisch entfernten menschlichen Gehirntumoren) bei Exposition mit *N. meningitidis* hohe Konzentrationen an Zytokinen und Chemokinen, einschließlich TNF- $\alpha$ , IL-6 und CXCL8, in einer TLR4-MyD88-abhängigen Weise exprimieren (Christodoulides et al. 2002; Royer et al. 2013). Im identischen Modell kultivierter menschlicher Meningealzellen wurde beobachtet, dass die meningealen Pathogene *N. meningitidis*, *H. influenzae* und *S. pneumoniae* an diese Zellen anhaften, aber nicht in diese eindringen können (Schulze-Lohoff et al. 1998). Die beiden erstgenannten Erreger induzierten eine konzentrationsabhängige Sekretion von IL-6, CXCL8, CCL2, CCL5 und GM-CSF, jedoch keinen Zelltod. Bemerkenswerterweise wurde festgestellt, dass *S. pneumoniae* die Zytokinsekretion nicht stimuliert, aber den Tod dieser Zellen verursachen kann, allerdings nur bei hohen bakteriellen Konzentrationen (über  $10^8$  koloniebildende Einheiten (KBE) pro Monolayer) (Schulze-Lohoff et al. 1998). Dieser überraschende Befund veranlasste uns dazu, die Auswirkungen einer Pneumokokken-Provokation in alternativen meningealen Zellkulturanätzen zu untersuchen, nämlich unter Verwendung der oben erwähnten Ben-Men-1-Zelllinie (Püttmann et al. 2005) und im Handel erhältlicher primärer humaner Meningealzellen.

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Bei der Invasion des Leptomeningealraums durch Pneumokokken kommt es zu einer massiven Entzündungsreaktion, welche zu Gewebeschädigung führen und den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussen kann. Die Pathogenerkennung erfolgt durch Bindung von PAMPs an PRRs. Hiervon ausgehend werden multiple Signalkaskaden, einige davon über TLR, ausgelöst. Welche Zellpopulation für die Initiierung dieser Immunantwort hauptverantwortlich ist, ist im Detail unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle meningealer Zellen bei der Pathogenerkennung im Rahmen einer Pneumokokken-Infektion des Liquorraums zu charakterisieren. Die Versuche wurden sowohl mit der humanen Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 als auch mit primären humanen meningealen Zellen durchgeführt.

Es wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a) Wie reagieren meningeale Zellen *in vitro* auf eine Exposition mit *S. pneumoniae* in Hinblick auf Zelltod und Zytokinproduktion? Hierbei wurden meningeale Zellen mit verschiedenen Pneumokokken-Stämmen in aufsteigenden Konzentrationen und für unterschiedliche Zeit inkubiert.
- b) Welche Signalwege sind für die *S. pneumoniae*-induzierte Zytokinausschüttung durch meningeale Zellen entscheidend?
- c) Wie beeinflussen sich meningeale Zellen und Makrophagen gegenseitig in ihrer Reaktion auf *S. pneumoniae*?
- d) Wie werden die Zellvitalität und Zytokinproduktion meningealer Zellen nach Pneumokokken-Inokulation durch die verwendeten Zellkulturbedingungen beeinflusst?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellen

Ben-Men-1-Zelllinie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
HMC (Lot-Nr. 11017, 12575, 19218)	ScienCell (Distributor: provitro AG, Berlin)
THP-1-Zelllinie	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i> (ECACC), Porton Down, Salisbury, Vereinigtes Königreich

##### 3.1.2 Zellkulturmedien, Reagenzien und Chemikalien

Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Chemilumineszenz-Substrat	Rockland Immunochemincals, Inc., Pottstown, USA
DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DTT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Endotoxin-free Ultra Pure Water	Merck Millipore, Burlington, USA
Ethanol	CLN GmbH, Langenbach
FBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Handdesinfektionsmittel Sterilium® Pure	LMU Klinikum – Apotheke, München
Humanes CSF	LMU Klinikum, Neurologische Klinik und Poliklinik, München
LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II	BioVision, Milpitas, USA
MCGS	ScienCell, Carlsbad, USA
MCM	ScienCell, Carlsbad, USA
Oberflächendesinfektionsmittel Bacillol®	Hartmann, Heidenheim
P/S	ScienCell, Carlsbad, USA

PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PLL	ScienCell, Carlsbad, USA
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Schafblut (Oxoid)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T/E	ScienCell, Carlsbad, USA
THY	CARL ROTH GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TNS	ScienCell, Carlsbad, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
WST-1	Roche, Mannheim

### 3.1.3 Bakterienstämme

<i>S. pneumoniae</i> , ST2, D39	
<i>S. pneumoniae</i> , ST2, D39 $\Delta$ PLY	Institut für Genetik und Funktionelle
<i>S. pneumoniae</i> , ST6B	Genomforschung, Universität Greifswald
<i>S. pneumoniae</i> , ST7F	

### 3.1.4 Inhibitoren

(+)-JQ1	Hycultec, Beutelsbach
666-15	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
Anti-mouse/human TLR2 mAb T2.5	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
BAY 11-7082	Hycultec, Beutelsbach
Chloroquine diphosphate salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
I-BET151	Selleckchem, Houston, USA
KG-501 (2-naphthol-AS-E-phosphate)	Selleckchem, Houston, USA
Parthenolide	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
PDTC	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich

SR 11302	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
TLR4 Inhibitor, TAK-242	Calbiochem, San Diego, USA

### 3.1.5 Proteinchemie

ELISA Ancillary Reagent Kit 2 DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
Human Cytokine Antibody Array C3	Raybiotech, Peachtree Corners, USA
Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet® ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Human IL-6 DuoSet® ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Human CXCL8/CXCL8 DuoSet® ELISA	R&D Systems, Wiesbaden

### 3.1.6 Molekularbiologie

Aurum™ Total RNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
PrimePCR™-Primer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Cryo.s Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser Menzel-Gläser 20×26 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser Nunc™ Thermanox™ ø 13 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmalhandschuhe	B. Braun SE, Melsungen
Einmal-Mikropipetten Glas	Brand GbH + Co. KG, Wertheim
Einmalmundschutz	Zwetko GmbH, Olching
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten Corning® 96 Well	Corning, Inc., Corning, USA
Mikrotiterplatten ROTILABO® V-Profil 96 Well	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Objektträger Menzel-Gläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen Combitips® advanced 5ml	Eppendorf AG, Hamburg

Pipettenspitzen epT.I.P.S.® 20, 200, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen Corning® 15 ml	Corning, Inc., Corning, USA
Falcon-Röhrchen Corning® 50 ml	Corning, Inc., Corning, USA
Serologische Pipetten Falcon® 5 ml, 10 ml	Corning, Inc., Corning, USA
Verschlussfolie Bemis Parafilm M™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Verschlussfolie Mikrotiterplatte	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturflaschen Corning® 75 cm <sup>2</sup>	Corning, Inc., Corning, USA
Zellschaber Corning®	Corning, Inc., Corning, USA

### 3.1.8 Apparaturen und Geräte

Analysenwaage KERN ABJ	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
Autoklav Systec	Systec GmbH, Linden
ChemiDoc-It Imaging System™	UVP, LLC, Upland, USA
Digitalkamera Moticam 500	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Einkanal-Pipette Multipette®	Eppendorf AG, Hamburg
Einkanal-Mikroliterpipetten 10, 200, 1000 µl Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Einkanal-Pipette Easypet®	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschränke	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop Leica LEITZ DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Mehrkanal-Mikroliterpipette Transferpette®	Brand GbH + Co. KG, Wertheim
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrobiologischer Brutschrank Heraeus®	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mikrobiologischer Brutschrank Midi 40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Mikroplatten-Reader Tristar LB 941	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Mikrozentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Pinzette Dumont	Manufaktur Dumont, Montignez, Schweiz
Plattenzentrifuge	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen
Präzisionswaage KERN KB	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
Falcon-Röhrchen-Ständer	Brand GbH + Co. KG, Wertheim
Real-Time rapid PCR qTower <sup>3</sup>	Analytik Jena GmbH, Jena
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach

### 3.1.9 Bioinformatik

MikroWin 2000	Labsis Laborsysteme GmbH, Neunkirchen-Seelscheid
GraphPad Prism (9.2.0)	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturversuche

Alle Zellkulturversuche wurden zur Gewährleistung steriler Bedingungen unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellzahl wurde mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und Trypanblau-Färbung ermittelt.

#### 3.2.1.1 Humane Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1

Die Ben-Men-1-Zelllinie (*Benign-Meningioma-1*) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen. Diese Zelllinie wurde von Püttmann et al. 2005 etabliert. Es handelt sich um eine immortalisierte, differenzierte humane Meningeom-Zelllinie. Hierbei wurden primäre Zellen eines humanen Meningeoms WHO Grad 1 mit dem humanen Telomerase-Reverse-Transkriptase-Gen (hTERT-Gen) retroviral transduziert, um die zelluläre

Seneszenz zu verhindern. Für diese Zelllinie wurden typische zytologische, immunzytochemische, ultrastrukturelle und genetische Merkmale von Meningeomzellen nachgewiesen (Püttmann et al. 2005). Ben-Men-1-Zellen sind adhärente, in Monolayern wachsende Zellen. Die Ben-Men-1-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in 25 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % P/S (10000 Einheiten Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin) kultiviert. Die Zellen wurden alle 7 Tage subkultiviert. Hierfür wurde der Überstand des Kulturmediums verworfen und anschließend der Monolayer zweimal mit Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Zur Lösung der Zellen vom Zellkulturflaschenboden wurden diese in 5 ml Trypsin und Ethylendiamintetraacetat (Trypsin/EDTA, T/E) resuspendiert und für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension mit einer 10 ml-Pipette in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben, 5 ml Medium hinzugefügt und die Zelldichte ermittelt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau gemischt, wovon 20 µl auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert wurden. Da Trypanblau sich in toten Zellen anreichert, verfärbten sich diese dunkelblau. Somit konnten die vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop pro Großquadrat ausgezählt werden. Die verwendete Formel lautete Zellzahl  $[n/\mu l] = Z$  (ausgezählte Zellzahl)  $\times 5$  (Verdünnungsfaktor)  $\times 4 \times 1,25$  (Kammerfaktor). Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit dem Medium zu einer Zellkonzentration von 1 Mio./ml resuspendiert. Zuletzt wurden 0,6 Mio. Zellen in eine Zellkulturflasche mit einem Gesamtvolumen von 25 ml Medium suspendiert. In Anlehnung an die Kulturbedingungen der im Vergleich eingesetzten primären humanen meningealen Zellen (*Human Meningeal Cells*, HMC) wurden Ben-Men-1-Zellen in einigen Versuchsreihen zusätzlich in dem dafür vorgesehenen Zellkulturmedium kultiviert (s. 3.2.1.2 und Abb. 4).

### 3.2.1.2 Primäre humane meningeale Zellen

Die HMC wurden von der Firma ScienCell bezogen und stellen aus der humanen Leptomeninx isolierte Zellen dar. Sie weisen den Zellmarker Fibronectin (FN) auf (vgl. Herstellerangaben, <https://www.sciencellonline.com/human-meningeal-cells.html>). Laut Herstellerangaben sind die Zellen nur für bis zu 15 Populationsverdopplungen experimentell verwendbar, sodass für die Durchführung unserer Versuchsreihen drei verschiedene Lot-Nummern (entsprechend drei unterschiedlichen Spendern) notwendig waren. Das verwendete Kulturmedium setzte sich aus *Meningeal Cell Medium* (MCM), 2 % FBS, 1 % *Meningeal Cell Growth Supplement* (MGCS) und 1 % P/S zusammen. Entsprechend der Vorgaben des Herstellers wurden zur Förderung der Zelladhärenz vor Subkultivierung alle zu verwendenden 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 10 ml Endotoxin-freiem Wasser und 2 µg/cm<sup>2</sup> Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet und mindestens 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Vor Verwendung wurden die Flaschen jeweils zweimal mit Endotoxin-freiem Wasser gewaschen und anschließend mit 15 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Nach Erhalt wurden die kryokonservierten Zellen aufgetaut, in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach mindestens 16 Stunden wurde das Medium ohne Subkultivierung ausgetauscht. Folgend wurde das Medium alle 3 Tage ab Erreichen einer 70 %igen Konfluenz alle 2 Tage gewechselt. Wenn der Zellrasen 90-95 % der Fläche des Flaschenbodens bedeckte, wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen nach Verwerfen des Überstands mit

PBS gewaschen, in 10 ml 0,025 %ige T/E-Lösung resuspendiert und im Brutschrank inkubiert. In minütlichen Abständen wurde die Erscheinungsform der Zellen lichtmikroskopisch überprüft. Fanden sich dabei überwiegend rundliche, nicht adhärente Zellen, wurde die entsprechende Zellsuspension in ein mit 5 ml FBS gefülltes 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Die Zellkulturflasche mit den verbliebenen adhären Zellen wurde nun ohne Flüssigkeit für wiederum 1 Minute inkubiert, anschließend vorsichtig seitlich beklopft und abermals unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Mit dieser Vorgehensweise konnte ein residueller Zellbestand von weniger als 5 % am Boden der Zellkulturflasche erreicht werden. In der Folge wurde die Zellkulturflasche zweimal mit 5 ml TNS-Lösung gespült; diese Flüssigkeiten wurden ebenfalls in das oben genannte 50 ml-FBS-Falcon-Röhrchen hinzugefügt. Dann wurde das Falcon-Röhrchen nach Zellzahlbestimmung (genaue Ausführung s. 3.2.1.1) bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und durch Zugabe von Medium eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml hergestellt. Zuletzt wurden 0,5-2 Mio. Zellen in 15 ml Gesamtvolumen in eine neue Zellkulturflasche transferiert.

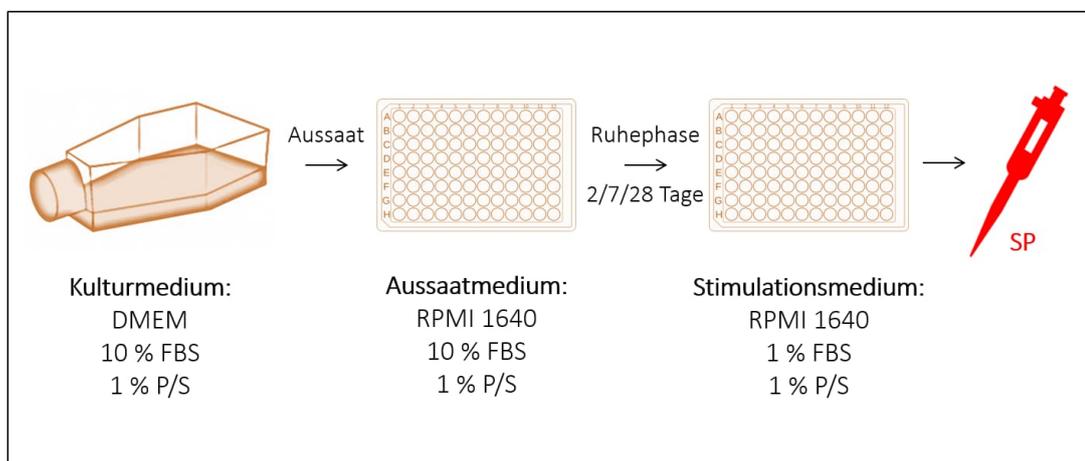
### 3.2.1.3 Monozyten-Zelllinie THP-1

Makrophagen sind zentrale Wächterzellen, die aufgrund der Expression diverser PRRs zur PAMP-Erkennung und folglich Induktion einer Immunantwort bei ZNS-Infektionen beitragen können. Die etablierte THP-1-Zelllinie (*Tohoku Hospital Pediatrics-1*) wurde zu diesem Zweck aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit primären Makrophagen und Monozyten in einem Kokultursystem mit Ben-Men-1-Zellen oder alternativ mit HMC eingesetzt (Chanput et al. 2014). Die Zelllinie wurde von der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) bezogen. Die Kultivierung der THP-1-Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit Subkultivierung im Abstand von 3-4 Tagen. Das verwendete Zellkulturmedium bestand aus *Roswell Park Memorial Institute-Medium 1640* (RPMI 1640), 10 % FBS sowie 1 % P/S. Im Gegensatz zu Ben-Men-1-Zellen und HMC stellt die THP-1-Zelllinie eine Suspensionskultur dar. Zur Subkultivierung konnte die Zellzahlbestimmung (genaue Ausführung s. 3.2.1.1) direkt aus dem in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen transferierten Flascheninhalt vorgenommen und anschließend die Zentrifugation mit 150 xg Relative Fliehkraft (rcf) für 5 Minuten durchgeführt werden. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden 12,5 Mio. Zellen in 25 ml Medium pro Zellkulturflasche gegeben. Vor Verwendung der THP-1-Zellen im Kokultursystem wurden diese mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA; 1 µg/ml für 24 Stunden) behandelt. Dadurch wurde eine Differenzierung zu M0-Makrophagen erreicht (Chanput et al. 2014); die Zellen adhären an Zellkulturoberflächen und ähneln von Monozyten abgeleiteten Makrophagen (Daigneault et al. 2010). Nach 24-stündiger PMA-Exposition wurde das Zellkulturmedium durch PMA-freies ersetzt; hierin wurden die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert.

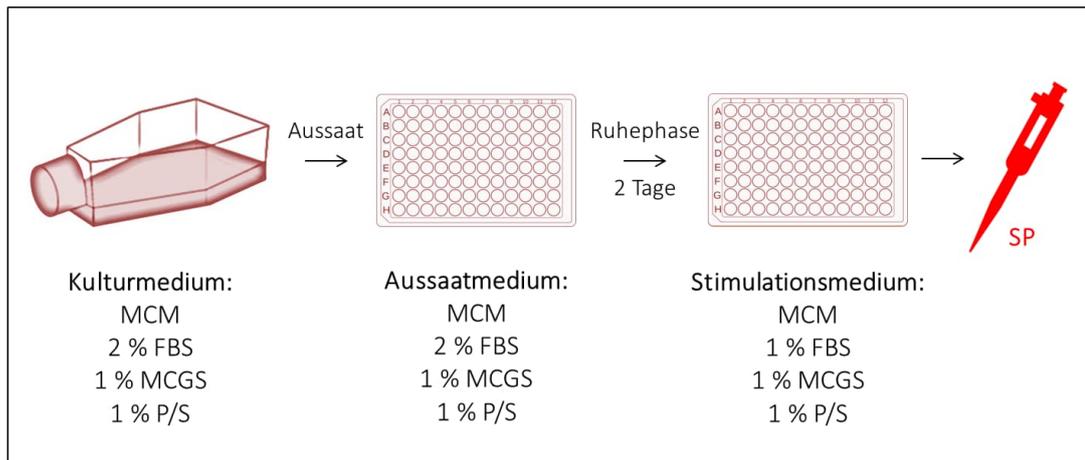
## 3.2.1.4 Stimulationsversuche mit Pneumokokken

## 3.2.1.4.1 Zellaussaat und Stimulationsmedien

Alle Stimulationsversuche wurden in 96-Well-Platten durchgeführt. Die Ben-Men-1-Zellen bzw. HMC wurden durch Trypsinisierung abgelöst (s. 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2), in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen transferiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Aussaatmedium zu einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml resuspendiert. Das Aussaatmedium bestand bei den Ben-Men-1-Zellen aus RPMI 1640 mit 10 % FBS und 1 % P/S (Abb. 3). Das RPMI 1640-Medium wurde als Aussaat-/Stimulationsmedium verwendet, da Ben-Men-1-Zellen in diesem Grundmedium eine vergleichbare Morphologie und Wachstumsrate wie im DMEM zeigten und RPMI 1640 überdies als Grundmedium für die Kokulturrexperimente mit THP-1-Makrophagen vorgesehen war. Das Aussaatmedium der HMC setzte sich aus MCM, 2 % FBS, 1 % MCGS und 1 % P/S zusammen (Abb. 4). In eine 96-Well-Platte wurden Ben-Men-1-Zellen bzw. HMC mit einer Zellzahl von 50000/Well bzw. 25000/Well in 200 µl Medium gegeben. Anschließend wurden die Ben-Men-1-Zellen für 2, 7 und 28 Tage kultiviert (Abb. 3). Bei 28-tägiger Kultivierungszeit wurde das Zellkulturmedium in wöchentlichen Abständen und durch frisches ersetzt. Die HMC wurden für 2 Tage kultiviert (Abb. 4). Dann wurden die Wells nach Abnahme des Aussaatmediums mit dem jeweiligen Stimulationsmedium gefüllt. Das Stimulationsmedium der Ben-Men-1-Stimulationsversuche setzte sich aus RPMI 1640, 1 % FBS und 1 % P/S zusammen (Abb. 3). Das Stimulationsmedium der HMC-Stimulationsversuche bestand aus MCM mit 1 % FBS, 1 % MCGS und 1 % P/S (Abb. 4).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Aussaat der Ben-Men-1-Zellen und der primär verwendeten Medien bei Stimulationsversuchen mit *S. pneumoniae*.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aussaat der HMC und der primär verwendeten Medien bei Stimulationsversuchen mit *S. pneumoniae*.**

Um einen möglichen Einfluss des Zellkulturmediums auf die Reaktivität der Ben-Men-1-Zellen zu erfassen, wurde in zusätzlichen Versuchsreihen das RPMI 1640-Grundmedium durch DMEM, MCM oder humanes CSF ersetzt; bei den HMC wurde anstelle des üblichen MCM-Mediums in ergänzenden Analysen humanes CSF verwendet (Tab. 1). Die humanen CSF-Proben wurden von Patienten mit Normaldruckhydrozephalus oder idiopathischer intrakranieller Hypertension im Rahmen klinisch indizierter Liquorablassversuche gewonnen (Nr. des genehmigten Ethikantrags 523-16).

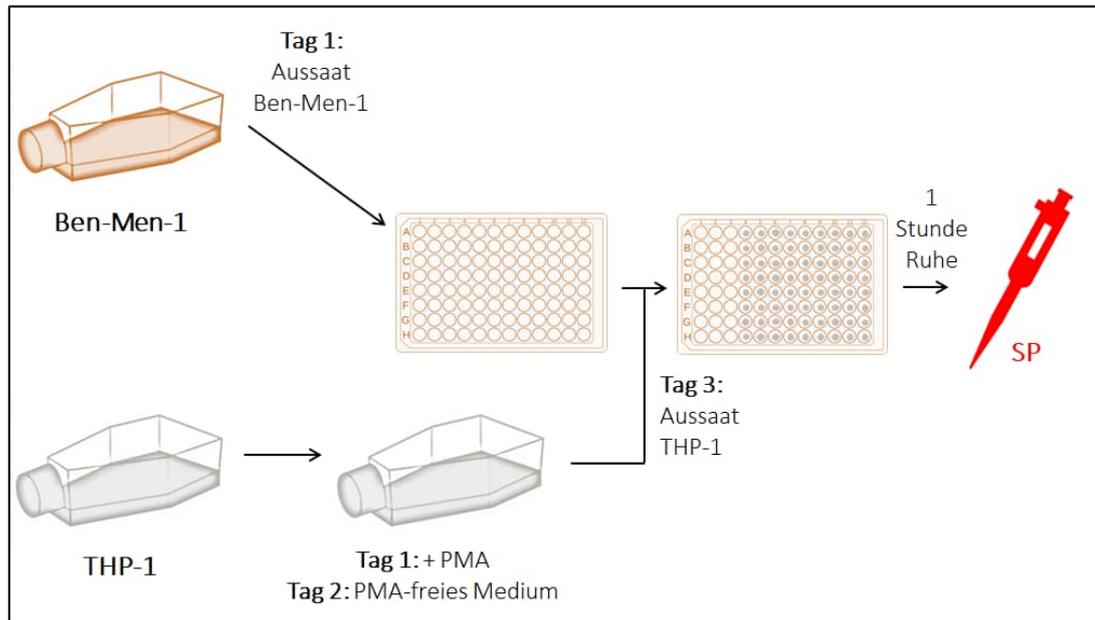
Zellen	Kulturmedium	Aussaatmedium	Stimulationsmedium
<b>Ben-Men-1</b>	DMEM	RPMI 1640	RPMI 1640
	10 % FBS	10 % FBS	1 % FBS
	1 % P/S	1 % P/S	1 % P/S (Abb. 3)
	DMEM	DMEM	DMEM
	10 % FBS	10 % FBS	1 % FBS
	1 % P/S	1 % P/S	1 % P/S (s. 4.4.1)
	MCM	MCM	MCM
	2 % FBS	2 % FBS	1 % FBS,
	1 % MCGS	1 % MCGS	1 % MCGS
	1 % P/S	1 % P/S	1 % P/S
			(s. 4.4.1 und 4.4.2)
	MCM	MCM	CSF (s. 4.4.2)
	2 % FBS	2 % FBS	
	1 % MCGS	1 % MCGS	
	1 % P/S	1 % P/S	
<b>HMC</b>	MCM	MCM	MCM
	2 % FBS	2 % FBS	1 % FBS
	1 % MCGS	1 % MCGS	1 % MCGS
	1 % P/S	1 % P/S	1 % P/S (Abb. 4)

MCM	MCM	CSF (s. 4.4.3)
2 % FBS	2 % FBS	
1 % MCGS	1 % MCGS	
1 % P/S	1 % P/S	

**Tabelle 1: Verwendete Kultur-, Aussaat und Stimulationsmedien.**

### 3.2.1.4.2 Kokultursystem mit THP-1-Zellen

Zur Etablierung eines Kokultursystems wurden die Ben-Men-1-Zellen bzw. HMC in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und für 2 Tage im Brutschrank kultiviert (Abb. 5). Zur Gewinnung der PMA-behandelten, adhärenenten THP-1-Zellen wurden diese in der Zellkulturflasche mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend in 5 ml Accutase-Lösung inkubiert. Nach 10 Minuten wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und mit einer 10 ml-Pipette in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde anschließend mit 5 ml RPMI 1640 bzw. MCM gespült, um die noch verbliebenen Zellen ebenfalls in das Falcon-Röhrchen zu transferieren. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt und jeweils eine Zellzahl von 15625/Well, 62500/Well sowie 250000/Well zu den Ben-Men-1-Zellen bzw. HMC hinzugegeben. Danach wurde die Platte für 1 Stunde inkubiert und schließlich die Stimulation mit *S. pneumoniae* durchgeführt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kokultursystems mit meningealen Zellen (hier Ben-Men-1) und THP-1-Zellen bei Stimulationsversuchen mit *S. pneumoniae*.**

### 3.2.1.4.3 Stimulationsdurchführung

Für die Stimulationsversuche wurden tiefgefrorene Pneumokokken-Suspensionen mit definierten Keimkonzentrationen verwendet (s. 3.2.1.4.4.). Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Pneumokokken mit einer 10 %igen P/S-Lösung abgetötet; durch gleichzeitige Zugabe von PBS wurden die gewünschten Pneumokokken-Konzentrationen eingestellt. Als Kontrolle diente in der Regel das Pneumokokken-Aufzuchtmedium THY, das analog zur Pneumokokken-Suspension mit 10 %iger P/S-Lösung und PBS verdünnt wurde. In ausgewählten Experimenten wurden die Pneumokokken vor ihrer Verwendung im Experiment zweimal mit 950 µl PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert; in diesem Fall wurde PBS als Kontrolle eingesetzt.

Nach der Stimulation wurden die Mikrotiterplatten entweder für 6 oder für 24 Stunden inkubiert. Am Versuchsende wurden in speziell dafür vorgesehene Wells 10 µl einer 1 %igen Triton X100-Lösung gegeben; diese Wells fungierten bei der späteren Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität im Zellkulturüberstand (LDH, s. 3.2.1.5.2) als Positiv-Kontrollen. Im Anschluss wurden die Platten für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, dann wurden 160 µl Überstand abgezogen, in Mikrotiterplatten mit V-Profil überführt und für spätere Zytokinbestimmungen mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA, s. 3.2.1.7) bei -20 °C eingefroren. Überdies wurden 10 µl des Zellkulturüberstands in eine weitere 96 Well-Zellkulturplatte mit geradem Boden für die LDH-Bestimmungen (s. 3.2.1.5.2.) überführt. Im Anschluss daran wurden 10 µl WST-1-Reagenz in die einzelnen Wells der Stimulationsplatte für die Bestimmung der Zellvitalität mithilfe eines kommerziellen WST-1-Zellproliferationsassays gegeben (s. 3.2.1.5.1).

### 3.2.1.4.4 Serotypen

Es wurden folgende Pneumokokken-Serotypen (ST) verwendet:

1. *S. pneumoniae* ST2, D39 (Wildtyp-Stamm)
2. *S. pneumoniae* ST2, D39 ΔPLY (isogener PLY-defizienter Stamm)
3. *S. pneumoniae* ST6B
4. *S. pneumoniae* ST7F

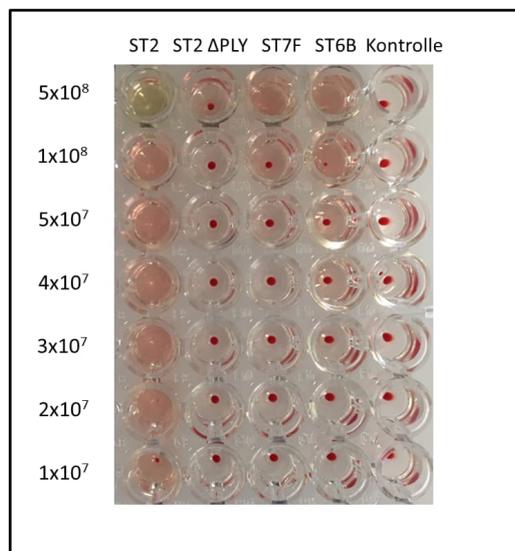
Die *S. pneumoniae*-Stämme wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Sven Hammer-schmidt aus dem Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt.

### 3.2.1.4.5 Hämolyisin-Test

Mit dem sogenannten Hämolyisin-Test sollte geprüft werden, ob die verwendeten Serotypen vergleichbare Mengen an hämolytisch wirksamem PLY exprimierten. Hierzu wurden zunächst Erythrozyten aus Schafblut gewonnen und anschließend bei 2700 rpm zentrifugiert und in 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Zellpellet in 5 ml PBS aufgenommen und anschließend mit Lysepuffer im Verhältnis 1:50 gemischt. Der Lysepuffer bestand aus PBS (pH 7,4), 10 mM Diethiothreitol

(DTT) und 1 % bovinem Serumalbumin (BSA). In einer 96-Well-Platte wurden dann 100  $\mu$ l Lysepuffer pro Well vorgelegt und je nach Zielkonzentration zwischen 5  $\mu$ l und 50  $\mu$ l Pneumokokken-Überstand unter Volumenausgleich mit PBS sowie 50  $\mu$ l Erythrozytengebrauchslösung hinzugegeben. In den Kontrollgruppen wurde PBS in entsprechendem Volumen hinzugefügt. Die Platte wurde schließlich bei 37 °C inkubiert und nach 30 Minuten für weitere 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert.

In den Kontrollgruppen ließen sich kreisrunde, rote Sedimente erkennen. Dasselbe galt für alle Konzentrationen des PLY-defizienten ST2-Stamms sowie die Serotypen 6B und 7F in den Konzentrationen  $1 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  KBE/ml. Lysierte Erythrozyten hingegen waren beim Wildtyp-Stamm (ST2) mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration sowie bei den Serotypen 6B und 7F jeweils in der höchsten Konzentration sichtbar.



**Abbildung 6: Hämolysin-Test zur Ermittlung der PLY-Expression in ST2 D39 (Wildtyp-Stamm), ST2 D39  $\Delta$ PLY (isogener PLY-defizienter Stamm), ST6B und ST7F.** Bei verbleibendem rotem Erythrozytensediment ist von keiner PLY-Aktivität auszugehen, bei fehlendem Erythrozytensediment von ausreichender PLY-Aktivität.

#### 3.2.1.4.6 Inhibitoren

Zur Identifizierung der Mechanismen, die der Aktivierung meningealer Zellen und insbesondere der IL-6-Freisetzung bei einer Pneumokokken-Exposition zugrunde liegen, wurden die Zellen unmittelbar vor Stimulation mit *S. pneumoniae* mit ausgewählten Inhibitoren behandelt. Bei der Erkennung einer Pneumokokken-Infektion durch immunkompetente Zellen wird Rezeptoren der TLR-Familie, wie TLR2, TLR4, TLR9 und TLR 13, eine Schlüsselrolle zugeschrieben (s. 1.2.3). Um einen ersten Einblick zu erhalten, ob diese Rezeptoren an der Detektion von Pneumokokken durch meningeale Zellen mitwirken, wurden die Zellen mit einem TLR-Inhibitor-Cocktail behandelt, der sich aus einem funktionsblockierenden anti-TLR2-Antikörper (25  $\mu$ g/ml), einem TLR4-Antagonisten (5  $\mu$ M) sowie Chloroquin (20  $\mu$ g/ml), das wiederum die Aktivierung endosomaler, Nukleinsäure-detectierender TLR blockieren kann, zusammensetzte (Matsunaga et al. 2011; de

Stoppelaar et al. 2016; Kuznik et al. 2011; Lee et al. 2007). Bei der Aktivierung von Immunzellen im Rahmen einer Pneumokokken-Infektion ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B von herausragender Bedeutung (s. 1.2.4). Um dessen Rolle bei der Pneumokokken-induzierten Aktivierung meningealer Zellen zu erfassen, behandelten wir die Zellen mit Hemmstoffen des NF- $\kappa$ B-Signalwegs sowie negativer und positiver Regulatoren der NF- $\kappa$ B-Aktivität (s. 1.2.4), nämlich [i] den bekannten I $\kappa$ B-Kinase-Inhibitoren BAY 11-7082 (1-10  $\mu$ M) (Lee et al. 2012; Cook et al. 2022; Irrera et al. 2017; Strickson et al. 2013; Mori et al. 2002), PDTC (10  $\mu$ M) (Ishizuka et al. 2016; Lu et al. 2022) und Parthenolid (0,5  $\mu$ M) (Kwok et al. 2001; Sobota et al. 2000; Hehner et al. 1999; Ding et al. 2022), [ii] den CREB-Inhibitoren KG-501 (10  $\mu$ M) (Shao et al. 2020; Best et al. 2004) und 666-15 (1  $\mu$ M) (Xie et al. 2015; Yan et al. 2021) sowie [iii] den BRD4-Inhibitoren I-BET151 (10  $\mu$ M) (Guo et al. 2019; Barrett et al. 2014; Seal et al. 2012) und JQ1 (1  $\mu$ M) (Filippakopoulos et al. 2010; Shi et al. 2018). Um eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Aktivierung meningealer Zellen zu erfassen, wurden Ben-Men-1-Zellen und HMC überdies mit dem selektiven AP-1-Hemmstoff SR 11302 (1  $\mu$ M) (González-Rubio et al. 2016; Huang et al. 1997; Lu et al. 2022) behandelt.

Als Vehikelsubstanz für den TLR4-Antagonisten, für Parthenolid und I-BET151 wurde das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Zur Berücksichtigung eines möglichen DMSO-Effekts wurden jeder Stimulation Kontrollgruppen mit DMSO in 1:500-1:5000-Verdünnung hinzugefügt. Die anderen Hemmstoffe konnten in PBS gelöst werden.

### 3.2.1.5 Photometrische Verfahren zur Bestimmung von Zellvitalität und Zelltod

#### 3.2.1.5.1 WST-1 Zellproliferationsassay

Zur Ermittlung der Zellvitalität wurde ein kommerziell erhältlicher WST-1-Zellproliferations-Assay (*water-soluble tetrazolium 1*) durchgeführt. WST-1 ist ein wasserlösliches Salz, welches durch die mitochondriale Dehydrogenase (Komplex I der mitochondrialen Atmungskette) und somit ausschließlich in lebenden Zellen zum Farbstoff Formazan gespalten wird. Die Menge des gebildeten Formazans korreliert mit der Anzahl der lebenden Zellen und kann kolorimetrisch quantifiziert werden. Hierzu wurden wie unter Punkt 3.2.1.4.3 beschrieben zum in den einzelnen Wells verbliebenen Zellkulturüberstand 10  $\mu$ l WST-Reagenz hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend 1 Stunde lang im Brutschrank inkubiert und nachfolgend die Absorption im Mikroplatten-Reader (Maximum 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen.

#### 3.2.1.5.2 LDH als Zelltodmarker

Das Ausmaß der zytolytischen Wirkung von *S. pneumoniae* wurde durch Bestimmung der Konzentration von LDH im Kulturmedium ermittelt. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, das bei einer Schädigung der Plasmamembran in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden kann und somit mit der Anzahl lytischer Zellen korreliert. Die LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, womit die Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup> einhergeht. NADH wiederum reagiert

mit WST und führt zu einer gelblichen Verfärbung der Probenlösung, die kolorimetrisch mithilfe eines Mikroplatten-Readers bestimmt werden kann.

Als Positiv-Kontrollen wurden mit Triton X100 lysierte Zellen verwendet. Von jedem Well wurden 10 µl Überstand in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert (s. 3.2.1.4.3). Dann wurden 10 µl des LDH-Assay-Buffers mit 200 µl des WST-Substrats gemischt und 100 µl dieser Lösung in jedes Well gegeben. Die Platte wurde anschließend 30 Minuten lang lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und danach im Mikroplatten-Reader (Maximum 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm) ausgewertet. Die LDH-Werte wurden als prozentualer Anteil der Positiv-Kontrollen dargestellt.

### 3.2.1.6 Detektion der Expressionslevel multipler Zytokine mittels Antikörper-Array

Mithilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörper-Arrays wurden die Expressionslevel von 42 Zytokinen und Chemokinen semiquantitativ untersucht. Die Durchführung des Arrays diente als Screening-Test; nachfolgend wurden die Ergebnisse für einzelne Zytokine mittels ELISA bestätigt (s. 3.2.1.7). Bei diesen Arrays sind sogenannte „Capture“-Antikörper für ausgewählte Zytokine und Chemokine (sowie zusätzlich jeweils Positiv- und Negativ-Kontrollen) in doppelter Ausführung auf Nitrozellulosemembranen aufgetragen. Für die Analysen wurden jeweils vier Membranen verwendet. Die freien Bindungsstellen dieser Membrane wurden zunächst durch Verwendung eines Blockpuffers blockiert (Inkubation für 30 Minuten bei RT). Im Anschluss wurden eine sogenannte Kontrollmembran mit Stimulationsmedium (1 ml DMEM, 1 % FBS, 1 % P/S bzw. 1 ml MCM, 2 % FBS, 1 % MCGS, 1 % P/S) und die restlichen drei Membranen mit gepoolten Probenüberständen folgender Versuchsgruppen inkubiert (über Nacht bei 4 °C): [i] unstimulierte Kontrollzellen, [ii] mit Wildtyp-Pneumokokken stimulierte Zellen und [iii] mit PLY-defizienten Pneumokokken stimulierte Zellen. Am nächsten Tag wurden die Membranen fünfmal mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit einem sogenannten „Detection“-Antikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Membranen mit 2 ml einer Meerrettichperoxidase-Lösung überschichtet. Nach 2 Stunden bei RT wurden die Membranen erneut gewaschen und mit dem Kit-eigenen Chemilumineszenz-Substrat inkubiert: dieses erzeugt ein Lichtsignal, das zur Menge der gebundenen Antikörper-Komplexe proportional ist. Die so erzeugten Lichtsignale wurden mit einem Chemilumineszenz-Imaging-System aufgezeichnet und densitometrisch mithilfe des Software-Programms ImageJ ausgewertet. Aus den beiden Messwerten eines Zytokins/Chemokins wurden Mittelwerte gebildet, die Prozentwerte der Negativ-Kontrolle subtrahiert und diese Werte als Prozentwerte der Positiv-Kontrolle dargestellt.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	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-1F1)	IL-1beta (IL-1F2)
2												
3	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
4												
5	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 delta	RANTES (CCL5)	CSF	SDF-1	TARC (CCL17)	TGF beta 1
6												
7	TNF alpha	TNF beta	EGF	IGF-1	Angio- genin	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF- BB	Leptin	NEG	POS
8												

**Abbildung 7: Anordnung der Proteine auf der Arraymembran**, s. <https://doc.raybiotech.com/pdf/Manual/AAH-CYT-3.pdf>.

### 3.2.1.7 Messung der Entzündungsmarker IL-6, -1 $\beta$ und -8 mittels ELISA

Die Konzentrationen von humanem IL-6, CXCL8 und IL-1 $\beta$  in den Zellkulturüberständen wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits gemessen. Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit Capture-Antikörper (100  $\mu$ l/Well) beschichtet und für 24 Stunden bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit einem speziellen Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit einem Probenverdünnungspuffer (300  $\mu$ l/Well) blockiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die zu untersuchenden Proben (jeweils 100  $\mu$ l/Well) in die Platte pipettiert. Des Weiteren wurde entsprechend der Herstellerangaben eine Eichkurve erstellt. Die Mikrotiterplatten wurden danach 2 Stunden lang bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde der sogenannte „Detection“-Antikörper (200  $\mu$ l/Well) in die Wells gegeben. Nach 2 Stunden und einem weiteren Waschvorgang wurden die Wells für 20 Minuten mit 100  $\mu$ l einer Meerrettichperoxidase-Lösung unter Lichtschutz inkubiert. Die Platte wurde daraufhin wiederum dreimal gewaschen. Im Anschluss wurde jedes Well mit 100  $\mu$ l Farbreagenz-Lösung befüllt. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtschutz wurde die Farbreaktion durch Zugabe einer sogenannten Stopplösung (50  $\mu$ l/Well) beendet und die Adsorption im Mikroplatten-Reader (Maximum 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Anhand der Eichkurve konnte schließlich die Proteinkonzentration für jedes Well berechnet werden.

### 3.2.1.8 PCR-Analyse

Die Ben-Men-1-Zellen und HMC (Lot-Nr. 11017, 19218) wurden nach Kultivierung in unterschiedlichen Zellkulturmedien zentrifugiert, bei  $-80$  °C eingefroren und später die RNA mittels RNA Mini Kit isoliert (s. Herstellerangaben). Die PCR wurde unter Verwendung des iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis-Kits mit dem Real-Time rapid PCR qTower und PrimePCR™ PCR-Primern unter anderem für TLR2, TLR4, TLR8, FN und PDGFR- $\alpha$  gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen. Die Normalexpression wurde anschließend in Relation zur Expression des „housekeeping gene“ GAPDH berechnet.

FN und PDGFR- $\alpha$  stellen zwar gängige Marker zur Charakterisierung von Fibroblasten dar, werden aber weder von allen noch ausschließlich von Fibroblasten exprimiert (Xu et al. 2021; Kalluri et al. 2006).

### **3.2.2 Statistische Analyse**

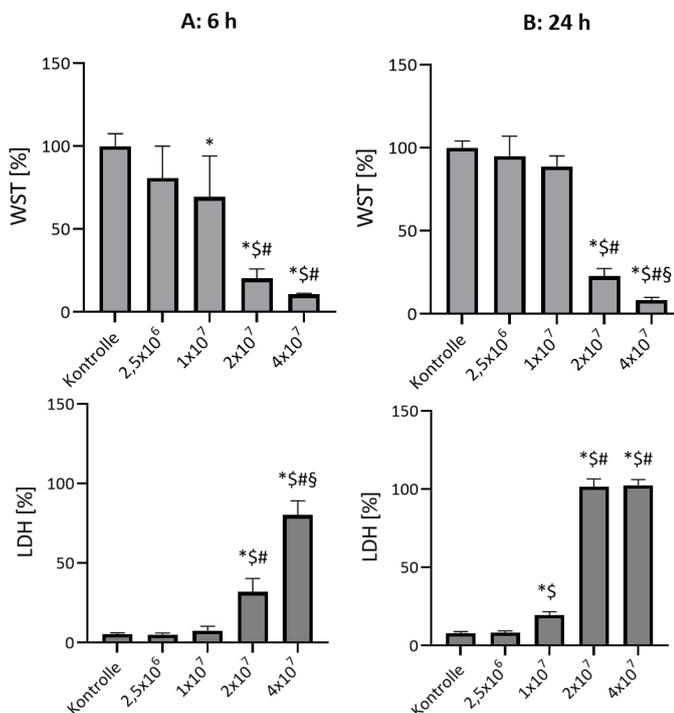
Statistische Signifikanzen wurden mittels einseitiger Varianzanalyse (*Analysis of variance*, ANOVA) und Tukey Post-hoc-Test ermittelt. Dabei wurde das Programm GraphPad Prism 9 verwendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Falls nicht anders angegeben, sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) abgebildet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur Reaktion der meningealen Zelllinie Ben-Men-1 sowie primärer meningealer Zellen auf eine Exposition mit Pneumokokken

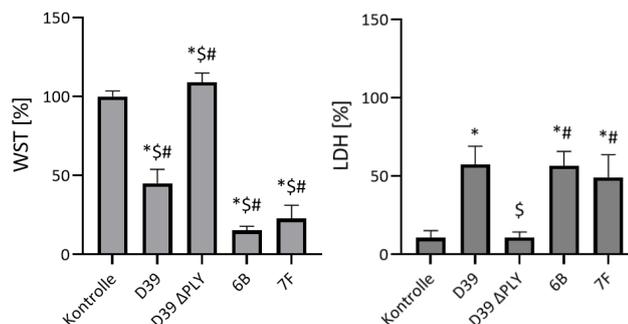
#### 4.1.1 Pneumokokken wirken zytotoxisch auf Ben-Men-1-Zellen

Bei einer Stimulation mit aufsteigenden Pneumokokken-Konzentrationen nahm mit zunehmender Bakterienlast die Zellvitalität (die mithilfe eines WST-Kits bestimmt wurde) ab und der lytische Zelluntergang (der mithilfe eines LDH-Assays gemessen wurde) zu. Der deutlichste Effekt war für die beiden hohen Pneumokokken-Konzentrationen zu beobachten, die sich signifikant von der Kontrollgruppe sowie den beiden niedrigen Konzentrationen unterschieden (Abb. 8). Beispielsweise bewirkte bei einer Versuchsdauer von 6 Stunden die höchste Pneumokokken-Konzentration von  $4 \times 10^7$  KBE/ml eine Reduktion des WST-Umsatzes um 89 Prozentpunkte, während gleichzeitig die LDH-Werte auf  $80 \% \pm 9 \%$  (Abb. 8A) der Positiv-Kontrolle anstiegen. Vergleicht man die Werte, die bei einer Versuchsdauer von 6 Stunden gemessen wurden, mit denen bei einer Versuchsdauer von 24 Stunden, so stellt man Folgendes fest: die LDH-Konzentrationen im Zellkulturüberstand lagen für alle Bakterienkonzentrationen bei einer Versuchsdauer von 24 Stunden signifikant über den 6-Stunden-Werten. Im Gegensatz dazu fanden sich beim WST-Umsatz keine von der Versuchsdauer abhängigen, signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 8: Zellvitalität und lytischer Zelltod von Ben-Men-1-Zellen.** Die Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen 6 Stunden (A) bzw. 24 Stunden (B) mit  $2,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  sowie  $4 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* ST2 (Wildtyp-Stamm) stimuliert (n = 6 in jeder Gruppe). \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle; \$ p < 0,05, im Vergleich zu  $2,5 \times 10^6$ , # p < 0,05, im Vergleich zu  $1 \times 10^7$ , § p < 0,05, im Vergleich zu  $2 \times 10^7$ .

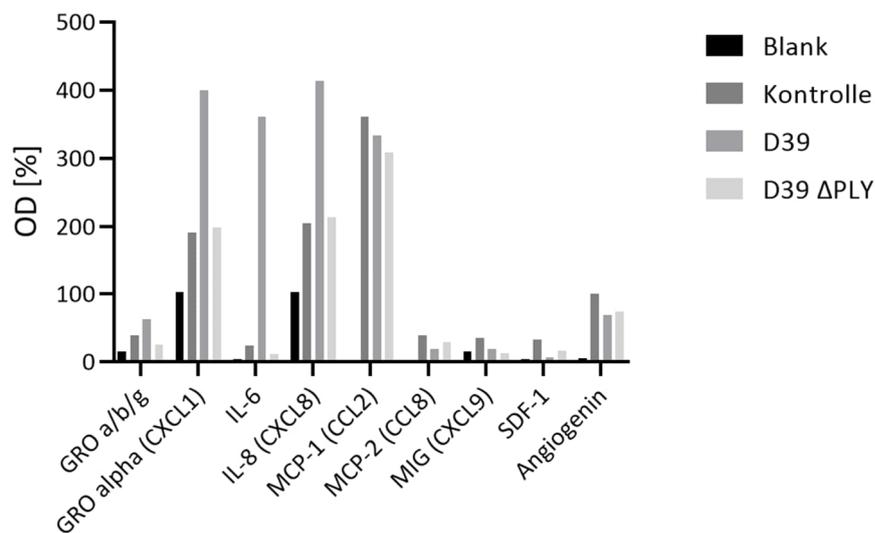
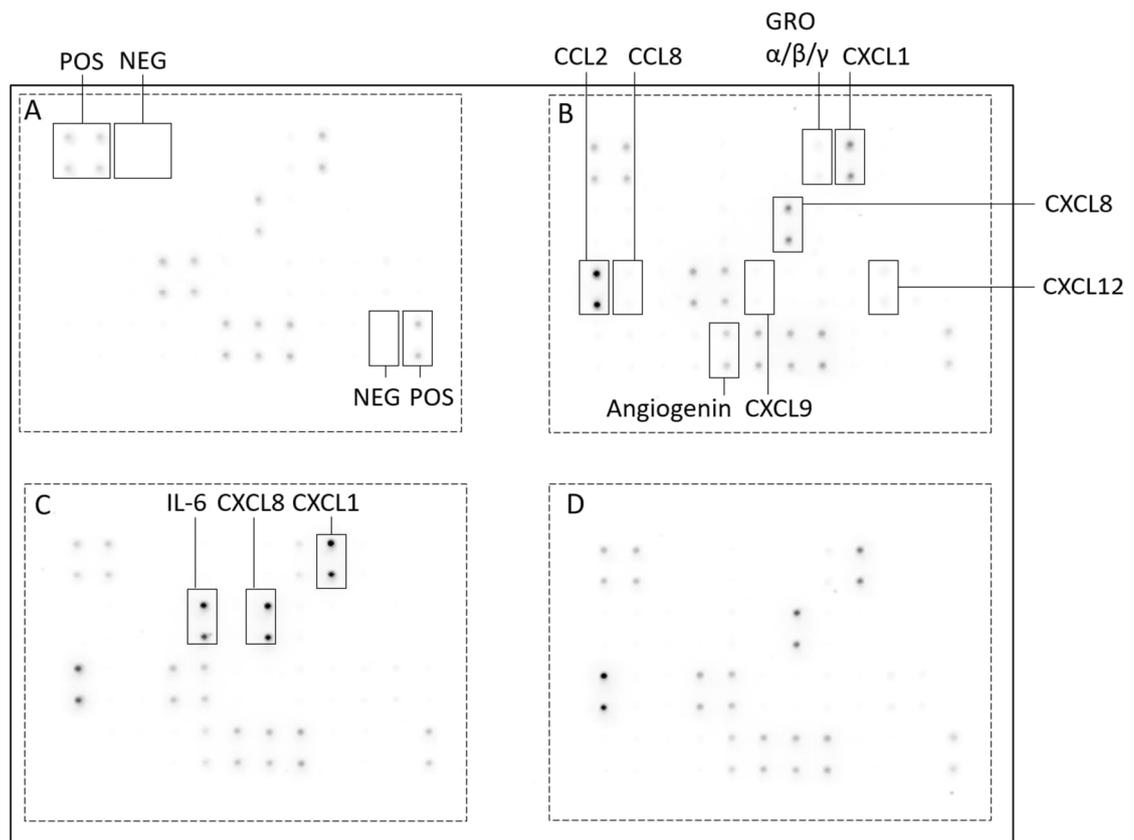
Die Stimulation mit *S. pneumoniae* führte unabhängig vom Serotyp (ST2, ST6B, ST7) zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität (WST-Umsatz) und dazu passend einer Zunahme des lytischen Zelltodes (LDH-Freisetzung; Abb. 9). Die zytotoxische Wirkung von *S. pneumoniae* auf Ben-Men-1-Zellen scheint vorwiegend durch das Toxin PLY vermittelt zu werden, da sich nach einer Stimulation mit einer PLY-defizienten, isogenen Mutante von ST2 im Gegensatz zum ST2-Wildtyp-Stamm weder ein verminderter WST-Umsatz noch eine erhöhte LDH-Freisetzung fanden.



**Abbildung 9: Die zytotoxische Wirkung von *S. pneumoniae* auf Ben-Men-1-Zellen wird durch das bakterielle Toxin PLY verursacht.** Die Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 28 Tagen 24 Stunden mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert. D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm ( $n_{\text{WST}} = 18$ ,  $n_{\text{LDH}} = 9$ ). D39  $\Delta$ PLY = *S. pneumoniae* ST2, isogener PLY-defizienter Stamm ( $n_{\text{WST}} = 18$ ,  $n_{\text{LDH}} = 9$ ). 6B = *S. pneumoniae* ST6B ( $n = 6$ ). 7F = *S. pneumoniae* ST7F ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$ , im Vergleich zur Kontrolle ( $n_{\text{WST}} = 36$ ,  $n_{\text{LDH}} = 15$ ); \$  $p < 0,05$ , im Vergleich zu D39, #  $p < 0,05$ , im Vergleich zu D39  $\Delta$ PLY.

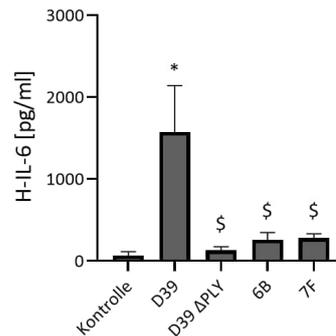
#### 4.1.2 Ben-Men-1-Zellen setzen bei Kontakt mit Pneumokokken Zytokine frei

Um einen ersten Einblick zu bekommen, ob Ben-Men-1-Zellen auf eine Pneumokokken-Exposition mit einer Zytokin-Freisetzung reagieren können, führten wir Antikörper-Array-Analysen von Zellkulturüberständen durch, die von Kontrollzellen und Zellen, die entweder mit D39 oder D39  $\Delta$ PLY stimuliert wurden, gewonnen worden waren. Im Zellkulturüberstand von Kontrollzellen waren folgende acht Faktoren nachweisbar: GRO  $\alpha/\beta/\gamma$ , CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL8, CXCL9, CXCL12 (SDF-1) und Angiogenin. Nach einer Exposition mit *S. pneumoniae* D39 wurde eine Induktion von IL-6 sowie eine Hochregulierung von CXCL1 und CXCL8 beobachtet; die Expressionslevel von CCL8, CXCL9 und CXCL12 waren reduziert, während diejenigen von GRO  $\alpha/\beta/\gamma$ , CCL2 und Angiogenin unverändert blieben. Die vermehrte Produktion der oben genannten Zytokine war abhängig von der Anwesenheit von aktivem PLY, da deren Expressionsmuster nach einer Exposition mit PLY-defizienten Pneumokokken dem von unstimulierten Kontrollzellen gleich.



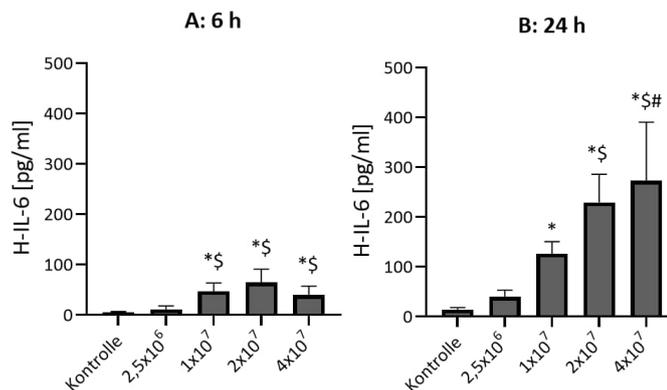
**Abbildung 10: Eine Exposition mit Pneumokokken führt zur vermehrten Freisetzung selektiver Zytokine aus Ben-Men-1-Zellen.** Invertierte Proteinarray-Membranen (oben): **A** = Blank (Zellkulturmedium ohne Zellen: DMEM, 1 % FBS, 1 % P/S). **B** = Kontrolle. **C** =  $4 \times 10^7$  KBE/ml D39 (*S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm). **D** =  $4 \times 10^7$  KBE/ml D39  $\Delta$ PLY (*S. pneumoniae* ST2, isogener PLY-defizienter Stamm). POS = Positiv-Kontrolle, NEG = Negativ-Kontrolle. Die Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 28 Tagen 24 Stunden mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert; anschließend wurden die Überstände der Einzelversuche gepoolt (Anzahl der Einzelversuche:  $n = 18$  in jeder Gruppe). Die Daten sind als Prozentwert der Signalintensität des jeweiligen Faktors im Verhältnis zum Mittelwert der Positiv-Kontrollen angegeben. Als signifikant wurde eine im Vergleich zur Blank- sowie Kontrollmembran mindestens zweifache Veränderung angesehen.

Zur Überprüfung der Array-Befunde wurden die Konzentrationen des Zytokins IL-6 in für den Antikörper-Array verwendeten Überständen mittels ELISA bestimmt (Abb. 11). Analog zu den Array-Analysen fand sich bei den ELISA-Untersuchungen eine deutliche Erhöhung der IL-6-Spiegel in den Kulturüberständen von Ben-Men-1-Zellen, die mit *S. pneumoniae* D39 stimuliert worden waren, und zwar sowohl im Vergleich zu Kontrollzellen als auch zu Zellen, die PLY-defizienten Pneumokokken ausgesetzt worden waren. Zu unserer Überraschung kam es nach einer Stimulation mit den Serotypen 6B und 7F zu keiner vermehrten IL-6-Produktion. Folglich scheint die Zytokinantwort von Ben-Men-1-Zellen auf eine *S. pneumoniae*-Exposition sowohl von PLY als auch vom Serotyp abhängig zu sein.



**Abbildung 11: Ben-Men-1-Zellen produzieren Serotyp- und PLY-abhängig unterschiedliche Mengen an IL-6.** Die Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 28 Tagen 24 Stunden mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert. D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm (n = 9). D39  $\Delta$ PLY = *S. pneumoniae* ST2, isogener PLY-defizienter Stamm (n = 9). 6B = *S. pneumoniae* ST6B (n = 6). 7F = *S. pneumoniae* ST7F (n = 6). \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle (n = 15); \$ p < 0,05, im Vergleich zu D39.

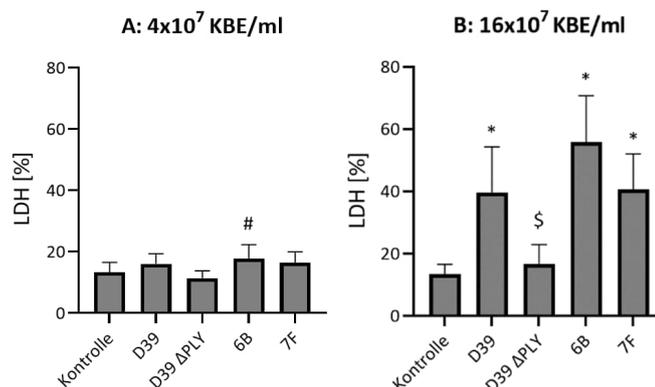
In Folgeuntersuchungen analysierten wir die Pneumokokken-induzierte IL-6-Expression von Ben-Men-1-Zellen in Abhängigkeit von der bakteriellen Konzentration und der Stimulationsdauer. Bei einer Stimulationsdauer von 6 Stunden wurde ab einer Pneumokokken-Konzentration von  $1 \times 10^7$  KBE/ml eine zur Kontrolle signifikant erhöhte IL-6-Produktion (von  $47 \pm 16$  pg/ml) gemessen. Es fanden sich keine Unterschiede in der freigesetzten IL-6-Menge nach Stimulation mit  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  und  $4 \times 10^7$  KBE/ml *S. pneumoniae* (Abb. 12A). Im Gegensatz hierzu wurde nach 24-stündiger Stimulation eine von der bakteriellen Konzentration abhängige Zunahme der IL-6-Freisetzung beobachtet (Abb. 12B). Die gemessenen IL-6-Konzentrationen waren bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden höher als bei 6-stündiger Stimulation (p < 0,05, Signifikanzanalyse graphisch nicht dargestellt).



**Abbildung 12: Die IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen nimmt mit der Bakterienkonzentration und der Stimulationsdauer zu.** Die Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen 6 Stunden (A) bzw. 24 Stunden (B) mit P/S-lysierten *S. pneumoniae* in den Konzentrationen von 2,5x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>7</sup>, 2x10<sup>7</sup> sowie 4x10<sup>7</sup> KBE/ml D39 (*S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm) stimuliert (n = 6). \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle (n = 5); \$ p < 0,05, im Vergleich zu 2,5x10<sup>6</sup>, # p < 0,05, im Vergleich zu 1x10<sup>7</sup>.

#### 4.1.3 Nur hohe Pneumokokken-Konzentrationen wirken auf primäre humane meningeale Zellen zytotoxisch

Im Gegensatz zu Ben-Men-1-Zellen konnte bei HMC nach einer Stimulation mit Pneumokokken in den Konzentrationen von 2x10<sup>7</sup> und 4x10<sup>7</sup> KBE/ml kein signifikanter Anstieg der LDH-Konzentrationen im Zellkulturüberstand im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 13A), und zwar unabhängig vom verwendeten Pneumokokken-Serotyp. Erst bei sehr hohen bakteriellen Konzentrationen (von 16x10<sup>7</sup> KBE/ml) zeigte sich bei einer Stimulation mit den PLY-exprimierenden Serotypen 2 (D39), 6B und 7F eine signifikante LDH-Freisetzung (Abb. 13B). Einzig die PLY-defiziente isogene Mutante D39 ΔPLY induzierte im Vergleich mit der Kontrolle keinen signifikanten Zelluntergang.

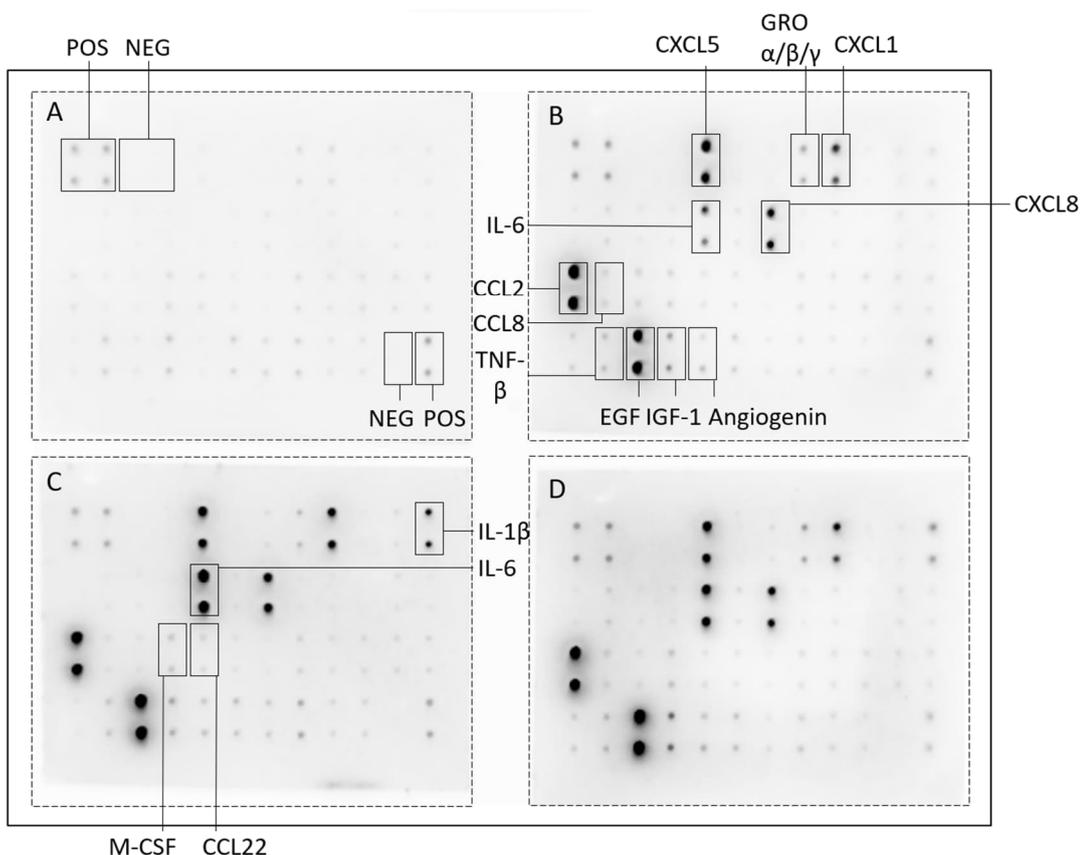


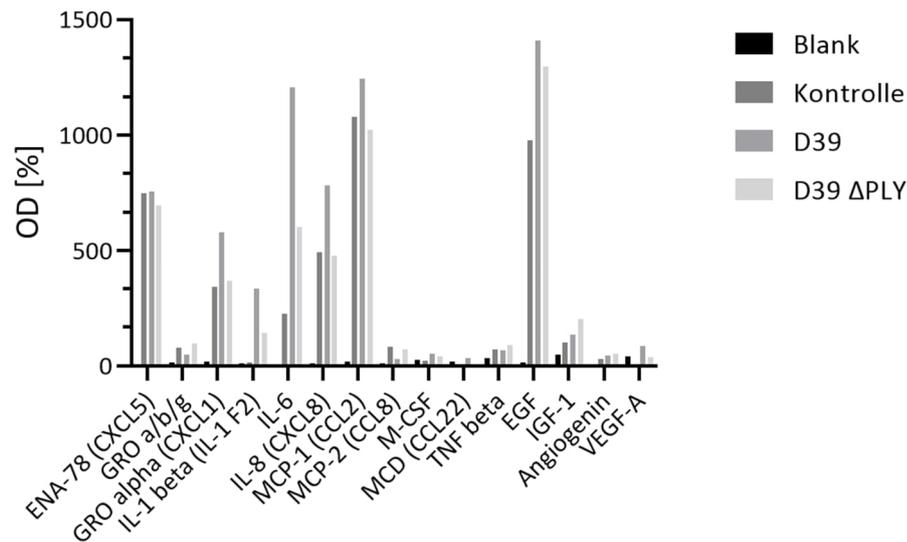
**Abbildung 13: Sehr hohe Pneumokokken-Konzentrationen induzieren PLY-abhängig, aber Serotyp-unabhängig einen lytischen Zelluntergang von HMC.** Die HMC (Lot-Nr. 11017) wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 24 Stunden mit 4x10<sup>7</sup> (A) bzw. 16x10<sup>7</sup> (B) KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert. D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm (n = 8). D39 ΔPLY = *S. pneumoniae* ST2, isogener PLY-defizienter Stamm (n = 8). 6B = *S. pneumoniae* ST6B (n = 5). 7F = *S. pneumoniae*

ST7F (n = 5). \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle (n = 8); \$ p < 0,05, im Vergleich zu D39, # p < 0,05, im Vergleich zu D39 ΔPLY.

#### 4.1.4 Pneumokokken bewirken eine Freisetzung selektiver Zytokine aus primären humanen meningealen Zellen

Analog zur Ben-Men-1-Zelllinie wurde mithilfe eines Antikörper-Arrays die Expression von 42 Zytokinen nach einer Stimulation mit Pneumokokken (und zwar mit dem ST2 D39-Wildtyp-Stamm und dessen isogenen, PLY-defizienten Mutante ST2 D39 ΔPLY) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen gescreent. Unter Kontrollbedingungen setzten HMC folgende elf Faktoren konstitutiv frei: CXCL5, GRO α/β/γ, CXCL1, IL-6, CXCL8, CCL2, CCL8, TNF-β, EGF, IGF-1 und Angiogenin. Nach einer Stimulation mit dem Wildtyp-Stamm konnte eine mehr als fünffach erhöhte Expression von IL-6 im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen beobachtet werden, während der PLY-defiziente Stamm nur eine ca. zweifach erhöhte IL-6-Expression bewirkte. Zudem wurde in Folge der Pneumokokken-Exposition die Produktion von IL-1β, M-CSF und CCL22 induziert (die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der beiden letztgenannten Faktoren sind mit Vorsicht zu betrachten, da deren Expressionslevel im Bereich der Nachweisgrenze liegen), während CCL8 niederreguliert wurde und sich die Expressionslevel von CXCL5, GRO α/β/γ, CXCL1, CXCL8, CCL2, TNF-β, EGF, IGF-1 und Angiogenin im Vergleich zu Kontrollzellen nicht veränderten.



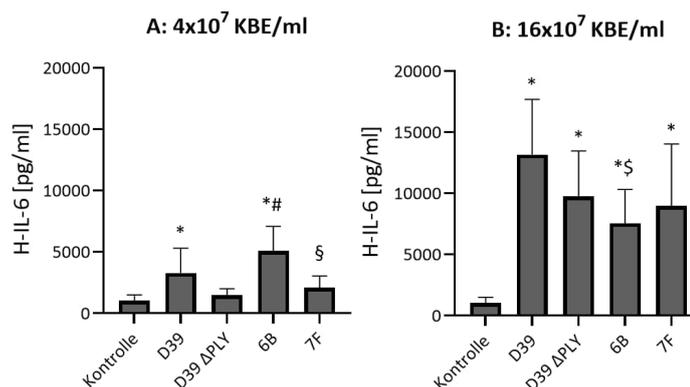


**Abbildung 14: Pneumokokken lösen in HMC eine Induktion bzw. Hochregulierung einzelner Zytokine aus.** Invertierte Proteinarray-Membranen (oben): **A** = Blank (Zellkulturmedium ohne Zellen: MCM, 2 % FBS, 1 % MCGS, 1 % P/S). **B** = Kontrolle. **C** =  $16 \times 10^7$  KBE/ml D39 (*S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm). **D** =  $16 \times 10^7$  KBE/ml D39  $\Delta$ PLY (*S. pneumoniae* ST2, isogener PLY-defizienter Stamm). POS = Positiv-Kontrolle, NEG = Negativ-Kontrolle. Die HMC (Lot-Nr. 11017) wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 24 Stunden mit  $16 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert ( $n = 9$  in jeder Gruppe). Die Balken geben das Verhältnis (in %) der jeweiligen Signalintensität des Faktors zur mittleren Signalintensität der Positiv-Kontrollen wieder. Bei mindestens um den Faktor 2 veränderter Signalintensität im Vergleich zur Blank- bzw. Kontrollmembran wurde eine signifikante Veränderung konstatiert.

Zur Bestätigung der Array-Befunde wurden ergänzend die IL-6-Konzentrationen mittels ELISA quantifiziert. Hierbei fand sich nach Stimulation mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml des Wildtyp-Stamms ST2 D39 (sowie des Serotyps 6B), nicht jedoch der isogenen PLY-defizienten ST2-Mutante D39  $\Delta$ PLY (sowie des Serotyps ST7F) eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte IL-6-Produktion (Abb. 15A). Interessanterweise wurde bei höheren bakteriellen Konzentrationen (von  $16 \times 10^7$  KBE/ml) bei allen Serotypen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen beobachtet; allerdings unterschied sich hier nunmehr der Serotyp 6B signifikant zum Wildtyp-Stamm, was vermutlich auf dessen höhere zytotoxische Wirkung zurückzuführen ist (Abb. 15B). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Pneumokokken-induzierte IL-6-Produktion bei sehr hohen bakteriellen Konzentrationen nicht mehr von der Präsenz von PLY abhängig zu sein scheint.

In diesem Kontext muss erwähnt werden, dass unabhängig vom Donor (der Lot-Nr.) alle HMC-Präparationen auf eine Exposition mit *S. pneumoniae* hin aktiviert wurden, der Grad der Aktivierung jedoch erhebliche Donor-abhängige Unterschiede zeigte. Diese Heterogenität könnte auf interindividuellen Differenzen im zellulären Phänotyp beruhen.

Vergleicht man das Expressionsmuster stimulierter HMC mit dem der Ben-Men-1-Zelllinie, ist Folgendes festzustellen: beide Zelltypen reagieren auf die Pneumokokken-Exposition mit einer starken Induktion bzw. Hochregulation der IL-6-Produktion. Im Gegensatz zu den HMC findet sich bei Ben-Men-1-Zellen zusätzlich eine erhöhte Freisetzung von CXCL1 und CXCL8.

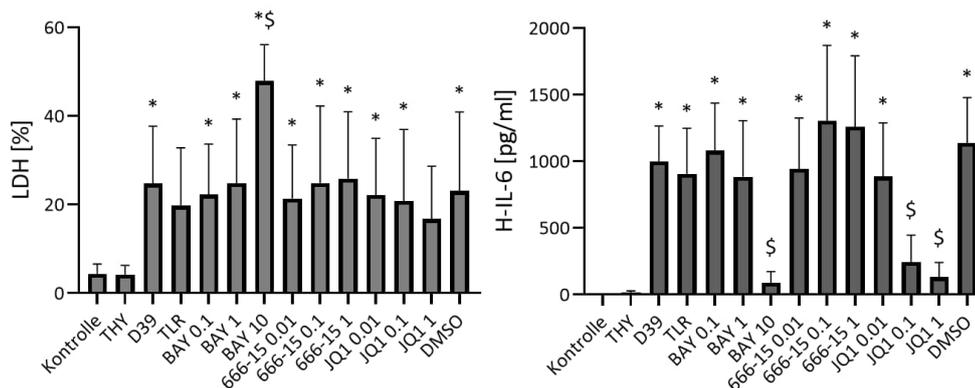


**Abbildung 15: Die Exposition mit Pneumokokken induziert eine Freisetzung von IL-6 aus HMC.** Die HMC (Lot-Nr. 11017) wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 24 Stunden mit  $4 \times 10^7$  (A) bzw.  $16 \times 10^7$  (B) KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert. D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm (n = 9). D39  $\Delta$ PLY = *S. pneumoniae* ST2, isogener PLY-defizienter Stamm (n = 9). 6B = *S. pneumoniae* ST6B (n = 6). 7F = *S. pneumoniae* ST7F (n = 6). \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle (n = 9); § p < 0,05, im Vergleich zu D39, # p < 0,05, im Vergleich zu D39  $\Delta$ PLY, § p < 0,05, im Vergleich zu 6B.

## 4.2 Analyse der an der Pneumokokken-induzierten IL-6-Produktion beteiligten Signalwege mithilfe ausgewählter pharmakologischer Hemmstoffe

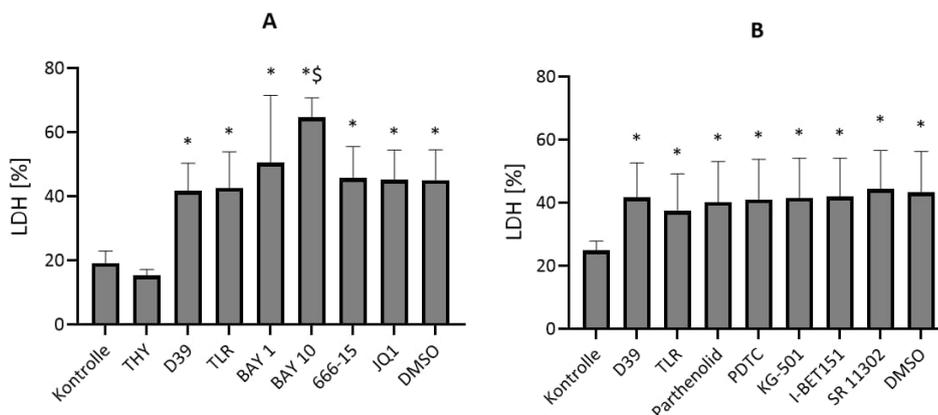
### 4.2.1 BET-Inhibition verringert die IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen

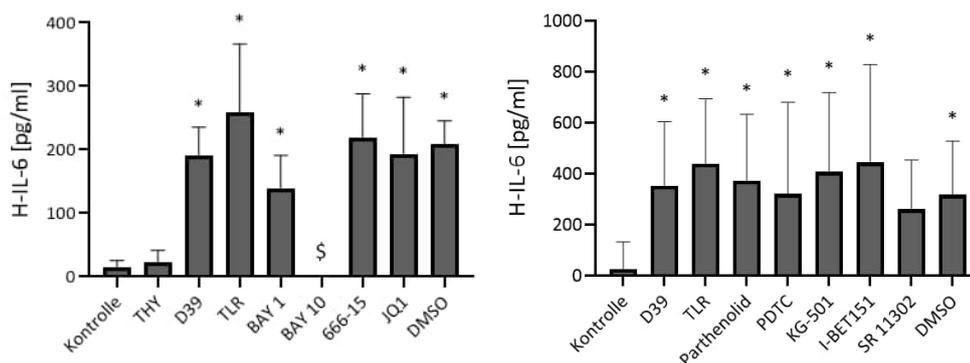
Zur Identifizierung von Signalwegen, die die Pneumokokken-induzierte IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen vermitteln, setzten wir in weiteren Versuchsreihen eine Auswahl pharmakologischer Hemmstoffe ein, die gegen bekannte Regulatoren der IL-6-Produktion gerichtet sind (Tanaka et al. 2014; Hirano 2021; Wolf et al. 2014; Luo et al. 2016). Die wesentlichen Befunde dieser Untersuchungen waren wie folgt: der kombinierte Einsatz von Inhibitoren gegen TLR2, TLR4 sowie Chloroquin (als Antagonist endosomaler TLR) zeigte keine inhibitorische Wirkung auf die Pneumokokken-induzierte IL-6-Freisetzung aus Ben-Men-1-Zellen. Gleiches traf für den CREB-Hemmstoff 666-15 zu. Im Gegensatz dazu bewirkte der BET-Hemmstoff JQ1 eine dosisabhängige Reduktion der IL-6-Produktion von Ben-Men-1-Zellen. Eine hochsignifikante Blockade der IL-6-Freisetzung wurde zudem bei einer Behandlung der Ben-Men-1-Zellen mit dem NF- $\kappa$ B-Hemmstoff BAY 11-7082 beobachtet, allerdings nur bei der höchsten Konzentration. Unsere Beobachtungen, dass Parthenolid (ein alternativer NF- $\kappa$ B-Hemmstoff) wirkungslos war und die inhibitorisch wirksame Konzentration von BAY 11-7082 mit einem signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung einherging, deuten darauf hin, dass die Reduktion der IL-6-Produktion zumindest teilweise auf die zytotoxische Wirkung von BAY 11-7082 auf Ben-Men-1-Zellen zurückzuführen sein könnte.



**Abbildung 16: Ben-Men-1-Zellen werden nach Exposition mit Pneumokokken durch den BET-Inhibitor JQ1 in der IL-6-Produktion gehemmt.** Die Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 24 Stunden mit  $2 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* (D39) stimuliert ( $n_{\text{Kontrolle-D39}} = 15$ ,  $n_{\text{TLR bis einschließlich DMSO}} = 13$ ). D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich zur Kontrolle; \$  $p < 0,05$ , im Vergleich zu D39.

In der Folge führten wir analoge Versuchsreihen an HMC durch (Abb. 17). Wie bei den Ben-Men-1-Zellen wurde die Pneumokokken-induzierte IL-6-Freisetzung aus HMC weder durch eine Behandlung mit einem Cocktail aus TLR-Antagonisten noch mit CREB-Hemmstoffen beeinflusst. Ebenso bewirkte die höchste Konzentration des NF- $\kappa$ B-Hemmstoffs BAY 11-7082 eine hochsignifikante Reduktion der IL-6-Produktion, die allerdings abermals mit einer vermehrten Freisetzung von LDH vergesellschaftet war. Letzteres könnte wieder entscheidend zur beobachteten Reduktion der IL-6-Freisetzung aus den meningealen Zellen beitragen. Ebenfalls keine signifikanten Effekte erzielten die in dieser Versuchsreihe zusätzlich eingesetzten Hemmstoffe von NF- $\kappa$ B (Parthenolid, PDTC) und AP-1 (SR 11302). Im Gegensatz zu den Ben-Men-1-Zellen zeigten BET-Hemmstoffe (weder JQ1 noch I-BET151) keine signifikante hemmende Wirkung auf die IL-6-Produktion durch HMC, was für essentielle Unterschiede der an der IL-6-Bildung beteiligten Signalwege zwischen der Meningeom-Zelllinie und HMC spricht.





**Abbildung 17: Der NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY bewirkt eine Reduktion der IL-6-Freisetzung durch HMC nach Stimulation mit *S. pneumoniae*.** Die Zellen (Lot-Nr. A: 19218 und B: 12575) wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 24 Stunden mit  $2 \times 10^7$  KBE/ml (A) bzw.  $4 \times 10^7$  KBE/ml (B) P/S-lysierten *S. pneumoniae* D39 stimuliert ( $n_{\text{A BAY 10}} = 6$ ,  $n_{\text{A}} = 9$  in allen restlichen Gruppen,  $n_{\text{B}} = 18$ ). Bei diesen Versuchsreihen musste mit unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen gearbeitet werden, da wir zwei unterschiedliche HMC-Präparationen (von unterschiedlichen Spendern) verwenden mussten; diese Präparationen mussten mit unterschiedlichen Pneumokokkenkonzentrationen stimuliert werden, um eine vergleichbare IL-6-Freisetzung zu erreichen. D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich zur Kontrolle; §  $p < 0,05$ , im Vergleich zu D39.

#### 4.2.2 Ben-Men-1-Zellen und primäre humane meningeale Zellen exprimieren weder TLR2 noch TLR4 oder TLR8

Für die Erkennung von *S. pneumoniae* durch Makrophagen werden TLR, insbesondere TLR2 und TLR8, verantwortlich gemacht (Shu et al. 2020; Moen et al. 2019). Um die negativen Befunde unserer entsprechenden Inhibitionsbefunde zu untermauern, führten wir TLR-Expressionsanalysen (mittels RT-PCR) an Ben-Men-1-Zellen und HMC durch. Darüber hinaus untersuchten wir die entsprechenden Zellen auf Expression typischer Markermoleküle meningealer Fibroblasten (Tab. 2). Die PCR-Analyse ergab für HMC sowie Ben-Men-1-Zellen eine konstitutive Expression der Fibroblastenmarker Fibronectin, PDGFR- $\alpha$  und Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1 (Coll1 $\alpha$ 1). Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen, dass die Markerexpression bei Ben-Men-1-Zellen entscheidend von den Kulturbedingungen abhängig ist. So war [i] bei Ben-Men-1-Zellen, die in RPMI 1640-Medium kultiviert wurden, im Gegensatz zu den anderen Kulturbedingungen keine PDGFR- $\alpha$ -Expression nachweisbar und [ii] zeigten in humanen Liquorproben kultivierte Ben-Men-1-Zellen die höchsten Expressionslevel für drei Markermoleküle. Diese Befunde veranlasseten uns, in zusätzlichen Versuchsreihen die Reaktion von Ben-Men-1-Zellen auf eine Pneumokokken-Exposition unter unterschiedlichen Kulturbedingungen zu untersuchen (s. 4.4). Für beide Zellarten konnte keine TLR2- oder TLR8-Expression, allerdings eine schwache konstitutive TLR4-Expression, nachgewiesen werden. Dieses TLR-Expressionsmuster veränderte sich weder nach einer Stimulation mit Pneumokokken noch unter variierenden Kulturbedingungen. Im Gegensatz zu den meningealen Zellen konnte in THP-1-Makrophagen eine starke TLR2- sowie eine schwache TLR4- und TLR8-Expression beobachtet werden.

Zellen	TLR2	TLR4	TLR8	FN	Col1 $\alpha$ 1	PDGFR- $\alpha$
Ben-Men-1 (DMEM)	0	1	0	28	4	2
Ben-Men-1 (RPMI 1640)	0	1	0	26		
Ben-Men-1 (MCM)	0	1	0	44	1	1
Ben-Men-1 (CSF)	0	1		136	10	6
Ben-Men-1 (RPMI 1640), SP-stimuliert	0	1	0	30	1	0
Ben-Men-1 (CSF), SP-stimuliert		1		98	5	4
HMC	0	2	0	311	50	12
THP-1	11	0,7	0,1	0,1		

Tabelle 2: mRNA-Expression von ausgewählten Fibroblastenmarker-molekülen und TLR bei Ben-Men-1-Zellen und HMC [relativ zum housekeeping gene GAPDH].

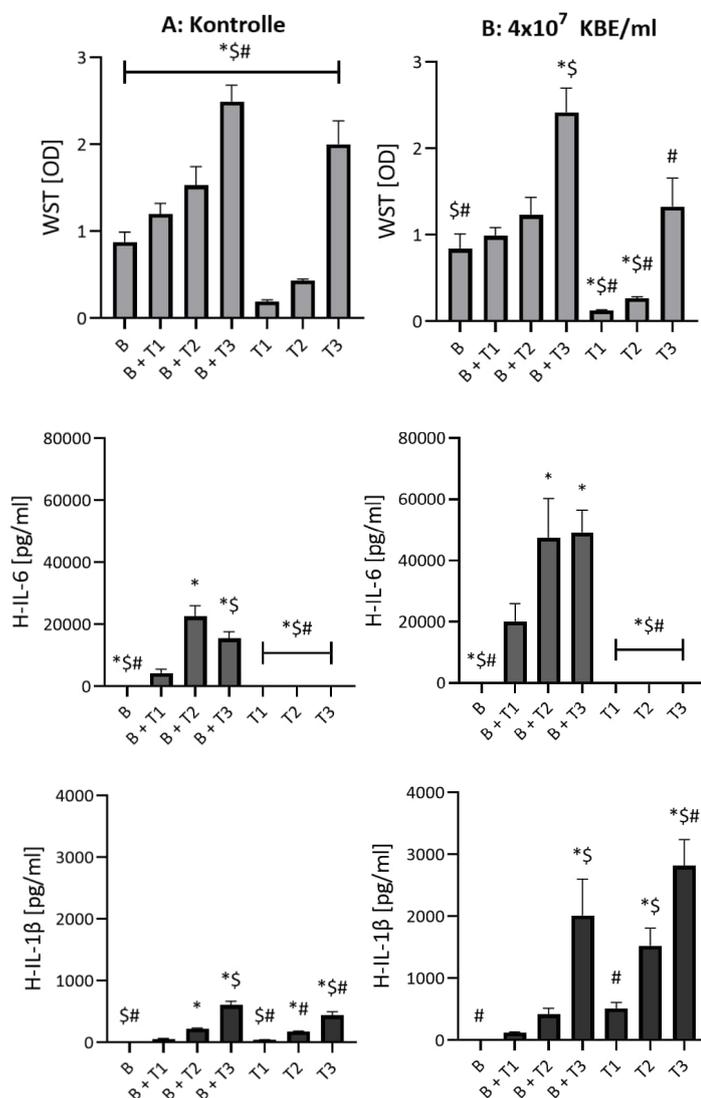
### 4.3 Interaktion von Ben-Men-1-Zellen und humanen meningealen Zellen mit Makrophagen

Um mögliche Interaktionen zwischen meningealen Zellen und benachbarten Makrophagen während einer Stimulation mit *S. pneumoniae* zu identifizieren, führten wir direkte Kokultursversuche mit Ben-Men-1-Zellen oder HMC und aufsteigenden Zahlen an zu Makrophagen ausdifferenzierten THP-1-Zellen durch. Erwartungsgemäß nahmen der WST-Umsatz und folglich der Anteil vitaler Zellen mit steigender Zellzahl zu. Nach einer Stimulation mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml *S. pneumoniae* ST2 D39 waren signifikante Reduktionen des WST-Umsatzes im Vergleich zu den Kontrollbedingungen bei folgenden Gruppen feststellbar: [i] bei Kokultur mit geringer und mittlerer THP-1-Zellzahl und [ii] bei allen THP-1-Monokulturen (unabhängig von der verwendeten Zellzahl).

Unter Kontrollbedingungen setzten die Ben-Men-1-Zellen alleine nur sehr geringe IL-6-Mengen frei. Im Kokultursystem mit THP-1-Zellen konnte bereits unter Kontrollbedingungen eine deutliche IL-6-Freisetzung detektiert werden (z.B.  $15440 \pm 2215$  pg/ml bei der höchsten THP-1-Zell-

zahl). Dieser Effekt wurde durch eine Stimulation mit Pneumokokken deutlich verstärkt: beispielsweise stieg im Kokultursystem mit der hohen THP-1-Zellzahl die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand signifikant auf  $49036 \pm 7354$  pg/ml an.

In der Monokultur von THP-1-Makrophagen nahm die Freisetzung von IL-1 $\beta$  mit steigender Zellzahl zu. Eine Pneumokokken-Stimulation induzierte einen zusätzlichen signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Produktion. Im Gegensatz zu den THP-1-Zellen konnte im Zellkulturüberstand von Ben-Men-1-Zellen weder unter Kontroll- noch unter Stimulationsbedingungen IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Die Kokultivierung von Ben-Men-1-Zellen mit THP-1-Makrophagen bewirkte eine signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen bei der mittleren und hohen THP-1-Zellzahl im Vergleich zur THP-1-Monokultur, was auf eine inhibitorische Wirkung der Ben-Men-1-Zellen auf die IL-1 $\beta$ -Expression durch THP-1-Makrophagen hindeutet.



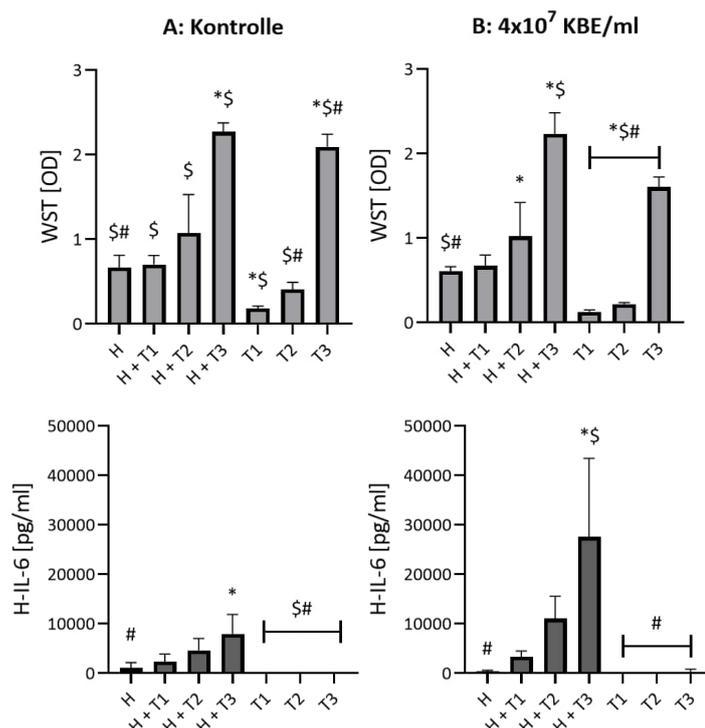
**Abbildung 18: Ben-Men-1-Zellen und Makrophagen setzen in Kokultur unterschiedliche Mengen an IL-6 und IL-1 $\beta$  frei als in Monokultur.** Die Ben-Men-1-Zellen wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 1 Stunde vor Versuchsbeginn mit THP-1-Zellen in aufsteigender Zellzahl (T1 = 15625/Well, T2 = 62500/Well, T3 = 250000/Well) inkubiert und anschließend für 6 Stunden mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* D39 (*S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm) stimuliert. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich zu B + T1, \$  $p < 0,05$ , im Vergleich zu B + T2, #  $p < 0,05$ , im Vergleich zu B + T3.  $n = 4$  (IL-6 Kontrolle T1 – T3, IL-

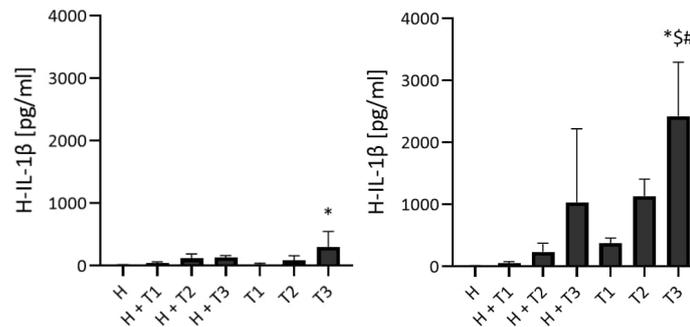
6  $4 \times 10^7$  T1 – T3), n = 5 (WST  $4 \times 10^7$  B + T3, WST  $4 \times 10^7$  T3, IL-6  $4 \times 10^7$  B + T1, IL-6  $4 \times 10^7$  B + T3, IL-1 $\beta$  Kontrolle T1 – T3, IL-1 $\beta$   $4 \times 10^7$  B + T3 – T3), n = 6 (WST restliche Gruppen, IL-6 Kontrolle B – B + T3,  $4 \times 10^7$  B, IL-6  $4 \times 10^7$  B + T2, IL-1 $\beta$  Kontrolle B – B + T3, IL-1 $\beta$   $4 \times 10^7$  B – B + T2). OD = Optische Dichte.

In der Folge führten wir die oben beschriebenen Versuchsreihen an HMC (anstelle von Ben-Men-1) durch. Der WST-Umsatz nahm analog zu den Untersuchungen mit der Ben-Men-1-Zelllinie mit aufsteigenden THP-1-Zellzahlen sowohl im THP-1-Monokultursystem als auch im Kokulturanatz mit THP-1-Zellen und HMC zu. Die Stimulation mit Pneumokokken führte weder in der HMC-Monokultur noch im Kokulturanatz zu Veränderungen im WST-Umsatz im Vergleich zu den Kontrollbedingungen.

Unter Kontrollbedingungen exprimierten HMC alleine vergleichsweise geringe Mengen an IL-6 ( $1065 \pm 1089$  pg/ml). Die hier verwendete Lot-Nr. 11017 setzte im Vergleich mit den anderen beiden in diesem Forschungsprojekt verwendeten Lot-Nrn. größere IL-6-Mengen frei (s. 4.1.4). Nach einer Stimulation mit Pneumokokken waren im Kokulturanatz (bei den beiden hohen THP-1-Zellzahlen) die IL-6-Konzentrationen im Zellkulturüberstand signifikant höher als unter Kontrollbedingungen (bei der höchsten THP-1-Zellzahl  $7918 \pm 3959$  pg/ml) und waren ca. um den Faktor 80 höher als in den Überständen von stimulierten, monokultivierten HMC.

THP-1-Zellen produzierten in Monokultur im unstimulierten Zustand bis zu  $297 \pm 249$  pg/ml IL-1 $\beta$ , während die IL-1 $\beta$ -Spiegel bei der identischen Anzahl von THP-1-Zellen im Kokultursystem mit HMC signifikant geringer waren. Nach einer Exposition mit Pneumokokken fand sich bei allen THP-1-Zellzahlen im Monokulturanatz ein signifikanter Anstieg der IL-1 $\beta$ -Produktion im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Im Kokultursystem von HMC mit der hohen THP-1-Zellzahl wurden – analog zu den Untersuchungen an Ben-Men-1-Zellen – signifikant geringere IL-1 $\beta$ -Werte als im entsprechenden Monokultursystem von THP-1-Zellen gefunden.





**Abbildung 19: Im Kokultursystem von HMC und Makrophagen ist eine vermehrte IL-6-, aber verminderte IL-1β-Freisetzung zu beobachten.** A = Kontrolle, B =  $4 \times 10^7$  KBE/ml. HMC (Lot-Nr. 11017) wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 1 Stunde vor Stimulationsbeginn mit zu Makrophagen ausdifferenzierten TPH-1-Zellen in aufsteigender Zellzahl (T1 = 15625/Well, T2 = 62500/Well, T3 = 250000/Well) kokultiviert und anschließend für 6 Stunden mit  $4 \times 10^7$  KBE/ml P/S-lysierten *S. pneumoniae* D39 (*S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm) stimuliert. n = 4 (IL-1β), n = 5 (WST H + T1 – H + T3, IL-6), n = 6 (WST H, WST T1-T3). \* p < 0,05, im Vergleich zu H + T1, \$ p < 0,05, im Vergleich zu H + T2, # p < 0,05, im Vergleich zu H + T3. OD = Optische Dichte.

Zusammenfassend zeigten unsere Kokultorexperimente, dass Ben-Men-1-Zellen oder HMC in Gegenwart von Makrophagen signifikant mehr IL-6 als im Monokultursystem freisetzen. Die Kokultur hatte auf die IL-1β-Produktion einen gegenteiligen Effekt: Makrophagen produzierten in Anwesenheit von Ben-Men-1-Zellen oder HMC signifikant weniger IL-1β. Diese Experimente deuten auf eine Interaktion zwischen meningealen Zellen und Makrophagen bei der Pneumokokken-induzierten Zytokinproduktion hin.

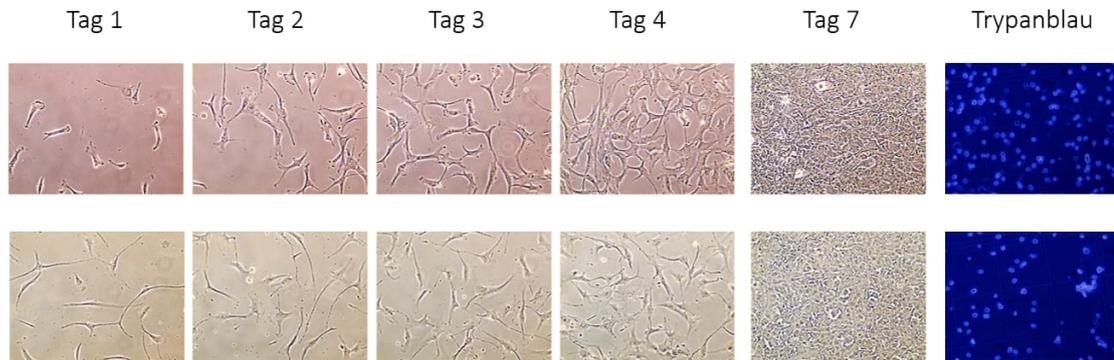
#### 4.4 Einfluss des Kulturmediums auf die Reaktion von Ben-Men-1-Zellen und primären humanen meningealen Zellen auf eine Pneumokokken-Infektion

##### 4.4.1 Ben-Men-1-Zellen reagieren im MCM bereits auf niedrigere Pneumokokken-Konzentrationen als im DMEM

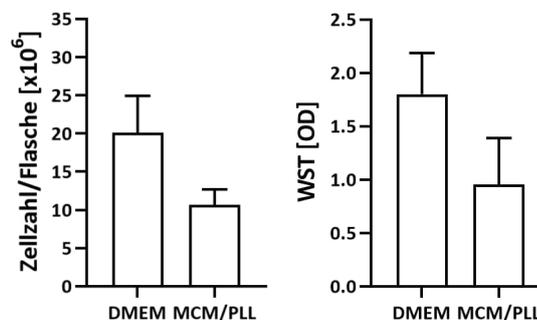
Laut DSZM werden Ben-Men-1-Zellen im DMEM kultiviert, während die Aufzucht und Stimulation der HMC in einem Spezialmedium, sogenanntem MCM, des Herstellers ScienCell Research Laboratories zu erfolgen hat. Um mögliche Einflüsse der Kulturmedien auf die Reaktion der verwendeten meningealen Zellen zu erfassen, verglichen wir in einer ersten Versuchsreihe die Reaktion von Ben-Men-1-Zellen auf eine Pneumokokken-Exposition im DMEM (Abb. 22A) mit der im MCM (Abb. 22B).

Bei der Kultivierung der Ben-Men-1-Zellen fielen bei den lichtmikroskopischen Kontrollen Unterschiede in der Wachstumsrate auf: die Ben-Men-1-Zellen wuchsen im DMEM schneller als im MCM und erreichten folglich bei gleicher Kultivierungsdauer höhere Zellzahlen (Abb. 20). Diese

Beobachtung konnte durch Zellzählungen und WST-Umsatzbestimmungen nach 7-tägiger Kulturdauer erhärtet werden (Abb. 21).



**Abbildung 20: Phänotypische Veränderungen von Ben-Men-1-Zellen *in vitro* während der Kultivierung im DMEM (oben) bzw. MCM (unten) sowie nach Trypanblau-Färbung (rechts).** Die Zellen wurden 7 Tage im jeweiligen Medium kultiviert.



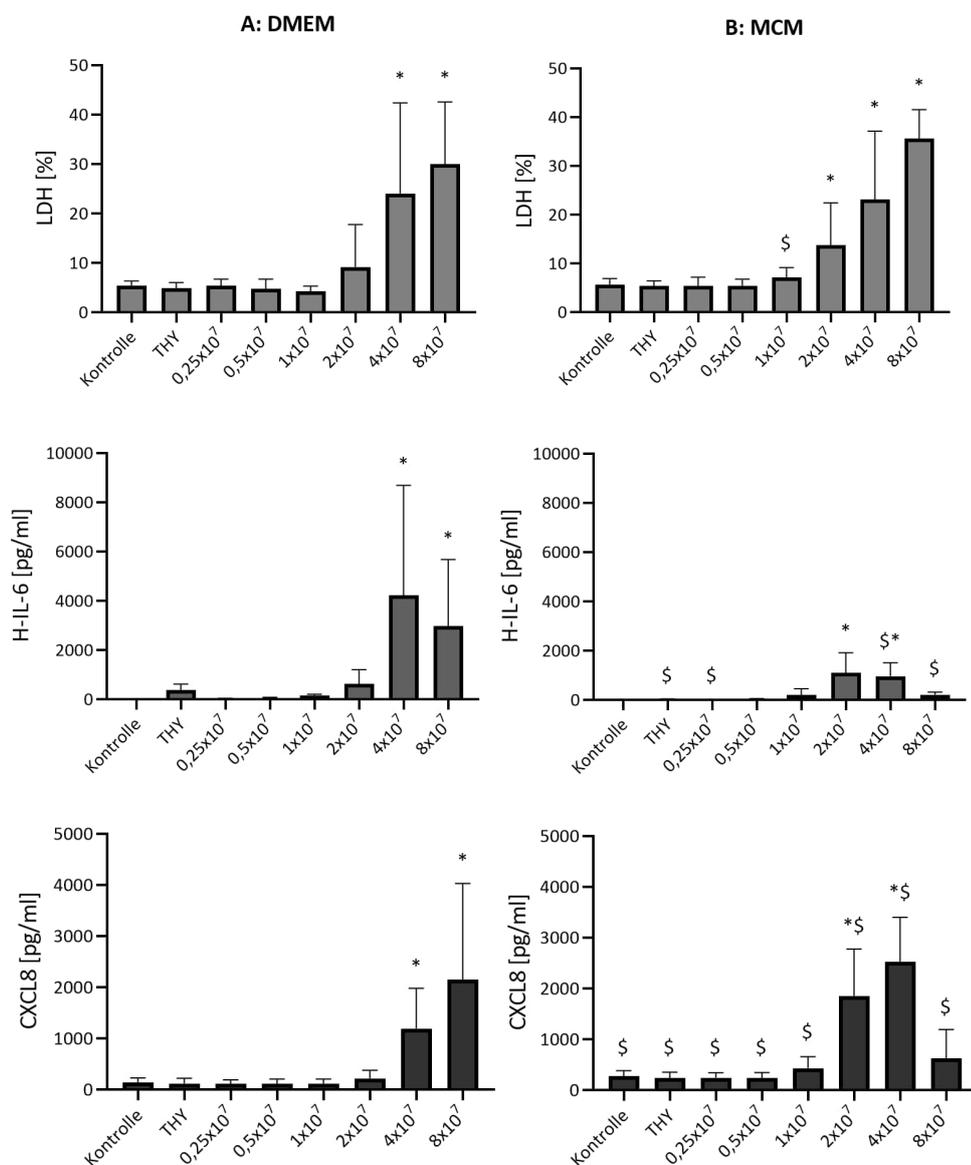
**Abbildung 21: Ben-Men-1-Zellen weisen im DMEM eine schnellere Wachstumsrate auf als im MCM.** OD = Optische Dichte. n = 16 pro Gruppe.

Bei den Stimulationsexperimenten kam es mit zunehmender bakterieller Konzentration in beiden Kulturmedien zu einer vermehrten Freisetzung von LDH als Zeichen des lytischen Zelluntergangs. Sowohl im Verlauf als auch im Ausmaß glich die Pneumokokken-induzierte LDH-Freisetzung im DMEM weitgehend der im MCM. Lediglich bei einer Stimulationsdosis von  $2 \times 10^7$  KBE/ml *S. pneumoniae* waren im MCM, nicht aber im DMEM, signifikant höhere LDH-Werte als bei den Kontrollen zu finden.

Ein unterschiedliches Bild lieferten die Bestimmungen der IL-6- und CXCL8-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen. Im DMEM produzierten die Ben-Men-1-Zellen bereits bei Zugabe von THY (dem Pneumokokken-Wachstumsmedium) IL-6. Die IL-6-Produktion stieg bei einer Stimulation mit Pneumokokken konzentrationsabhängig an, bis auf Werte von etwa 4000 pg/ml, allerdings mit einer hohen inter-experimentellen Variabilität (Abb. 22A). Im Vergleich dazu setzten im MCM gehaltene Ben-Men-1-Zellen unter Kontrollbedingungen kein IL-6 frei. Überdies waren die höchsten gemessenen IL-6-Werte (< 2000 pg/ml) deutlich niedriger als die im DMEM, allerdings mit einer vergleichsweise geringen Schwankungsbreite (Abb. 22B).

In beiden Kulturmedien produzierten die Ben-Men-1-Zellen konstitutiv geringe Mengen an CXCL8. In Folge einer Exposition mit Pneumokokken wurde in beiden Medien ein konzentrationsabhängiger Anstieg der CXCL8-Freisetzung beobachtet. Die freigesetzte CXCL8-Menge war in beiden Medien vergleichbar, allerdings fanden sich signifikante Unterschiede im Expressionsverlauf. Im MCM, nicht aber im DMEM kam es bereits bei einer Pneumokokken-Dosis von  $2 \times 10^7$  KBE/ml zu einer signifikanten CXCL8-Produktion. Während im DMEM bei der höchsten Pneumokokken-Konzentration am meisten CXCL8 produziert wurde, fiel der CXCL8-Wert im MCM auf das Kontrollniveau ab.

Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen erhebliche Unterschiede im Verlauf, im Ausmaß und in der Variabilität der Pneumokokken-induzierten Zytokinproduktion von Ben-Men-1-Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium.



**Abbildung 22: Ben-Men-1-Zellen reagieren im DMEM und MCM unterschiedlich auf eine Stimulation mit *S. pneumoniae*.** Die Zellen wurden im DMEM (links) bzw. MCM (rechts) für 7 Tage kultiviert und anschließend in eine 96-Well-Platte im gleichen Medium ausgesät. Nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen wurden die Zellen 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert (n = 15 in jeder Gruppe). D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm. Als THY-Kontrolle wird

hier die mit der höchsten THY-Konzentration dargestellt, welche der *S. pneumoniae*-Konzentration von  $8 \times 10^7$  KBE/ml entspricht. Falls THY-Effekte auftreten, sind diese laut eigenen Voruntersuchungen konzentrationsabhängig. \*  $p < 0,05$ , im Vergleich zur Kontrolle mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA); \$  $p < 0,05$ , im Vergleich zur selben Gruppe im DMEM mittels ungepaartem t-Test.

#### 4.4.2 Ben-Men-1-Zellen reagieren in humanem CSF stärker auf Pneumokokken als im MCM

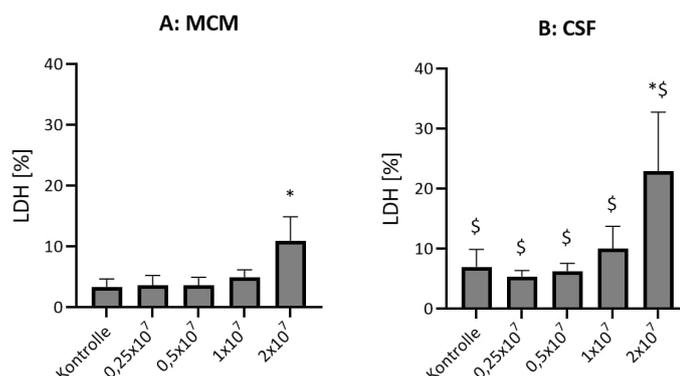
In einer weiteren Versuchsreihe verglichen wir die Reaktivität humaner Ben-Men-1-Zellen im MCM (Abb. 23A) mit der in humanem, laborchemisch unauffälligem CSF (Abb. 23B). Die MCM-Versuche stellen neue, von denen in Abschnitt 4.4.1 unabhängige Experimente dar. In humanem CSF führte die Pneumokokken-Stimulation im Gegensatz zum MCM bereits bei einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  KBE/ml zu einer signifikanten LDH-Freisetzung in den Zellkulturüberstand. Die freigesetzte LDH-Menge war in allen Versuchsgruppen im CSF höher als im MCM.

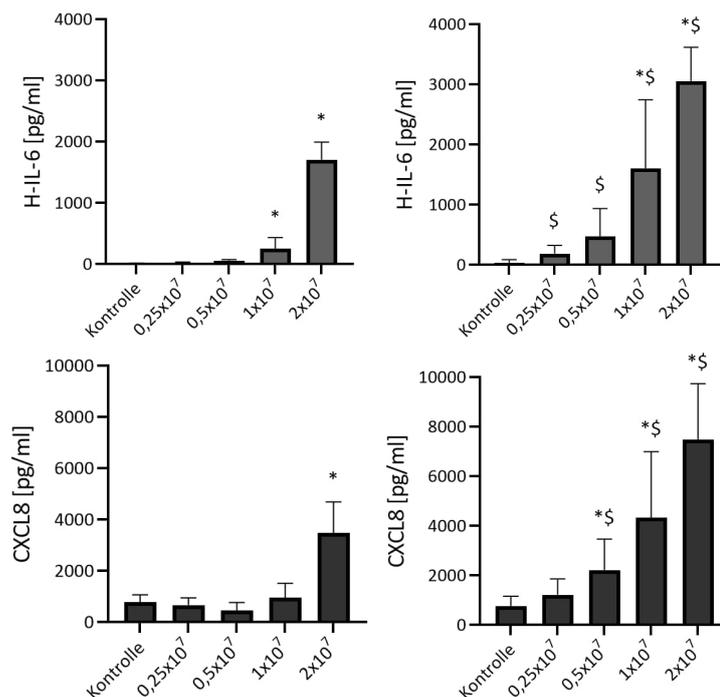
Die IL-6-Produktion unterschied sich in beiden Medien bei  $1 \times 10^7$  bzw.  $2 \times 10^7$  KBE/ml signifikant von der Kontrolle. Die IL-6-Werte waren im CSF in allen Stimulationsgruppen signifikant höher als im MCM.

Im MCM konnten lediglich bei der höchsten Pneumokokken-Konzentration ( $2 \times 10^7$  KBE/ml) signifikant erhöhte CXCL8-Werte gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde in humanem CSF bereits ab einer Stimulationsdosis von  $0,5 \times 10^7$  KBE/ml ein signifikanter CXCL8-Anstieg beobachtet. Im Vergleich beider Medien waren die CXCL8-Werte für die Pneumokokken-Konzentrationen im Bereich zwischen  $0,5 \times$  bis  $2 \times 10^7$  KBE/ml in humanem CSF signifikant höher als im MCM.

Ferner ist anzumerken, dass sich die Konzentrationen von IL-6 und CXCL8 in den verwendeten humanen CSF-Proben nicht signifikant von den entsprechenden Kontrollwerten unterschieden (Tab. 3). Ebenso ergaben sich zwischen den Kontrollgruppen nach vollständiger Zellyse durch Triton X100 zwischen DMEM, MCM und CSF keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen LDH-Werten, was für ein vergleichbares Wachstum der Zellen in den jeweiligen Medien spricht.

Folglich scheinen Pneumokokken in humanem CSF bereits in niedrigeren Dosen zytotoxisch auf Ben-Men-1-Zellen zu wirken und überdies eine stärkere Zytokinfreisetzung hervorzurufen.





**Abbildung 23: Ben-Men-1-Zellen weisen bei Stimulation mit *S. pneumoniae* im CSF mehr Zelltod und eine stärkere Zytokinproduktion auf als im MCM.** Die Zellen wurden für 7 Tage im MCM kultiviert und anschließend in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen wurden die Zellen 24 Stunden im MCM (A) bzw. CSF (B) mit aufsteigenden Konzentrationen P/S-lysierten *S. pneumoniae* stimuliert (n-MCM = 8, n-CSF = 24). D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm. \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) (n-MCM = 9, n-CSF = 44); \$ p < 0,05, im Vergleich zur selben Gruppe im MCM mittels ungepaartem t-Test.

CSF-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
IL-6 Kontrolle	1,96	147,37	0,0	0,0	0,0	61,41	0,0	0,0
IL-6 CSF pur	0,0	2,5	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0
CXCL8 Kontrolle	490,57	1431,57	436,39	793,62	869,06	892,53	374,46	726,35
CXCL8 CSF pur	180,32	186,26	204,42	267,29	590,22	308,40	305,01	90,15

**Tabelle 3: IL-6- und CXCL8-Spiegel der puren CSF-Proben [pg/ml].**

#### 4.4.3 Pneumokokken wirken auf humane meningeale Zellen im CSF zytotoxischer als im MCM

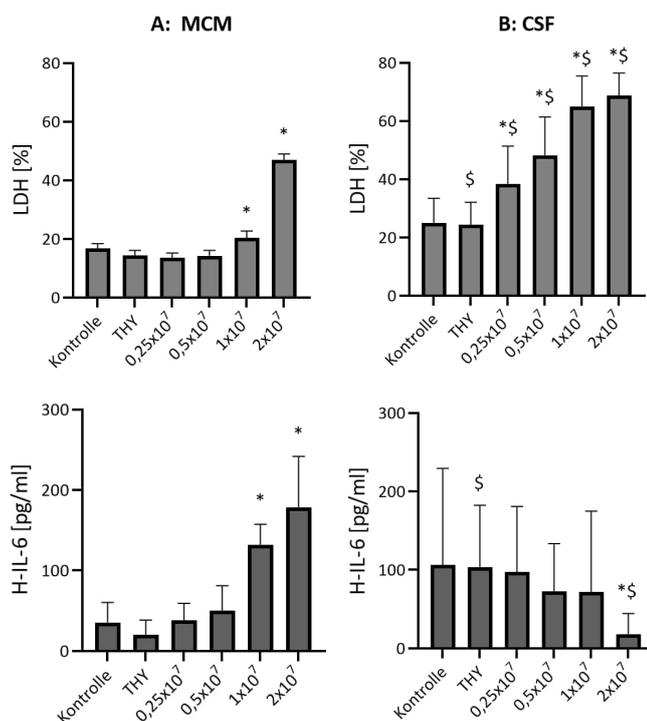
Analog zu den Ben-Men-1-Zellen analysierten wir in einer abschließenden Versuchsreihe die Reaktivität von HMC auf eine Pneumokokken-Exposition im MCM (Abb. 24A) im Vergleich zu humanem CSF (Abb. 24B). Ein signifikanter Zelluntergang war im MCM ab einer bakteriellen Konzentration von 1x10<sup>7</sup> KBE/ml festzustellen. In humanem CSF dagegen wirkte bereits eine Pneumokokken-Dosis von 0,25x10<sup>7</sup> KBE/ml zytotoxisch. Generell waren alle LDH-Werte (ausgenommen der Kontrolle) im CSF signifikant höher als im MCM.

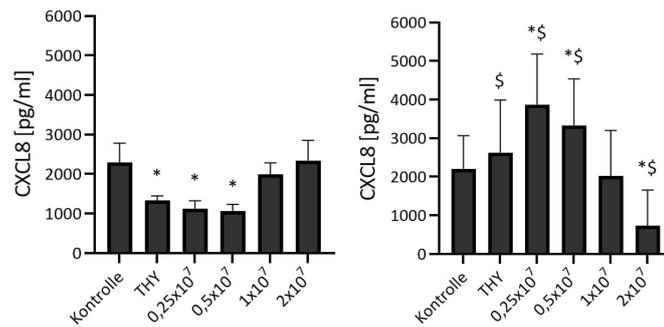
Im MCM war die höchste gemessene IL-6-Konzentration (im Mittel  $179 \pm 63$  pg/ml) bei einer Pneumokokken-Konzentration von  $2 \times 10^7$  KBE/ml zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu war im CSF bei keiner Pneumokokken-Konzentration eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte IL-6-Produktion nachweisbar. Bei der höchsten Pneumokokken-Dosis von  $2 \times 10^7$  KBE/ml kam es sogar zu einem signifikanten Rückgang der IL-6-Spiegel auf  $18 \pm 26$  pg/ml. Im Vergleich mit MCM wurde im CSF in der THY-Kontrolle signifikant mehr, bei einer Pneumokokken-Konzentration von  $2 \times 10^7$  KBE/ml signifikant weniger IL-6 produziert; die restlichen Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich.

Die CXCL8-Produktion erreichte im MCM bei einer Pneumokokken-Konzentration von  $2 \times 10^7$  KBE/ml ihren Höchstwert ( $2342 \pm 509$  pg/ml). Im CSF war der Höchstwert bei der niedrigeren Pneumokokken-Konzentration von  $0,25 \times 10^7$  KBE/ml zu beobachten ( $3871 \pm 1313$  pg/ml). Mit ansteigender Bakterienlast kam es zu einem Rückgang bis auf Werte von  $732 \pm 928$  pg/ml bei  $2 \times 10^7$  KBE/ml. Ein signifikanter Unterschied der CXCL8-Werte zwischen MCM und CSF wurde in allen Gruppen mit Ausnahme der Kontrolle und der Pneumokokken-Dosis von  $1 \times 10^7$  KBE/ml verzeichnet.

Es muss erwähnt werden, dass die in dieser Versuchsreihe verwendeten HMC mit der Lot-Nr. 19218 im Vergleich mit den anderen beiden HMC-Präparationen eine geringere Zytokinproduktion aufwies. So betrug der maximale IL-6-Wert dieser HMC-Präparation im Mittel ca. 200 pg/ml IL-6, während die anderen HMC-Präparationen mehr als das Fünffache an IL-6 freisetzen.

Zusammenfassend scheinen HMC im CSF weniger überlebensfähig zu sein als in ihrem Spezialmedium MCM. Die eingeschränkte Vitalität ging mit einer deutlich veränderten Reaktivität, d.h. IL-6 und CXCL8-Freisetzung, einher.





**Abbildung 24: HMC verhalten sich bei einer Pneumokokken-Stimulation im CSF different als im MCM.** Die HMC (Lot-Nr. 19218) wurden nach einer Kultivierungszeit von 2 Tagen 24 Stunden mit aufsteigenden Pneumokokken-Konzentrationen P/S-lysierten *S. pneumoniae* im MCM (A) sowie CSF (B) stimuliert (n-MCM = 6, n-CSF Kontrolle und THY = 14, n-CSF 0,25-1x10<sup>7</sup> = 29, n-CSF 2x10<sup>7</sup> = 32). D39 = *S. pneumoniae* ST2, Wildtyp-Stamm. Als THY-Kontrolle wird hier die mit der höchsten THY-Konzentration dargestellt, welche der *S. pneumoniae*-Konzentration von 2x10<sup>7</sup> KBE/ml entspricht. Falls THY-Effekte auftreten, sind diese laut eigenen Voruntersuchungen konzentrationsabhängig. \* p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA); \$ p < 0,05, im Vergleich zur selben Gruppe im MCM mittels ungepaartem t-Test.

## 5. Diskussion

Bei einer Infektion des Leptomeningealraums durch Pneumokokken kommt es zu einer massiven Entzündungsreaktion, die zu ausgeprägten Gewebeschäden und damit verbundenen neurologischen Defiziten führen kann. Die beteiligten inflammatorischen Signalkaskaden beginnen bei der Erkennung von PAMPs durch PRRs wie TLR auf und in ortsständigen Zellen des Leptomeningealraums. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle meningealer Fibroblasten bei der Pathogenerkennung und Induktion der Immunantwort unter *in vitro*-Bedingungen zu untersuchen. Hierzu wurden zunächst Zellkulturversuche mit der humanen Meningeom-Zelllinie Ben-Men-1 durchgeführt. Diese konnten demonstrieren, dass eine Exposition mit Pneumokokken eine Expression selektiver Zytokine, insbesondere von IL-6 und CXCL8, induzieren kann. Die Expression von IL-6 erfolgte in Abhängigkeit des Virulenzfaktors PLY, aber unabhängig von TLR2, TLR4 und endosomalen TLR. Darüber hinaus zeigten Inhibitionsexperimente, dass IL-6 BRD4- (und möglicherweise) NF- $\kappa$ B-abhängig, nicht aber CREB- und AP-1-abhängig freigesetzt wird. Ferner wurde in Kokulturversuchen mit Makrophagen nachgewiesen, dass die Expression von IL-6 durch Ben-Men-1-Zellen in Gegenwart von Makrophagen massiv erhöht wird, während die IL-1 $\beta$ -Produktion durch Makrophagen in Anwesenheit von Ben-Men-1-Zellen signifikant abnimmt. Vergleichbare Ergebnisse wurden in der Folge bei Versuchen mit HMC erhoben. Bei der Induktion der Immunantwort scheint somit neben der direkten Erkennung von Pneumokokken durch ortsständige Makrophagen deren Interaktion mit weiteren Zellarten relevant zu sein. Als potenzielle weitere Regulatoren der Immunantwort im Leptomeningealraum konnten in dieser Arbeit meningeale Fibroblasten identifiziert werden.

### 5.1 Immunantwort und Zelltod meningealer Zellen

Im Rahmen einer Pneumokokken-Infektion des Subarachnoidalraums können im Liquor von Patienten eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden. Hierzu gehören unter anderem IL-6, CXCL8 und IL-1 $\beta$  (Kastenbauer et al. 2005; Spanaus et al. 1997; Østergaard et al. 2004; Brivet et al. 2005). Diesen kommen einerseits überlebenswichtige immunregulatorische Funktionen zu, indem sie zur Migration von Leukozyten und anderen immunkompetenten Zellen an den Ort des Infektionsgeschehens führen (McLoughlin et al. 2003; Loughran et al. 2019) und eine effizientere Pathogen-Bekämpfung erst ermöglichen. Dementsprechend wurde in einem Mausmodell der PM ein Zusammenhang zwischen einer fehlenden Aktivität der Zytokine IL-6 und/oder TNF- $\alpha$  und einer reduzierten Überlebensrate gesehen (Albrecht et al. 2016). Andererseits kann es infolge einer ausgeprägten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zum massiven Influx von Leukozyten und zur Freisetzung großer Mengen reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) sowie proteolytischer Enzyme kommen, die wiederum neuronales Gewebe im Sinne eines Kollateralschadens zerstören können (Klein, Koedel, et al. 2006; Hoffmann et al. 2006; Yau et al. 2018; Kastenbauer et al. 2002b; Paul et al. 1998; Sellner et al. 2006; Liechti et al. 2014). Dies äußert sich klinisch in teilweise beträchtlichen und langfristigen neurologischen Defiziten, wie beispielsweise epileptischen Anfällen, motorischen Ausfällen sowie Störungen des Hörvermögens und der Kognition

(Edmond et al. 2010; Buchholz et al. 2016; Koelman et al. 2022). Interessanterweise kann diese überschießende Immunantwort mit den einhergehenden neurologischen Symptomen auch in Abwesenheit lebender Bakterien ausgelöst werden. So wurde mittels intrazisternaler Injektion pneumokokkaler Zellwandbestandteile im Tiermodell gezeigt, dass deren inflammatorische Aktivität ähnlich der einer äquivalenten Konzentration lebender Bakterien ist (Tuomanen, Tomasz, et al. 1985). Dies belegt, dass die aus einer Infektion mit Pneumokokken resultierenden Gewebeschäden zum erheblichen Teil durch die Immunantwort des Wirts und nicht durch toxische Produkte der eingedrungenen lebenden Pathogene verursacht werden (Doran et al. 2016). Dementsprechend kann die Ausschüttung von Zytokinen als einer der zentralen Angriffspunkte zur Verhinderung neurologischer Spätfolgen betrachtet werden. Allerdings ist weitgehend ungeklärt, welche (residenten) Zelltypen in welchem Umfang und in welcher Weise zur Zytokin-/Chemokinproduktion in Folge einer leptomeningealen Pneumokokken-Infektion beitragen.

Im Leptomeningealraum bilden Fibroblasten die größte Zellpopulation (Xu et al. 2021; Davidson et al. 2021; Dorrier et al. 2022). In zellkulturellen Untersuchungen (an frisch kultivierten oder immortalisierten humanen Meningeomzellen) zeigte sich, dass [i] Gram-positive und Gram-negative Pathogene durch diese Zellen aufgenommen werden können, [ii] eine Infektion mit *N. meningitidis* und *H. influenzae* die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen (IL-6, CXCL8, CCL2, CCL5 und GM-CSF), nicht aber einen Untergang der Zellen induzieren kann und [iii] eine Infektion mit *S. pneumoniae* überraschenderweise keine Zytokin- und Chemokinproduktion, bei hohen bakteriellen Konzentrationen aber einen Zelluntergang auslösen kann (Christodoulides et al. 2002; Royer et al. 2013; Fowler et al. 2004). Die begrenzte und widersprüchliche Datenlage veranlasste uns, die Reaktion meningealer Zellen auf eine Pneumokokken-Exposition in alternativen Zellkulturmodellen zu untersuchen. In unseren Versuchsreihen verglichen wir die Reaktion von Ben-Men-1-Zellen mit der von kommerziell erhältlichen HMC.

In Übereinstimmung mit früheren Studien (Fowler et al. 2004), in denen bei Exposition frisch isolierter humaner Meningeom-Zellen mit hohen Pneumokokken-Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung beschrieben wurde, konnten wir in unseren Versuchsreihen eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung von Pneumokokken sowohl auf Ben-Men-1-Zellen als auch auf HMC beobachten. Bei unseren Untersuchungen fiel überdies auf, dass [i] die für diesen Effekt benötigte Pneumokokken-Konzentration in Abhängigkeit vom Zelltyp und Zellkulturmedium sowie im Fall der HMC von der Präparation (dem Spendenden) variierte und [ii] die zytotoxische Wirkung nicht vom Serotyp, sondern von der Anwesenheit des porenbildenden Toxins PLY abhängig war.

Mittels Antikörper-Array führten wir des Weiteren einen Screening-Test auf 42 Proteine durch. Hierbei zeigte sich für Ben-Men-1-Zellen nach Inokulation mit *S. pneumoniae* eine signifikante Induktion von IL-6 sowie eine signifikante Hochregulierung von CXCL1 und CXCL8. Ähnlich reagierten HMC auf eine Pneumokokken-Exposition mit einer signifikant erhöhten Produktion von IL-6 sowie zusätzlich einer Induktion von IL-1 $\beta$ , M-CSF und CCL22. Zur Bestätigung der Antikörper-Array-Analysen führten wir IL-6-ELISAs durch: bei beiden Zelltypen konnten unter Stimulationsbedingungen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen im Zellkulturüberstand gemessen werden. Bei diesen Einzelbestimmungen (im Gegensatz zur Verwendung gepoolter Proben bei den Antikörper-Array-Analysen) stellten wir

fest, dass die Reaktion der HMC in erheblichem Umfang von der verwendeten Präparation (und damit vom Spendenden) abhängig war. Bei unseren Experimenten mussten wir drei unterschiedliche Präparationen (Lot-Nrn.) einsetzen: die Zellen der Lot-Nr. 11017 zeigten erst bei einer Stimulation mit  $16 \times 10^7$  KBE/ml ST2 D39 einen signifikanten Anstieg der Zelltodmarker; die IL-6-Konzentrationen erreichten bei diesen Zellen Maximalwerte im fünfstelligen pg/ml-Bereich. Im Gegensatz dazu war bei Zellen der Lot-Nr. 19218 eine signifikante LDH- und IL-6-Freisetzung bereits bei einer Pneumokokken-Konzentration von  $1 \times 10^7$  pg/ml zu verzeichnen; die maximal freigesetzte IL-6-Menge war um den Faktor 30 kleiner als bei der oben genannten HMC-Präparation (Lot-Nr. 11017).

Im Gegensatz zu der oben bereits erwähnten Studie von Fowler et al. (Fowler et al. 2004) beobachteten wir regelhaft, dass meningeale Zellen auf einen Pneumokokken-Kontakt hin selektive Zytokine wie IL-6 freisetzen. Ein wichtiger Grund für diese diskrepanten Befunde in der Zytokinproduktion zwischen unseren Untersuchungen und denen von Fowler et al. könnte sein, dass Fowler et al. Pneumokokken-Konzentrationen von  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  und  $10^8$  KBE/ml verwendeten. Somit lagen die drei niedrigsten Konzentrationen unter der Schwelle, die in unserer Arbeit eine Zytokinproduktion durch Ben-Men-1 und HMC induzieren konnte, während die höchste Konzentration in unseren Untersuchungen mit einem hohen Ausmaß eines lytischen Zelltodes und damit einer fehlenden Zytokinproduktion (analog zu den Beobachtungen von Fowler et al.) einherging. Ein weiterer Grund könnte in der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen liegen: während die Arbeitsgruppe von Fowler et al. frisch isolierte benigne Meningeom-Zellen einsetzte (Fowler et al. 2004), benutzten wir Ben-Men-1-Zellen (eine immortalisierte, aus einem WHO Grad I meningoetheliales Meningeom isolierte Zelllinie (Püttmann et al. 2005)) sowie HMC (primäre meningeale Zellen). Zudem wurden die Versuche von Fowler et al. mit 2 %-igem, von Komplementfaktoren depletiertem FBS-DMEM und mit lebenden Bakterien durchgeführt. Im Gegensatz dazu verwendeten wir 1 % Hitze-inaktiviertes FBS und P/S-lysierte Pneumokokken. Für Letzteres entschieden wir uns, da die verwendeten Serotypen deutlich unterschiedliche Wachstumsraten im Zellkulturmedium aufweisen und folglich nur durch die induzierte Lyse vor Versuchsbeginn gewährleistet werden kann, dass die meningealen Zellen mit vergleichbaren bakteriellen Konzentrationen stimuliert werden. Darüber hinaus wird durch die antimikrobiell induzierte Lyse eine Freisetzung essenzieller Virulenzfaktoren wie PLY erreicht (wie sie auch in der klinischen Situation unter Behandlungsbedingungen zu beobachten ist).

In dieser Arbeit wurden neben dem Wildtyp-Stamm drei weitere *S. pneumoniae*-Serotypen eingesetzt: eine PLY-defiziente isogene Mutante ST2 D39 (ST D39  $\Delta$ PLY) sowie ST6B und ST7F. Der herausragende Befund dieser Vergleichsuntersuchungen war, dass die Defizienz des Virulenzfaktors PLY sowohl bei Ben-Men-1-Zellen als auch bei HMC nicht nur zu einer signifikanten Reduktion der Pneumokokken-induzierten Zellschädigung, sondern auch der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, wie beispielsweise IL-6, führte.

Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit früheren Untersuchungen zur biologischen Aktivität von PLY, in denen dieses porenbildende Toxin als ein zentraler Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* beschrieben wurde (Jacques et al. 2020; Surve et al. 2018; Zysk et al. 2001). PLY kann durch Störung der zellulären Homöostase, mitochondriale Schäden mit Freisetzung von Apoptose-induzierendem Faktor (AIF) und ROS-Freisetzung über den *mitogen-activated protein kinase*-

(MAPK)-Signalweg auf Makrophagen, dendritische Zellen und Neuronen zytotoxisch wirken (Nishimoto et al. 2020; Braun et al. 2007; Pereira et al. 2022; Tabusi et al. 2021). In hohen Konzentrationen kann PLY einen pyroptischen sowie nekroptischen Zelltod verursachen, wie beispielsweise Kim et al. mittels Stimulation von BV-2 Mikrogliazellen mit 0,5, 1 und 5  $\mu\text{g/ml}$  PLY *in vitro* nachweisen konnten (Nishimoto et al. 2020; Riegler et al. 2019; Braun et al. 2007; González-Juarbe et al. 2015; Littmann et al. 2009; Gilley et al. 2016; Kim et al. 2015; Jim et al. 2022; González-Juarbe et al. 2017). Zudem können durch PLY inflammatorische Signalkaskaden ausgelöst werden. Beispielsweise aktiviert PLY in Immunzellen (wie Makrophagen, dendritischen Zellen) das NLRP3-Inflammasom und bewirkt die vermehrte Ausschüttung von IL-1 $\beta$  (Hoegen et al. 2011; McNeela et al. 2010; Witzenrath et al. 2011; Karmakar et al. 2015; Shoma et al. 2008), sodass *in vitro* durch murine Knochenmarksmakrophagen und THP-1-Makrophagen sowie *in vivo* bei Infektion mit PLY-defizienten Pneumokokken niedrigere IL-1 $\beta$ -Spiegel gemessen werden können (Hoegen et al. 2011). Darüber hinaus fördert PLY in dendritischen Zellen und Makrophagen die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  (McNeela et al. 2010; Pereira et al. 2022).

Zusammenfassend wirkte *S. pneumoniae* sowohl auf Ben-Men-1-Zellen als auch auf HMC zytotoxisch und immunstimulierend. Bei PLY-Defizienz war eine signifikant geringere Zytotoxizität sowie attenuierte Zytokinantwort zu verzeichnen.

## 5.2 Effekte einer Inhibition regulierender Signalmoleküle der IL-6-Expression

TLR spielen bei der Pathogenerkennung durch den Wirtsorganismus eine zentrale Rolle (Fitzgerald et al. 2020; Pereira et al. 2022; van de Beek et al. 2016; Koedel et al. 2010). Bei der Erkennung von *S. pneumoniae* in experimentellen Mausmodellen scheinen insbesondere TLR2 und TLR13 (beim Menschen hingegen TLR8) relevant zu sein (Koedel et al. 2003; Klein et al. 2008; Echchannaoui et al. 2002; Too et al. 2019). TLR2 erkennt Lipopeptide, während endosomale TLR wie TLR8 und TLR13 intravesikulär unter anderem in Endosomen Nukleinsäuren detektieren (Oldenburg et al. 2012; van de Beek et al. 2016; Fitzgerald et al. 2020). Eine TLR4-vermittelte Erkennung von PLY ist derzeit umstritten (McNeela et al. 2010; Malley et al. 2003; van de Beek et al. 2016). Die nachfolgend ausgelöste Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wird in beträchtlichem Anteil durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa\text{B}$  reguliert, welchem somit eine Schlüsselfunktion in der Expression proinflammatorischer Zytokine zukommt (Koedel et al. 2004; Kawai et al. 2007). Zur Ermittlung der Relevanz von TLR bei der Pathogenerkennung durch meningeale Zellen wurden Inhibitoren gegen TLR2 und TLR4 sowie Chloroquin, ein Antagonist endosomaler TLR, kombiniert und vor Stimulation mit Pneumokokken dem Medium hinzugefügt. Nach unserem Kenntnisstand stellen diese die ersten Inhibitionsexperimente mit meningealen Zellen dar. Eine signifikante Veränderung der LDH-, IL-6- oder CXCL8-Freisetzung (mit Ausnahme bei der höchsten Konzentration des Hemmstoffs BAY 11-7082, die per se stark zytotoxisch wirkte) wurde hierbei weder für Ben-Men-1-Zellen noch für HMC beobachtet. Möglicherweise gründet der fehlende Einfluss von TLR auf der Monokultur

meningealer Zellen in dieser Arbeit. So wurde von Facci et al. 2014 gezeigt, dass eine TLR-vermittelte Immunantwort erst im Zusammenspiel von Astrozyten und Mikrogliazellen zustandekommt. Um weitere Erklärungen für die fehlende Wirkung der TLR-Inhibition zu gewinnen, führten wir PCR-Analysen für Ben-Men-1-Zellen und HMC durch und stellten fest, dass beide Zellarten weder TLR2 noch TLR8 (das humane Homolog von TLR13) sowie TLR4 nur in geringem Ausmaß exprimieren. Dies kontrastiert die Arbeit von Humphries et al. 2005, die eine konstitutive TLR2- und -4-Expression in meningoethelialen Meningeomzellen beschreibt. Die von Humphries et al. verwendeten Zellen waren jedoch frisch aus einem Meningeom isoliert worden, während wir eine immortalisierte Ben-Men-1-Zelllinie sowie HMC verwendeten. Unsere Experimente mit unterschiedlichen HMC-Präparationen zeigten deutliche präparationsabhängige (vom Spendenden abhängige) Unterschiede in Zytotoxizität und Zytokinproduktion. Ähnliches könnte auch bei Meningeom-Zellen von unterschiedlichen Patienten und unterschiedlicher Herstellung (frisch versus immortalisiert) der Fall sein.

In zusätzlichen Versuchsreihen setzten wir weitere Inhibitoren gegen Signalmoleküle ein, die an der Regulation der IL-6-Expression mitwirken können. Diese richteten sich gegen NF- $\kappa$ B, BET, CREB und AP-1. Die BET-Familie und insbesondere BRD4 sind in inflammatorischen Prozessen aufgrund ihrer Funktion als NF- $\kappa$ B-Koaktivatoren relevant (Huang et al. 2009). CREB ist als Transkriptionsfaktor unter anderem für die Expression von Genen verantwortlich, die für IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  kodieren (Hershko et al. 2002; Wen et al. 2010). JQ1, ein BRD4-Inhibitor (Filippakopoulos et al. 2010), erzielte in Ben-Men-1-Zellen eine signifikant niedrigere Produktion von IL-6 nach einer Pneumokokken-Exposition, während die restlichen Inhibitoren keine signifikante Veränderung in der IL-6-Bildung bewirkten. Ein antiinflammatorischer Effekt von JQ1 wurde auch in LPS-Stimulationsversuchen mit dendritischen Zellen, der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 sowie primären Knochenmarksmakrophagen beobachtet (Sun et al. 2015; Belkina et al. 2013). So bewirkte JQ1 eine signifikant reduzierte IL-6-Freisetzung, vermutlich durch eine gestörte Interaktion von BET mit einer NF- $\kappa$ B-Untereinheit oder dem IL-6-Promotor (Sun et al. 2015; Belkina et al. 2013). Auch bei *in vitro*-Experimenten mit primären Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten, welche aus Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert worden waren, wurde nach Zugabe von JQ1 eine niedrigere Produktion von IL-6, CXCL8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nachgewiesen (Xiao et al. 2016).

Nach Identifizierung eines hochwirksamen Hemmstoffs der IL-6-Freisetzung in Ben-Men-1-Zellen wurden die Inhibitionsversuche mit dieser Zelllinie abgeschlossen und zur Überprüfung der Gültigkeit die gleichen Inhibitoren bei HMC angewendet. Zudem setzten wir PDTC als weiteren NF- $\kappa$ B-Inhibitor und SR 11302 als Hemmstoff des AP-1-Signalwegs ein. AP-1 kann in menschlichen Astrozytom-Zellen unter anderem LPS-induziert zur Aktivierung entzündlicher Signalkaskaden sowie einer erhöhten IL-6-Expression führen (Lu et al. 2022; Yang et al. 2020; Hirano 2021; Bejjani et al. 2019). Bei den HMC konnte durch keinen der verwendeten Hemmstoffe eine signifikante Reduktion des lytischen Zelltodes oder der IL-6- oder CXCL8-Produktion erzielt werden; auch JQ1 zeigte im Gegensatz zu Ben-Men-1-Zellen keine signifikante Wirkung. Somit scheinen bei HMC andere, NF- $\kappa$ B- und AP-1-unabhängige Signalkaskaden die IL-6-Regulation zentral zu beeinflussen. So kann die IL-6-Expression durch weitere Transkriptionsfaktoren wie NF-IL6 (C/EBP- $\beta$ ) oder Sp-1 vermittelt werden (Luo et al. 2016; Wolf et al. 2014). Des Weiteren

zeigten Zhu et al. 2018, dass ein virales dsRNA-Analogon in humanen dermalen Fibroblasten eine erhöhte Expression von IL-6- und CXCL8-mRNA induziert. Als Signalweg wurde hierbei eine STAT3- und p38 MAPK-Phosphorylierung identifiziert, sodass JAK- bzw. p38 MAPK-Inhibitoren eine reduzierte IL-6- und CXCL8-Freisetzung bewirkten (Zhu et al. 2018). Zudem stellten Hou et al. 2020 *in vitro* mit Experimenten zur Osteoarthritis und rheumatoiden Arthritis fest, dass humane primäre synoviale Fibroblasten CXCL1-vermittelt IL-6 exprimierten. Die anschließende Regulation erfolgte durch CXCR2, c-Raf, MAPKs und den Transkriptionsfaktor c-Jun (Hou et al. 2020).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse konnte für die Ben-Men-1-Zelllinie mit dem BET-Inhibitor JQ1 ein wirksamer Inhibitor der Pneumokokken-induzierten IL-6-Freisetzung gefunden werden. Dies gelang im Rahmen dieser Arbeit für HMC nicht, sodass alternative Signalwege in zukünftigen Projekten adressiert werden sollten.

### 5.3 Modulierte Zytokinexpression meningealer Zellen und Makrophagen im Kokultursystem

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Monokultur von meningealen Zellen und Makrophagen lassen die Ursprünge der IL-6- bzw. IL-1 $\beta$ -Produktion vermuten. So produzierten THP-1-Zellen in Monokultur IL-1 $\beta$ , aber kein IL-6. Dagegen wiesen meningeale Zellen in Monokultur eine IL-6-Produktion, jedoch keine (oder nur eine minimale) IL-1 $\beta$ -Produktion auf. Die Meningen enthalten eine ortsständige Makrophagenpopulation (Van Hove et al. 2019), sodass eine Monokultur meningealer Zellen der Komplexität inflammatorischer Zell-Zell-Interaktionen nicht gerecht werden kann (Chanput et al. 2014). Durch Kokultursysteme ist es anderen Arbeitsgruppen gelungen, eine gegenseitige Beeinflussung zweier Zellarten nachzuweisen (Pikor et al. 2015; Liddelow et al. 2017). So wurde gezeigt, dass in meningealen Fibroblasten durch Th17-Zellen, einer speziellen Art von T-Helferzellen, eine Umstrukturierung von Aktin und Kollagen angeregt wird (Pikor et al. 2015). Ein weiteres Beispiel findet sich in der Mikroglia-vermittelten Ausbildung reaktiver A1-Astrozyten, die durch Hochregulierung von Genen der klassischen Komplementkaskade und Ausbildung glialer Narben neurotoxisch wirken und zum apoptotischen Zelltod von Neuronen und Oligodendrozyten führen (Liddelow et al. 2017).

Auf dieser Basis wurden Ben-Men-1-Zellen und HMC jeweils mit zu Makrophagen ausdifferenzierten THP-1-Makrophagen in drei Konzentrationen für 1 Stunde kokultiviert und anschließend mit Pneumokokken stimuliert, um mögliche Interaktionen in Hinblick auf die IL-6- und IL-1 $\beta$ -Produktion zu identifizieren. Durch Kokultur kam es bereits in den unstimulierten Gruppen zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion; nach Stimulation mit *S. pneumoniae* wurde ein weiterer signifikanter Anstieg der IL-6-Produktion festgestellt. Die Beobachtung einer verstärkten Zytokinproduktion durch Kokultivierung machten auch Karri et al. 2021, die THP-1-Zellen mit Keratinozyten kultivierten. Hierbei wurde unter Behandlung mit Methylisothiazolinon eine deutlich höhere Produktion unter anderem von IL-1 $\beta$  im Vergleich zur Monokultur gemessen (Karri et al. 2021).

Eine Interaktion zwischen meningealen Zellen und Makrophagen ließ sich auch in Bezug auf die IL-1 $\beta$ -Level verzeichnen, hatte jedoch hier eine inhibierende Wirkung. So wurde IL-1 $\beta$  durch THP-1-Zellen alleine signifikant mehr produziert als in Anwesenheit von Ben-Men-1-Zellen oder HMC. Bei beiden Arten meningealer Zellen wurde im Mittel eine Reduktion um mehr als die Hälfte beobachtet. Aus diesen Versuchen ergeben sich einige zentrale Fragestellungen mit dem Ziel, die Mechanismen dieser Zell-Zell-Interaktionen besser zu verstehen. So bleibt ungeklärt, ob die Wechselwirkungen auf Zell-Zell-Kontakten basieren oder über lösliche Botenstoffe ausgelöst werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass IL-1 $\beta$  die Sekretion von IL-6 induzieren kann (Wolf et al. 2014; Chen et al. 2005; Kany et al. 2019; Dinarello 2011), sodass dieser Signalweg in diesem Zusammenhang weiterführend untersucht werden sollte. Die in unseren Versuchen beobachtete Niederregulation von IL-1 $\beta$  könnte einen negativen Feedback-Mechanismus darstellen, welcher auch von Paul et al. 2003 in IL-6<sup>-/-</sup>-Mäusen *in vivo* beschrieben wurde.

In Summe kam es durch Kokultur meningealer Zellen mit Makrophagen zu einer signifikant erhöhten IL-6-Konzentration sowie signifikant erniedrigten IL-1 $\beta$ -Konzentration. Dies weist auf gegenseitige regulatorische Mechanismen hin und gewährt einen wertvollen ersten Anhaltspunkt dafür, dass beide Zellarten bei der Regulation der Immunantwort auf eine Pneumokokken-Infektion miteinander interagieren.

#### 5.4 Auswirkung der Zellkulturbedingungen auf lytischen Zelltod und Zytokinproduktion durch meningeale Zellen

Das Zellkulturmedium DMEM, das gemäß Herstellerangaben für Experimente mit Ben-Men-1-Zellen verwendet werden sollte (Püttmann et al. 2005; Hemion et al. 2020; Selke et al. 2021), zeichnet sich durch relativ hohe Kalzium- und niedrige Glukose- sowie Phosphatkonzentrationen aus. Frühere Studien haben wiederholt gezeigt, dass das Kulturmedium Zellproliferation und -vitalität in relevantem Ausmaß beeinflussen kann (Lopez-Cazaux et al. 2006; Bahmanpour et al. 2020). Beispielsweise wurde für die murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie J774.1/JA-4 demonstriert, dass bei einer Kultivierung in Ham's F-12-Medium (F-12) gegenüber DMEM eine Exposition mit LPS oder Interferon- $\gamma$  zu unterschiedlichen zellulären Phänotypen führen kann (Kawakami et al. 2016). Hierbei zeigten im DMEM gehaltene Zellen eine höhere Expression von induzierbarer NO-Synthase und TNF- $\alpha$  sowie eine verzögerte IL-1 $\beta$ -Expression als Zellen, die in F-12-Medium stimuliert worden waren (Kawakami et al. 2016).

In dieser Arbeit wurde die Reaktivität der Ben-Men-1-Zelllinie auf eine Pneumokokken-Exposition vergleichend in DMEM und MCM, dem Zellkulturmedium der HMC, sowie in humanen CSF-Proben untersucht. Ziel war es, Einflüsse der Kulturbedingungen auf die zelluläre Reaktivität zu identifizieren und somit mögliche Erklärungsansätze für beobachtete Unterschiede zwischen Ben-Men-1-Zellen und HMC zu gewinnen.

Aus diesen Versuchen ging hervor, dass *S. pneumoniae* bereits in niedrigen Konzentrationen zytotoxisch auf Ben-Men-1-Zellen wirkte, wenn diese Zellen im MCM stimuliert wurden. In Über-

einstimmung mit einer verstärkten Zytotoxizität wurde bei der höchsten Pneumokokken-Konzentration im MCM weniger IL-6 produziert. Auch CXCL8 wurde im MCM signifikant weniger exprimiert als im DMEM. Insgesamt waren bei Stimulation im MCM geringere Pneumokokken-Konzentrationen für das Auftreten einer signifikanten zytotoxischen Wirkung sowie einer Zytokinproduktion vonnöten als im DMEM. Ergänzend wurden MCM und humanes CSF als Stimulationsmedien von Ben-Men-1-Zellen verglichen. Die humanen Liquorproben stammten von Patienten mit Normaldruckhydrozephalus oder idiopathischer intrakranieller Hypertension und besaßen aufgrund ihrer normwertigen Zusammensetzung somit eine mit den Zellkulturmedien vergleichbare Proteinkonzentration und eine etwa um den Faktor 10 niedrigere Glukosekonzentration. Diese Experimente ergaben im CSF höhere Zelltodwerte als im MCM, während gleichzeitig im CSF eine stärkere IL-6- und CXCL8-Produktion zur Darstellung kam. So wurde im MCM beispielsweise bei  $2 \times 10^7$  KBE/ml ein Wert von 1700 pg/ml IL-6 gegenüber 3045 pg/ml im CSF gemessen. Darauffolgend wurden diese Beobachtungen an HMC überprüft. Diese Zellen setzten im CSF unter THY-Kontrollbedingungen, aber auch bei einer Stimulation mit Pneumokokken signifikant höhere LDH-Mengen frei als im MCM. Ferner reagierten HMC auf eine Exposition mit Pneumokokken im CSF – im Gegensatz zum MCM – nicht mit einer erhöhten Produktion von IL-6. Die CXCL8-Freisetzung aus HMC stieg nur bei geringen Pneumokokken-Konzentrationen leicht an, fiel dann aber bei einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  KBE/ml sogar unter das Kontrollniveau ab. Letzteres ist vermutlich eine Folge des ausgeprägteren Zelluntergangs im CSF im Vergleich zum MCM.

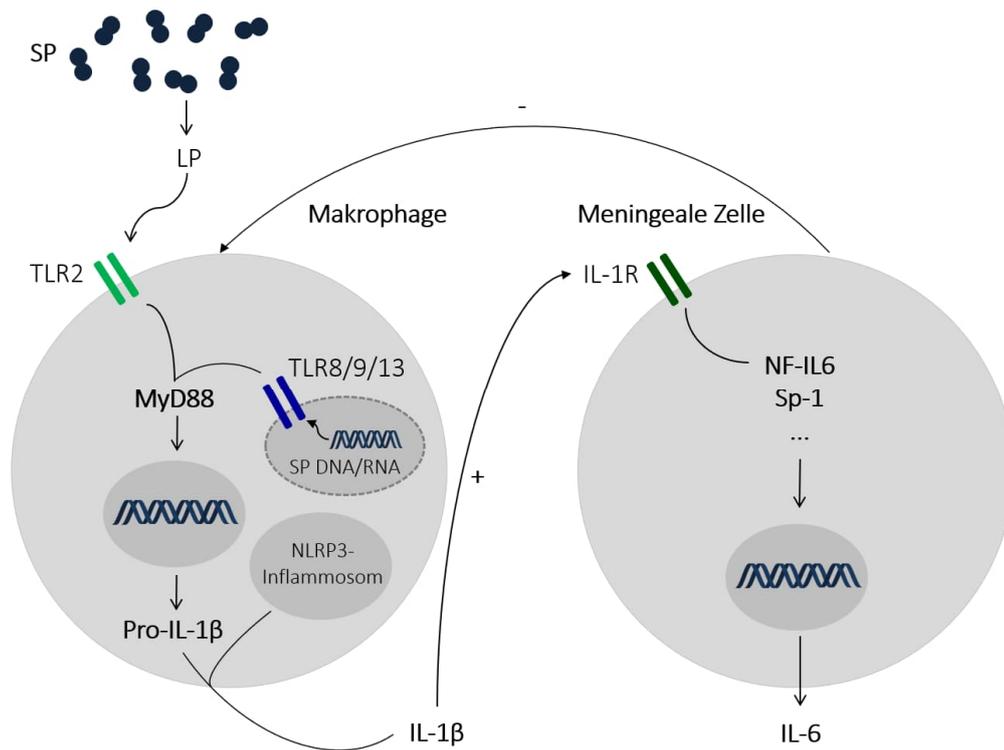
Zusammenfassend belegen diese Experimente einen erheblichen Einfluss des Zellkulturmediums auf die zytotoxische Wirkung von Pneumokokken, aber auch auf die Freisetzung von Zytokinen. Hierbei wurden für Ben-Men-1-Zellen und HMC divergierende Befunde festgestellt. So hatten Ben-Men-1-Zellen in allen Medien vergleichbare Reaktionen und wiesen bei steigenden Pneumokokken-Konzentrationen mehr lytischen Zelltod sowie eine erhöhte Freisetzung von IL-6 und CXCL8 auf. Unterschiede bestanden hier zwischen den Medien lediglich im Ausmaß der Zytokinausschüttung sowie der hierfür benötigten Bakterienkonzentration. HMC hingegen schienen das vom Hersteller empfohlene Zellkulturmedium zu benötigen und im CSF weniger vital und funktional zu sein.

## 5.5 Schlussfolgerungen für Anknüpfungspunkte in Zellmodell und Klinik

Eine Modulation der Immunreaktion über den Einsatz von Glukokortikoiden hinaus gehört zu den wichtigsten aufkommenden Therapieansätzen bei einer Infektion mit Pneumokokken (Cools et al. 2021). In dieser Arbeit wurde eine TLR-unabhängige Produktion von IL-6 und CXCL8 durch Ben-Men-1-Zellen und HMC in Monokultur nachgewiesen. Wir beobachteten darüber hinaus eine ausgeprägte Interaktion zwischen meningealen Zellen und Makrophagen, bei deren Kokultur im Vergleich zur Monokultur sehr hohe IL-6-Konzentrationen „sezerniert“ wurden. Somit besteht die Hypothese, dass auch die TLR-vermittelte Immunreaktion auf das Zusammenspiel

mehrerer Zellarten angewiesen sein könnte (Li et al. 2021). Es konnte bereits anhand von Kokultorexperimenten mit Mikrogliazellen und Astrozyten gezeigt werden, dass bei Depletion von Mikrogliazellen keine Zytokinproduktion durch TLR-Signalkaskaden ausgelöst wird (Facci et al. 2014). Auch Holm et al. 2012 legten dar, dass Astrozyten nur in Anwesenheit von Mikrogliazellen auf TLR2-, TLR3- und TLR4-Agonisten mit einer verstärkten TLR-Expression reagieren. Diese Wirkung war in direkter Kokultur am stärksten ausgeprägt, aber auch durch Kultur von Astrozyten in von Mikrogliazellen konditioniertem Medium zu beobachten. Ebenso konnte sie durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert werden. Lösliche Botenstoffe scheinen somit zumindest teilweise an dieser zellulären Interaktion beteiligt zu sein (Holm et al. 2012). Zusammenfassend besteht hierin eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass die bakterielle Meningitis mit einer starken Entzündungsreaktion einhergeht, obwohl die Zahl der Immunzellen im Subarachnoidalraum im Vergleich zu anderen Organen gering ist (Koedel, Klein, et al. 2009). So würden Makrophagen Pathogene detektieren und dann Botenstoffe freisetzen, die wiederum residente meningeale Zellen zur exzessiven Freisetzung von IL-6 und weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine anregen (Abb. 25).

Hierauf aufbauend könnten Kokultorexperimente mit meningealen Zellen und Makrophagen mit Einsatz von Hemmstoffen unter anderem für TLR oder NF- $\kappa$ B weitere Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen diesen Zellen liefern. Vergleichende Zytokinbestimmungen von meningealen Zellen in Makrophagen-Zellkulturüberständen gegenüber einer Kokultur beider Zellarten könnte zur Klärung der Frage beitragen, ob Zell-Zell-Kontakte für die zelluläre Kommunikation essenziell sind und welche Signalwege hierbei benutzt werden. Gleichzeitig könnte untersucht werden, ob durch Makrophagen produziertes IL-1 $\beta$  hierbei eine zentrale Rolle in der IL-6-Produktion meningealer Zellen übernimmt. Zudem könnten in diesem Zusammenhang PCR-Analysen der TLR-Expression meningealer Zellen die Wirkung löslicher Induktionssignale genauer beleuchten. Darüber hinaus ist neben Makrophagen ein Kokultur-Ansatz mit weiteren Zellarten, beispielsweise Perizyten, möglich. Zuletzt könnte durch Versuche mit Kokultivierung meningealer Zellen in humanem Liquor die Wirkung möglicher hierin enthaltener, bislang unbekannter Kofaktoren, miteinbezogen werden (Perez-Alcazar et al. 2016). Somit wäre ein weiterer Schritt in Richtung physiologischer Versuchsbedingungen und Identifizierung möglicher Angriffspunkte für immunmodulatorische adjuvante Therapien vollzogen.



**Abbildung 25: Mechanismen der Pathogenerkennung sowie Interaktion zwischen meningealen Zellen und Makrophagen bei Infektion mit *S. pneumoniae*.** LP wird durch TLR2 auf der Oberfläche von Makrophagen erkannt sowie bakterielle Nukleinsäuren intravesikulär durch TLR8, TLR9 und TLR13, sodass es zur Aktivierung des Adaptermoleküls MyD88 und letztendlich zur Hochregulation der IL-1 $\beta$ -Expression kommt. Das Vorläuferprotein Pro-IL-1 $\beta$  wird unter Beteiligung des NLRP3-Inflammosoms zur aktiven Form IL-1 $\beta$  umgewandelt. IL-1 $\beta$ -vermittelt kommt es anschließend in meningealen Zellen über die Aktivierung verschiedener, bisher nicht identifizierter Transkriptionsfaktoren (beispielsweise NF-IL6 oder Sp-1) zur vermehrten Ausschüttung von IL-6. Über einen negativen Feedback-Mechanismus, der noch im Detail analysiert werden muss, wird gleichzeitig die IL-1 $\beta$ -Sekretion durch Makrophagen gehemmt. Basierend auf Wolf et al. 2014.

## 6. Zusammenfassung

Die PM stellt eine lebensbedrohliche, globale Infektionskrankheit dar. Trotz kontinuierlicher Impfstoffentwicklung und etablierter Therapiekonzepte kommt es häufig zu Komplikationen wie der Entwicklung eines Hirnödems, epileptischen Anfällen oder Nierenversagen (Buchholz et al. 2016; Kastenbauer et al. 2003; Klein et al. 2011). Als Ursache hierfür wird eine massive, durch PAMPs getriggerte Entzündungsreaktion angesehen (Doran et al. 2016; van de Beek et al. 2021). PRRs des Wirtsorganismus und insbesondere TLR können PAMPs erkennen und nachfolgend inflammatorische Signalkaskaden initiieren (Koedel et al. 2010; Klein, Koedel, et al. 2006; van de Beek et al. 2021; van de Beek et al. 2016). Welcher Zellpopulation des ZNS diese Sentinelfunktion neben residenten Makrophagen zukommt, ist weitgehend ungeklärt. Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle meningealer Fibroblasten bei der Pneumokokken-Infektion zu charakterisieren. Hierfür wurden Zellkulturversuche mit Ben-Men-1-Zellen, einer Zelllinie humaner Meningeom-Zellen, sowie mit HMC durchgeführt. Die Zellen wurden mit Pneumokokken stimuliert, wobei unterschiedliche Stimulationsdauern, bakterielle Konzentrationen und Serotypen (2 D39, 2 D39  $\Delta$ PLY, 6B, 7F) eingesetzt wurden. Es wurden mit P/S-lysierte Pneumokokken verwendet, um bei unterschiedlich schnell wachsenden Serotypen einheitliche Stimulations-Konzentrationen garantieren und eine optimale Stimulation durch die antimikrobiell induzierte Freisetzung von Virulenzfaktoren wie PLY hervorrufen zu können. Nachfolgend wurden Zellvitalität und Zelltod mittels WST- und LDH-Assay bestimmt. Die Zytokin- und Chemokinproduktion wurde mittels Antikörper-Array als initialen Screening-Test sowie im Anschluss ELISA für IL-6, IL-1 $\beta$  und CXCL8 analysiert. Darüber hinaus wurden spezifische Hemmstoffe (wie z.B. TLR sowie NF- $\kappa$ B, CREB, BET und AP-1) eingesetzt, um relevante Signaltransduktionswege der Zytokinproduktion zu identifizieren. Zur Untersuchung möglicher zellulärer Interaktionen wurden zudem Kokulturrexperimente mit meningealen Zellen und zu Makrophagen ausdifferenzierten THP-1-Zellen durchgeführt.

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit waren, dass sowohl die Ben-Men-1-Zelllinie als auch HMC nach Exposition mit Pneumokokken lytischen Zelltod aufweisen sowie verschiedene Zytokine und Chemokine produzieren. So zeigten Ben-Men-1-Zellen bei einer Stimulation mit Pneumokokken (Wildtyp-Stamm) eine Induktion von IL-6 sowie Hochregulierung von CXCL1 und CXCL8. HMC wiesen eine Hochregulierung von IL-6 sowie eine Induktion von IL-1 $\beta$ , M-CSF und CCL22 auf. Für beide Zellarten galt zudem, dass die Zytokinproduktion bei PLY-Defizienz zurückging. Durch eine Inhibition von TLR2, TLR4 und endosomalen TLR konnte weder bei Ben-Men-1-Zellen noch HMC der Pneumokokken-induzierte Zelltod oder die Zytokinproduktion beeinflusst werden. Ebenfalls keinerlei Wirkung zeigten Behandlungen mit Hemmstoffen von NF- $\kappa$ B, CREB und AP-1. Ein differentes Bild ergab sich bei Ben-Men-1-Zellen (nicht aber HMC) mit JQ1, einem BET-Inhibitor: eine Behandlung mit JQ1 führte zu einer konzentrationsabhängigen Blockade der Pneumokokken-induzierten Zytokin-Freisetzung. Folglich scheinen BET-abhängige Signalwege entscheidend zur Zytokinproduktion in Ben-Men-1-Zellen, nicht aber in HMC beizutragen. Des Weiteren wurde in direkten Kokultursystemen beobachtet, dass die Reaktion meningealer Zellen auf eine Stimulation mit Pneumokokken durch die Anwesenheit von Makrophagen entscheidend moduliert werden kann und vice versa. So produzierten sowohl Ben-Men-1-Zellen als auch HMC in Anwesenheit von THP-1-Zellen beispielsweise bis zu 80-

fach mehr IL-6 als in Monokultur. IL-1 $\beta$  hingegen wurde von THP-1-Zellen in Monokultur mehr sezerniert als im Kokultursystem mit meningealen Zellen. Zuletzt konnte durch Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien ein relevanter Einfluss der Kulturbedingungen auf die Reaktivität meningealer Zellen auf eine Pneumokokken-Exposition nachgewiesen werden. Die Zytokinproduktion durch Ben-Men-1-Zellen war hierbei in humanem CSF am ausgeprägtesten, während HMC im CSF weniger lebensfähig schienen und geringere Zytokinmengen generierten.

Zusammenfassend lässt diese Dissertationsarbeit auf eine aktive Beteiligung meningealer Zellen am Infektionsgeschehen bei einer Invasion des Leptomeningealraums durch Pneumokokken schließen. Die Aktivierung meningealer Zellen scheint dabei – zumindest in der Monokultur – weitgehend unabhängig von TLR zu erfolgen und entscheidend von benachbarten Makrophagen gesteuert zu werden. In weiteren direkten und indirekten Kokultorexperimenten sollten die Mechanismen der Interaktion zwischen meningealen Zellen und Makrophagen genauer charakterisiert werden. Es ist vorstellbar, dass sich aus einem besseren Verständnis dieser Zell-Zell-Interaktion neue Angriffspunkte für eine Hemmung der massiven Entzündungsreaktion bei der PM ergeben und durch spezifische entzündungshemmende Behandlungsstrategien die Prognose dieser Erkrankung verbessert wird.

## Literaturverzeichnis

- Albiger, B., S. Dahlberg, A. Sandgren, F. Wartha, K. Beiter, H. Katsuragi, S. Akira, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2007. 'Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection', *Cell Microbiol*, 9: 633-44.
- Albrecht, L. J., S. C. Tauber, J. Merres, E. Kress, M. B. Stope, S. Jansen, T. Pufe, and L. O. Brandenburg. 2016. 'Lack of Proinflammatory Cytokine Interleukin-6 or Tumor Necrosis Factor Receptor-1 Results in a Failure of the Innate Immune Response after Bacterial Meningitis', *Mediators Inflamm*, 2016: 7678542.
- Alexandre, C., F. Dubos, C. Courouble, I. Pruvost, E. Varon, and A. Martinot. 2010. 'Rebound in the incidence of pneumococcal meningitis in northern France: effect of serotype replacement', *Acta Paediatr*, 99: 1686-90.
- Alves de Lima, K., J. Rustenhoven, and J. Kipnis. 2020. 'Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease', *Annu Rev Immunol*, 38: 597-620.
- Ampie, L., and D. B. McGavern. 2022. 'Immunological defense of CNS barriers against infections', *Immunity*, 55: 781-99.
- Arend, W. P., G. Palmer, and C. Gabay. 2008. 'IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines', *Immunol Rev*, 223: 20-38.
- Asano, T., K. Ichiki, S. Koizumi, K. Kaizu, T. Hatori, K. Mashiko, Y. Sakamoto, T. Miyasho, O. Fujino, and Y. Fukunaga. 2011. 'High mobility group box 1 in cerebrospinal fluid from several neurological diseases at early time points', *Int J Neurosci*, 121: 480-4.
- Attali, C., C. Durmort, T. Vernet, and A. M. Di Guilmi. 2008. 'The interaction of Streptococcus pneumoniae with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage', *Infect Immun*, 76: 5350-6.
- Bahmanpour, S., T. Talaei Khozani, A. Soleimani, and N. Zareifard. 2020. 'Germ cell differentiation of mouse embryonic stem cells can be influenced by the culture medium', *Biotech Histochem*, 95: 210-18.
- Bajénoff, M., J. G. Egen, L. Y. Koo, J. P. Laugier, F. Brau, N. Glaichenhaus, and R. N. Germain. 2006. 'Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes', *Immunity*, 25: 989-1001.
- Bao, Y., X. Wu, J. Chen, X. Hu, F. Zeng, J. Cheng, H. Jin, X. Lin, and L. F. Chen. 2017. 'Brd4 modulates the innate immune response through Mnk2-eIF4E pathway-dependent translational control of IκBα', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E3993-e4001.
- Barichello, T., I. dos Santos, G. D. Savi, L. R. Simões, T. Silvestre, C. M. Comim, D. Sachs, M. M. Teixeira, A. L. Teixeira, and J. Quevedo. 2010. 'TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae', *J Neuroimmunol*, 221: 42-5.
- Barichello, T., J. S. Generoso, L. R. Simões, S. G. Elias, and J. Quevedo. 2013. 'Role of oxidative stress in the pathophysiology of pneumococcal meningitis', *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 371465.
- Barichello, T., J. S. Pereira, G. D. Savi, J. S. Generoso, A. L. Cipriano, C. Silvestre, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, M. C. Vilela, and A. L. Teixeira. 2011. 'A kinetic study of the cytokine/chemokines levels and disruption of blood-brain barrier in infant rats after pneumococcal meningitis', *J Neuroimmunol*, 233: 12-7.
- Barrett, E., S. Brothers, C. Wahlestedt, and E. Beurel. 2014. 'I-BET151 selectively regulates IL-6 production', *Biochim Biophys Acta*, 1842: 1549-55.

- Basu, A., J. K. Krady, and S. W. Levison. 2004. 'Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation', *J Neurosci Res*, 78: 151-6.
- Behzadi, P., A. S. Sameer, S. Nissar, M. Z. Banday, M. Gajdacs, H. A. García-Perdomo, K. Akhtar, M. Pinheiro, P. Magnusson, M. Sarshar, and C. Ambrosi. 2022. 'The Interleukin-1 (IL-1) Superfamily Cytokines and Their Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)', *J Immunol Res*, 2022: 2054431.
- Bejjani, F., E. Evanno, K. Zibara, M. Piechaczyk, and I. Jariel-Encontre. 2019. 'The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command?', *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1872: 11-23.
- Belkina, A. C., B. S. Nikolajczyk, and G. V. Denis. 2013. 'BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses', *J Immunol*, 190: 3670-8.
- Best, J. L., C. A. Amezcua, B. Mayr, L. Flechner, C. M. Murawsky, B. Emerson, T. Zor, K. H. Gardner, and M. Montminy. 2004. 'Identification of small-molecule antagonists that inhibit an activator: coactivator interaction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 17622-7.
- Bewley, M. A., M. Naughton, J. Preston, A. Mitchell, A. Holmes, H. M. Marriott, R. C. Read, T. J. Mitchell, M. K. Whyte, and D. H. Dockrell. 2014. 'Pneumolysin activates macrophage lysosomal membrane permeabilization and executes apoptosis by distinct mechanisms without membrane pore formation', *mBio*, 5: e01710-14.
- Bijlsma, M. W., M. C. Brouwer, E. S. Kasanmoentalib, A. T. Kloek, M. J. Lucas, M. W. Tanck, A. van der Ende, and D. van de Beek. 2016. 'Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort study', *Lancet Infect Dis*, 16: 339-47.
- Blazer, S., M. Berant, and U. Alon. 1983. 'Bacterial meningitis. Effect of antibiotic treatment on cerebrospinal fluid', *Am J Clin Pathol*, 80: 386-7.
- Bombardieri, M., N. W. Kam, F. Brentano, K. Choi, A. Filer, D. Kyburz, I. B. McInnes, S. Gay, C. Buckley, and C. Pitzalis. 2011. 'A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells', *Ann Rheum Dis*, 70: 1857-65.
- Braun, J. S., O. Hoffmann, M. Schickhaus, D. Freyer, E. Dagand, D. Bermpohl, T. J. Mitchell, I. Bechmann, and J. R. Weber. 2007. 'Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage', *Infect Immun*, 75: 4245-54.
- Braun, J. S., J. E. Sublett, D. Freyer, T. J. Mitchell, J. L. Cleveland, E. I. Tuomanen, and J. R. Weber. 2002. 'Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis', *J Clin Invest*, 109: 19-27.
- Brentano, F., O. Schorr, R. E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2005. 'RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3', *Arthritis Rheum*, 52: 2656-65.
- Brivet, F. G., F. M. Jacobs, and B. Mégarbane. 2005. 'Cerebral output of cytokines in patients with pneumococcal meningitis', *Crit Care Med*, 33: 2721-2; author reply 22-3.
- Brouwer, M. C., J. C. Meijers, F. Baas, A. van der Ende, H. W. Pfister, A. Giese, D. van de Beek, and U. Koedel. 2014. 'Plasminogen activator inhibitor-1 influences cerebrovascular complications and death in pneumococcal meningitis', *Acta Neuropathol*, 127: 553-64.
- Brouwer, M. C., A. R. Tunkel, and D. van de Beek. 2010. 'Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis', *Clin Microbiol Rev*, 23: 467-92.
- Brouwer, M. C., and D. van de Beek. 2018. 'Epidemiology of community-acquired bacterial meningitis', *Curr Opin Infect Dis*, 31: 78-84.

- Buchholz, G., U. Koedel, H. W. Pfister, S. Kastenbauer, and M. Klein. 2016. 'Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis', *Crit Care*, 20: 312.
- Buechler, M. B., R. N. Pradhan, A. T. Krishnamurty, C. Cox, A. K. Calviello, A. W. Wang, Y. A. Yang, L. Tam, R. Caothien, M. Roose-Girma, Z. Modrusan, J. R. Arron, R. Bourgon, S. Müller, and S. J. Turley. 2021. 'Cross-tissue organization of the fibroblast lineage', *Nature*, 593: 575-79.
- Castelblanco, R. L., M. Lee, and R. Hasbun. 2014. 'Epidemiology of bacterial meningitis in the USA from 1997 to 2010: a population-based observational study', *Lancet Infect Dis*, 14: 813-9.
- Chan, J. K., J. Roth, J. J. Oppenheim, K. J. Tracey, T. Vogl, M. Feldmann, N. Horwood, and J. Nanchahal. 2012. 'Alarmins: awaiting a clinical response', *J Clin Invest*, 122: 2711-9.
- Chanput, W., J. J. Mes, and H. J. Wichers. 2014. 'THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach', *Int Immunopharmacol*, 23: 37-45.
- Chen, B., S. Tsui, and T. J. Smith. 2005. 'IL-1 beta induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy', *J Immunol*, 175: 1310-9.
- Chen, J. Q., N. N. Li, B. W. Wang, X. F. Liu, J. L. Liu, and Q. Chang. 2019. 'Upregulation of CBP by PLY can cause permeability of blood-brain barrier to increase meningitis', *J Biochem Mol Toxicol*, 33: e22333.
- Chen, J., Y. Wei, W. Yang, Q. Huang, Y. Chen, K. Zeng, and J. Chen. 2022. 'IL-6: The Link Between Inflammation, Immunity and Breast Cancer', *Front Oncol*, 12: 903800.
- Chen, X., Y. Li, S. Blankson, M. Liu, D. Huang, H. P. Redmond, J. Huang, J. H. Wang, and J. Wang. 2017. 'B7-H3 Augments Inflammatory Responses and Exacerbates Brain Damage via Amplifying NF- $\kappa$ B p65 and MAPK p38 Activation during Experimental Pneumococcal Meningitis', *PLoS One*, 12: e0171146.
- Cherazard, R., M. Epstein, T. L. Doan, T. Salim, S. Bharti, and M. A. Smith. 2017. 'Antimicrobial Resistant Streptococcus pneumoniae: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications', *Am J Ther*, 24: e361-e69.
- Chiavolini, D., S. Tripodi, R. Parigi, M. R. Oggioni, E. Blasi, M. Cintorino, G. Pozzi, and S. Ricci. 2004. 'Method for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice', *BMC Microbiol*, 4: 36.
- Cho, M. L., J. H. Ju, H. R. Kim, H. J. Oh, C. M. Kang, J. Y. Jhun, S. Y. Lee, M. K. Park, J. K. Min, S. H. Park, S. H. Lee, and H. Y. Kim. 2007. 'Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts', *Immunol Lett*, 108: 121-8.
- Christodoulides, M., B. L. Makepeace, K. A. Partridge, D. Kaur, M. I. Fowler, R. O. Weller, and J. E. Heckels. 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: 4035-44.
- Cockeran, R., C. Durandt, C. Feldman, T. J. Mitchell, and R. Anderson. 2002. 'Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro', *J Infect Dis*, 186: 562-5.
- Cook, M., H. Lin, S. K. Mishra, and G. Y. Wang. 2022. 'BAY 11-7082 inhibits the secretion of interleukin-6 by senescent human microglia', *Biochem Biophys Res Commun*, 617: 30-35.
- Cools, F., P. Delputte, and P. Cos. 2021. 'The search for novel treatment strategies for Streptococcus pneumoniae infections', *FEMS Microbiol Rev*, 45.

- Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte, and D. H. Dockrell. 2010. 'The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages', *PLoS One*, 5: e8668.
- Davidson, S., M. Coles, T. Thomas, G. Kollias, B. Ludewig, S. Turley, M. Brenner, and C. D. Buckley. 2021. 'Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer', *Nat Rev Immunol*, 21: 704-17.
- de Stoppelaar, S. F., T. A. Claushuis, M. C. Schaap, B. Hou, T. van der Poll, R. Nieuwland, and C. van 't Veer. 2016. 'Toll-Like Receptor Signalling Is Not Involved in Platelet Response to Streptococcus pneumoniae In Vitro or In Vivo', *PLoS One*, 11: e0156977.
- Decimo, I., S. Dolci, G. Panuccio, M. Riva, G. Fumagalli, and F. Bifari. 2021. 'Meninges: A Widespread Niche of Neural Progenitors for the Brain', *Neuroscientist*, 27: 506-28.
- Decimo, I., G. Fumagalli, V. Berton, M. Krampera, and F. Bifari. 2012. 'Meninges: from protective membrane to stem cell niche', *Am J Stem Cells*, 1: 92-105.
- Del Valle, D. M., S. Kim-Schulze, H. H. Huang, N. D. Beckmann, S. Nirenberg, B. Wang, Y. Lavin, T. H. Swartz, D. Madduri, A. Stock, T. U. Marron, H. Xie, M. Patel, K. Tuballes, O. Van Oekelen, A. Rahman, P. Kovatch, J. A. Aberg, E. Schadt, S. Jagannath, M. Mazumdar, A. W. Charney, A. Firpo-Betancourt, D. R. Mendu, J. Jhang, D. Reich, K. Sigel, C. Cordon-Cardo, M. Feldmann, S. Parekh, M. Merad, and S. Gnjjatic. 2020. 'An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival', *Nat Med*, 26: 1636-43.
- Derk, J., H. E. Jones, C. Como, B. Pawlikowski, and J. A. Siegenthaler. 2021. 'Living on the Edge of the CNS: Meninges Cell Diversity in Health and Disease', *Front Cell Neurosci*, 15: 703944.
- Dery, M. A., and R. Hasbun. 2007. 'Changing epidemiology of bacterial meningitis', *Curr Infect Dis Rep*, 9: 301-7.
- Deshmukh, S. D., B. Kremer, M. Freudenberg, S. Bauer, D. T. Golenbock, and P. Henneke. 2011. 'Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA', *EMBO Rep*, 12: 71-6.
- Devaiah, B. N., A. Gegonne, and D. S. Singer. 2016. 'Bromodomain 4: a cellular Swiss army knife', *J Leukoc Biol*, 100: 679-86.
- Dinarello, C. A. 2005a. 'An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor', *Immunity*, 23: 461-2.
- . 2005b. 'Interleukin-1beta', *Crit Care Med*, 33: S460-2.
- . 2011. 'A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation', *Eur J Immunol*, 41: 1203-17.
- Ding, W., C. Cai, X. Zhu, J. Wang, and Q. Jiang. 2022. 'Parthenolide ameliorates neurological deficits and neuroinflammation in mice with traumatic brain injury by suppressing STAT3/NF- $\kappa$ B and inflammasome activation', *Int Immunopharmacol*, 108: 108913.
- Dodge, P. R., and M. N. Swartz. 1965a. 'BACTERIAL MENINGITIS--A REVIEW OF SELECTED ASPECTS. II. SPECIAL NEUROLOGIC PROBLEMS, POSTMENINGITIC COMPLICATIONS AND CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS', *N Engl J Med*, 272: 954-60 contd.
- . 1965b. 'BACTERIAL MENINGITIS--A REVIEW OF SELECTED ASPECTS. II. SPECIAL NEUROLOGIC PROBLEMS, POSTMENINGITIC COMPLICATIONS AND CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS', *N Engl J Med*, 272: 1003-10 concl.

- Doran, K. S., M. Fulde, N. Gratz, B. J. Kim, R. Nau, N. Prasadarao, A. Schubert-Unkmeir, E. I. Tuomanen, and P. Valentin-Weigand. 2016. 'Host-pathogen interactions in bacterial meningitis', *Acta Neuropathol*, 131: 185-209.
- Dorrier, C. E., H. E. Jones, L. Pintarić, J. A. Siegenthaler, and R. Daneman. 2022. 'Emerging roles for CNS fibroblasts in health, injury and disease', *Nat Rev Neurosci*, 23: 23-34.
- Dyckhoff, S., I. Masouris, S. Hammerschmidt, B. Angele, V. Marathe, M. Atia, J. Buer, M. Klein, H. W. Pfister, C. Kirschning, and U. Koedel. 2019. 'Toll-like receptor 13 drives murine host immune defense in *Streptococcus pneumoniae* meningitis.', *ECCMID 2018, Madrid Abstract #O0665*.
- Dyckhoff, S., P. Oldemeier, B. Angele, T. Scholtysik, S. Hammerschmidt, C. Kirschning, and U. Koedel. 2018. 'The role of Toll-like receptor 13 in pneumococcal recognition by macrophages.', *ECCMID 2017, Vienna Abstract #P0459*.
- ECDC. 2020. 'European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm.'
- Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. L. Leib, W. Zimmerli, and R. Landmann. 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: 798-806.
- Edmond, K., A. Clark, V. S. Korczak, C. Sanderson, U. K. Griffiths, and I. Rudan. 2010. 'Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis', *Lancet Infect Dis*, 10: 317-28.
- Eigenbrod, T., K. Pelka, E. Latz, B. Kreikemeyer, and A. H. Dalpke. 2015. 'TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*', *J Immunol*, 195: 1092-9.
- Facci, L., M. Barbierato, C. Marinelli, C. Argentini, S. D. Skaper, and P. Giusti. 2014. 'Toll-like receptors 2, -3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1 $\beta$  release', *Sci Rep*, 4: 6824.
- Famà, A., A. Midiri, G. Mancuso, C. Biondo, G. Lentini, R. Galbo, M. M. Giardina, G. V. De Gaetano, L. Romeo, G. Teti, and C. Beninati. 2020. 'Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptors Play a Dominant Role in Innate Immune Recognition of Pneumococci', *mBio*, 11.
- Fan, B., G. Bordigari, J. Flammer, H. E. Killer, P. Meyer, and A. Neutzner. 2012. 'Meningothelial cells participate in immunological processes in the cerebrospinal fluid', *J Neuroimmunol*, 244: 45-50.
- Fielding, C. A., R. M. McLoughlin, L. McLeod, C. S. Colmont, M. Najdovska, D. Grail, M. Ernst, S. A. Jones, N. Topley, and B. J. Jenkins. 2008. 'IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3', *J Immunol*, 181: 2189-95.
- Filippakopoulos, P., J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, and J. E. Bradner. 2010. 'Selective inhibition of BET bromodomains', *Nature*, 468: 1067-73.
- Fitzgerald, K. A., and J. C. Kagan. 2020. 'Toll-like Receptors and the Control of Immunity', *Cell*, 180: 1044-66.
- Forte, E., M. Ramialison, H. T. Nim, M. Mara, J. Y. Li, R. Cohn, S. L. Daigle, S. Boyd, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, J. T. Hinson, M. W. Costa, N. A. Rosenthal, and M. B. Furtado. 2022. 'Adult mouse fibroblasts retain organ-specific transcriptomic identity', *Elife*, 11.

- Fousek, K., L. A. Horn, and C. Palena. 2021. 'Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression', *Pharmacol Ther*, 219: 107692.
- Fowler, M. I., R. O. Weller, J. E. Heckels, and M. Christodoulides. 2004. 'Different meningitis-causing bacteria induce distinct inflammatory responses on interaction with cells of the human meninges', *Cell Microbiol*, 6: 555-67.
- Frank-Bertoncelj, M., D. S. Pisetsky, C. Kolling, B. A. Michel, R. E. Gay, A. Jüngel, and S. Gay. 2018. 'TLR3 Ligand Poly(I:C) Exerts Distinct Actions in Synovial Fibroblasts When Delivered by Extracellular Vesicles', *Front Immunol*, 9: 28.
- Fritscher, J., D. Amberger, S. Dyckhoff, J. P. Bewersdorf, I. Masouris, S. Voelk, S. Hammerschmidt, H. M. Schmetzer, M. Klein, H. W. Pfister, and U. Koedel. 2018. 'Mast Cells Are Activated by Streptococcus pneumoniae In Vitro but Dispensable for the Host Defense Against Pneumococcal Central Nervous System Infection In Vivo', *Front Immunol*, 9: 550.
- Gadani, S. P., J. T. Walsh, J. R. Lukens, and J. Kipnis. 2015. 'Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury', *Neuron*, 87: 47-62.
- Galanis, I., A. Lindstrand, J. Darenberg, S. Browall, P. Nannapaneni, K. Sjöström, E. Morfeldt, P. Naucler, M. Blennow, Å Örtqvist, and B. Henriques-Normark. 2016. 'Effects of PCV7 and PCV13 on invasive pneumococcal disease and carriage in Stockholm, Sweden', *Eur Respir J*, 47: 1208-18.
- Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. García-Sáez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenin, U. M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, and G. Kroemer. 2018. 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018', *Cell Death Differ*, 25: 486-541.
- Garlanda, C., C. A. Dinarello, and A. Mantovani. 2013. 'The interleukin-1 family: back to the future', *Immunity*, 39: 1003-18.

- GBD 2016 Meningitis Collaborators. 2018. 'Global, regional, and national burden of meningitis, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *Lancet Neurol*, 17: 1061-82.
- Geldhoff, M., B. B. Mook-Kanamori, M. C. Brouwer, D. Troost, J. C. Leemans, R. A. Flavell, A. Van der Ende, T. Van der Poll, and D. Van de Beek. 2013. 'Inflammasome activation mediates inflammation and outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis', *BMC Infect Dis*, 13: 358.
- Gerber, J., K. Pohl, V. Sander, S. Bunkowski, and R. Nau. 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: 1313-7.
- Gilley, R. P., N. González-Juarbe, A. T. Shenoy, L. F. Reyes, P. H. Dube, M. I. Restrepo, and C. J. Orihuela. 2016. 'Infiltrated Macrophages Die of Pneumolysin-Mediated Necroptosis following Pneumococcal Myocardial Invasion', *Infect Immun*, 84: 1457-69.
- Gisch, N., T. Kohler, A. J. Ulmer, J. Müthing, T. Pribyl, K. Fischer, B. Lindner, S. Hammerschmidt, and U. Zähringer. 2013. 'Structural reevaluation of Streptococcus pneumoniae Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency', *J Biol Chem*, 288: 15654-67.
- González-Juarbe, N., K. M. Bradley, A. T. Shenoy, R. P. Gilley, L. F. Reyes, C. A. Hinojosa, M. I. Restrepo, P. H. Dube, M. A. Bergman, and C. J. Orihuela. 2017. 'Pore-forming toxin-mediated ion dysregulation leads to death receptor-independent necroptosis of lung epithelial cells during bacterial pneumonia', *Cell Death Differ*, 24: 917-28.
- González-Juarbe, N., R. P. Gilley, C. A. Hinojosa, K. M. Bradley, A. Kamei, G. Gao, P. H. Dube, M. A. Bergman, and C. J. Orihuela. 2015. 'Pore-Forming Toxins Induce Macrophage Necroptosis during Acute Bacterial Pneumonia', *PLoS Pathog*, 11: e1005337.
- González-Rubio, S., C. I. Linares, P. Aguilar-Melero, M. Rodríguez-Perálvarez, J. L. Montero-Álvarez, M. de la Mata, and G. Ferrín. 2016. 'AP-1 Inhibition by SR 11302 Protects Human Hepatoma HepG2 Cells from Bile Acid-Induced Cytotoxicity by Restoring the NOS-3 Expression', *PLoS One*, 11: e0160525.
- Green, J. A., T. Thi Hong Chau, J. J. Farrar, J. S. Friedland, and G. E. Thwaites. 2011. 'CNS infection, CSF matrix metalloproteinase concentrations, and clinical/laboratory features', *Neurology*, 76: 577-9.
- Guarner, J., L. Liu, J. Bhatnagar, T. Jones, M. Patel, M. DeLeon-Carnes, and S. R. Zaki. 2013. 'Neutrophilic bacterial meningitis: pathology and etiologic diagnosis of fatal cases', *Mod Pathol*, 26: 1076-85.
- Guo, N. H., J. F. Zheng, F. M. Zi, and J. Cheng. 2019. 'I-BET151 suppresses osteoclast formation and inflammatory cytokines secretion by targeting BRD4 in multiple myeloma', *Biosci Rep*, 39.
- Hanamsagar, R., M. L. Hanke, and T. Kielian. 2012. 'Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system', *Trends Immunol*, 33: 333-42.
- Händle, P., S. Dyckhoff-Shen, O. Gorka, B. Angele, H. W. Pfister, O. Gross, C. Kirschning, M. Klein, and U. Koedel. 2022. 'Macrophage pyroptosis aggravates inflammation and pathology in murine pneumococcal meningitis. ', *ECCMID 2020, Paris (Online) ID5155*.
- Hanke, M. L., and T. Kielian. 2011. 'Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential', *Clin Sci (Lond)*, 121: 367-87.
- Hanquet, G., P. Krizova, P. Valentiner-Branth, S. N. Ladhani, J. P. Nuorti, A. Lepoutre, J. Mereckiene, M. Knol, B. A. Winje, P. Ciruela, M. Ordobas, M. Guevara, E. McDonald,

- E. Morfeldt, J. Kozakova, H. C. Slotved, N. K. Fry, H. Rinta-Kokko, E. Varon, M. Corcoran, A. van der Ende, D. F. Vestrheim, C. Munoz-Almagro, P. Latasa, J. Castilla, A. Smith, B. Henriques-Normark, R. Whittaker, L. Pastore Celentano, and C. Savulescu. 2019. 'Effect of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive disease in older adults of 10 European countries: implications for adult vaccination', *Thorax*, 74: 473-82.
- Hasegawa, H., I. Mizoguchi, Y. Chiba, M. Ohashi, M. Xu, and T. Yoshimoto. 2016. 'Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family', *Front Immunol*, 7: 479.
- Hehner, S. P., T. G. Hofmann, W. Dröge, and M. L. Schmitz. 1999. 'The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex', *J Immunol*, 163: 5617-23.
- Hemion, C., J. Li, C. Kohler, H. P. N. Scholl, P. Meyer, H. E. Killer, and A. Neutzner. 2020. 'Clearance of neurotoxic peptides and proteins by meningeothelial cells', *Exp Cell Res*, 396: 112322.
- Hershko, D. D., B. W. Robb, G. Luo, and P. O. Hasselgren. 2002. 'Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283: R1140-8.
- Hirano, T. 2021. 'IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer', *Int Immunol*, 33: 127-48.
- Hirst, R. A., B. Gosai, A. Rutman, C. J. Guerin, P. Nicotera, P. W. Andrew, and C. O'Callaghan. 2008. 'Streptococcus pneumoniae deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis', *J Infect Dis*, 197: 744-51.
- Hirst, R. A., A. Kadioglu, C. O'Callaghan, and P. W. Andrew. 2004. 'The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis', *Clin Exp Immunol*, 138: 195-201.
- Hoegen, T., N. Tremel, M. Klein, B. Angele, H. Wagner, C. Kirschning, H. W. Pfister, A. Fontana, S. Hammerschmidt, and U. Koedel. 2011. 'The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release', *J Immunol*, 187: 5440-51.
- Hoffmann, O., J. Priller, T. Prozorovski, U. Schulze-Toppoff, N. Baeva, J. D. Lunemann, O. Aktas, C. Mahrhofer, S. Stricker, F. Zipp, and J. R. Weber. 2007. 'TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis', *J Clin Invest*, 117: 2004-13.
- Hoffmann, O., J. Zweigner, S. H. Smith, D. Freyer, C. Mahrhofer, E. Dagand, E. I. Tuomanen, and J. R. Weber. 2006. 'Interplay of pneumococcal hydrogen peroxide and host-derived nitric oxide', *Infect Immun*, 74: 5058-66.
- Höhne, C., M. Wenzel, B. Angele, S. Hammerschmidt, H. Häcker, M. Klein, A. Bierhaus, M. Sperandio, H. W. Pfister, and U. Koedel. 2013. 'High mobility group box 1 prolongs inflammation and worsens disease in pneumococcal meningitis', *Brain*, 136: 1746-59.
- Holm, T. H., D. Draeby, and T. Owens. 2012. 'Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response', *Glia*, 60: 630-8.
- Holt, D. J., L. M. Chamberlain, and D. W. Grainger. 2010. 'Cell-cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts', *Biomaterials*, 31: 9382-94.
- Hou, S. M., P. C. Chen, C. M. Lin, M. L. Fang, M. C. Chi, and J. F. Liu. 2020. 'CXCL1 contributes to IL-6 expression in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by CXCR2, c-Raf, MAPK, and AP-1 pathway', *Arthritis Res Ther*, 22: 251.
- Huang, B., X. D. Yang, M. M. Zhou, K. Ozato, and L. F. Chen. 2009. 'Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA', *Mol Cell Biol*, 29: 1375-87.

- Huang, C., W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, and Z. Dong. 1997. 'Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 5826-30.
- Hupp, S., C. Förtsch, F. Graber, T. J. Mitchell, and A. I. Iliev. 2022. 'Pneumolysin boosts the neuroinflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* through enhanced endocytosis', *Nat Commun*, 13: 5032.
- Iliev, A. I., J. R. Djannatian, R. Nau, T. J. Mitchell, and F. S. Wouters. 2007. 'Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 2897-902.
- Iliev, A. I., J. R. Djannatian, F. Opazo, J. Gerber, R. Nau, T. J. Mitchell, and F. S. Wouters. 2009. 'Rapid microtubule bundling and stabilization by the *Streptococcus pneumoniae* neurotoxin pneumolysin in a cholesterol-dependent, non-lytic and Src-kinase dependent manner inhibits intracellular trafficking', *Mol Microbiol*, 71: 461-77.
- Imöhl, M., J. Möller, R. R. Reinert, S. Perniciaro, M. van der Linden, and O. Aktas. 2015. 'Pneumococcal meningitis and vaccine effects in the era of conjugate vaccination: results of 20 years of nationwide surveillance in Germany', *BMC Infect Dis*, 15: 61.
- Iovino, F., J. Y. Engelen-Lee, M. Brouwer, D. van de Beek, A. van der Ende, M. Valls Seron, P. Mellroth, S. Muschiol, J. Bergstrand, J. Widengren, and B. Henriques-Normark. 2017. 'pIgR and PECAM-1 bind to pneumococcal adhesins RrgA and PspC mediating bacterial brain invasion', *J Exp Med*, 214: 1619-30.
- Iovino, F., C. J. Orihuela, H. E. Moorlag, G. Molema, and J. J. Bijlsma. 2013. 'Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis', *PLoS One*, 8: e68408.
- Irrera, N., M. Vaccaro, A. Bitto, G. Pallio, G. Pizzino, M. Lentini, V. Arcoraci, L. Minutoli, M. Scuruchi, G. Cutroneo, G. P. Anastasi, R. Ettari, F. Squadrito, and D. Altavilla. 2017. 'BAY 11-7082 inhibits the NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome pathways and protects against IMQ-induced psoriasis', *Clin Sci (Lond)*, 131: 487-98.
- Ishizuka, E. K., L. R. Filgueiras, F. J. Rios, C. H. Serezani, and S. Jancar. 2016. 'PAFR activation of NF- $\kappa$ B p65 or p105 precursor dictates pro- and anti-inflammatory responses during TLR activation in murine macrophages', *Sci Rep*, 6: 32092.
- Jacques, L. C., S. Panagiotou, M. Baltazar, M. Senghore, S. Khandaker, R. Xu, L. Bricio-Moreno, M. Yang, C. G. Dowson, D. B. Everett, D. R. Neill, and A. Kadioglu. 2020. 'Increased pathogenicity of pneumococcal serotype 1 is driven by rapid autolysis and release of pneumolysin', *Nat Commun*, 11: 1892.
- Jim, K. K., R. Aprianto, R. Koning, A. Domenech, J. Kurushima, D. van de Beek, C. M. J. Vandenbroucke-Grauls, W. Bitter, and J. W. Veening. 2022. 'Pneumolysin promotes host cell necroptosis and bacterial competence during pneumococcal meningitis as shown by whole-animal dual RNA-seq', *Cell Rep*, 41: 111851.
- Jones, S. A. 2005. 'Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6', *J Immunol*, 175: 3463-8.
- Jones, S. A., and B. J. Jenkins. 2018. 'Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer', *Nat Rev Immunol*, 18: 773-89.
- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D. V. Krysko. 2013. 'Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance', *Immunity*, 38: 209-23.
- Kalluri, R., and M. Zeisberg. 2006. 'Fibroblasts in cancer', *Nat Rev Cancer*, 6: 392-401.
- Kambiré, D., H. M. Soeters, R. Ouédraogo-Traoré, I. Medah, L. Sangare, I. Yaméogo, G. Sawadogo, A. S. Ouédraogo, S. Hema-Ouangraoua, L. McGee, V. Srinivasan, F. Aké, M. Congo-Ouédraogo, S. Sanou, A. K. Ba, R. T. Novak, and C. Van Beneden. 2016.

- 'Nationwide Trends in Bacterial Meningitis before the Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine-Burkina Faso, 2011-2013', *PLoS One*, 11: e0166384.
- Kanegaye, J. T., P. Soliemanzadeh, and J. S. Bradley. 2001. 'Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment', *Pediatrics*, 108: 1169-74.
- Kany, S., J. T. Vollrath, and B. Relja. 2019. 'Cytokines in Inflammatory Disease', *Int J Mol Sci*, 20.
- Karmakar, M., M. Katsnelson, H. A. Malak, N. G. Greene, S. J. Howell, A. G. Hise, A. Camilli, A. Kadioglu, G. R. Dubyak, and E. Pearlman. 2015. 'Neutrophil IL-1 $\beta$  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: 1763-75.
- Karri, V., C. Lidén, N. Fyhrquist, J. Högberg, and H. L. Karlsson. 2021. 'Impact of mono-culture vs. Co-culture of keratinocytes and monocytes on cytokine responses induced by important skin sensitizers', *J Immunotoxicol*, 18: 74-84.
- Kastenbauer, S., B. Angele, B. Sporer, H. W. Pfister, and U. Koedel. 2005. 'Patterns of protein expression in infectious meningitis: a cerebrospinal fluid protein array analysis', *J Neuroimmunol*, 164: 134-9.
- Kastenbauer, S., U. Koedel, B. F. Becker, and H. W. Pfister. 2002a. 'Oxidative stress in bacterial meningitis in humans', *Neurology*, 58: 186-91.
- . 2002b. 'Pneumococcal meningitis in the rat: evaluation of peroxynitrite scavengers for adjunctive therapy', *Eur J Pharmacol*, 449: 177-81.
- Kastenbauer, S., and H. W. Pfister. 2003. 'Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases', *Brain*, 126: 1015-25.
- Kawaguchiya, M., N. Urushibara, M. S. Aung, M. Ito, A. Takahashi, S. Habadera, and N. Kobayashi. 2020. 'High prevalence of antimicrobial resistance in non-vaccine serotypes of non-invasive/colonization isolates of *Streptococcus pneumoniae*: A cross-sectional study eight years after the licensure of conjugate vaccine in Japan', *J Infect Public Health*, 13: 1094-100.
- Kawai, T., and S. Akira. 2007. 'Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors', *Trends Mol Med*, 13: 460-9.
- Kawakami, T., K. Kawamura, K. Fujimori, A. Koike, and F. Amano. 2016. 'Influence of the culture medium on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase by activated macrophages in vitro', *Biochem Biophys Rep*, 5: 328-34.
- Kesavardhana, S., R. K. S. Malireddi, and T. D. Kanneganti. 2020. 'Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis', *Annu Rev Immunol*, 38: 567-95.
- Kim, J. V., S. S. Kang, M. L. Dustin, and D. B. McGavern. 2009. 'Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis', *Nature*, 457: 191-5.
- Kim, J. Y., J. C. Paton, D. E. Briles, D. K. Rhee, and S. Pyo. 2015. 'Streptococcus pneumoniae induces pyroptosis through the regulation of autophagy in murine microglia', *Oncotarget*, 6: 44161-78.
- Kitur, K., D. Parker, P. Nieto, D. S. Ahn, T. S. Cohen, S. Chung, S. Wachtel, S. Bueno, and A. Prince. 2015. 'Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage', *PLoS Pathog*, 11: e1004820.
- Klein, M., U. Koedel, T. Pfefferkorn, G. Zeller, B. Woehrl, and H. W. Pfister. 2011. 'Arterial cerebrovascular complications in 94 adults with acute bacterial meningitis', *Crit Care*, 15: R281.

- Klein, M., U. Koedel, and H. W. Pfister. 2006. 'Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy?', *Prog Neurobiol*, 80: 269-80.
- Klein, M., B. Obermaier, B. Angele, H. W. Pfister, H. Wagner, U. Koedel, and C. J. Kirschning. 2008. 'Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4', *J Infect Dis*, 198: 1028-36.
- Klein, M., R. Paul, B. Angele, B. Popp, H. W. Pfister, and U. Koedel. 2006. 'Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis', *Microbes Infect*, 8: 974-83.
- Klein, M., C. Schmidt, S. Kastenbauer, R. Paul, C. J. Kirschning, H. Wagner, B. Popp, H. W. Pfister, and U. Koedel. 2007. 'MyD88-dependent immune response contributes to hearing loss in experimental pneumococcal meningitis', *J Infect Dis*, 195: 1189-93.
- Kloek, A. T., M. C. Brouwer, B. Schmand, M. W. T. Tanck, and D. van de Beek. 2020. 'Long-term neurologic and cognitive outcome and quality of life in adults after pneumococcal meningitis', *Clin Microbiol Infect*.
- Koedel, U., B. Angele, T. Rupprecht, H. Wagner, A. Roggenkamp, H. W. Pfister, and C. J. Kirschning. 2003. 'Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis', *J Immunol*, 170: 438-44.
- Koedel, U., I. Bayerlein, R. Paul, B. Sporer, and H. W. Pfister. 2000. 'Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis', *J Infect Dis*, 182: 1437-45.
- Koedel, U., T. Frankenberg, S. Kirschnek, B. Obermaier, H. Häcker, R. Paul, and G. Häcker. 2009. 'Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis', *PLoS Pathog*, 5: e1000461.
- Koedel, U., M. Klein, and H. W. Pfister. 2009. 'Acute Bacterial Meningitis: Current Trends in Research and Clinical Practice'.
- . 2010. 'New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis', *Curr Opin Infect Dis*, 23: 217-23.
- Koedel, U., T. Rupprecht, B. Angele, J. Heesemann, H. Wagner, H. W. Pfister, and C. J. Kirschning. 2004. 'MyD88 is required for mounting a robust host immune response to Streptococcus pneumoniae in the CNS', *Brain*, 127: 1437-45.
- Koedel, U., W. M. Scheld, and H. W. Pfister. 2002. 'Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis', *Lancet Infect Dis*, 2: 721-36.
- Koedel, U., F. Winkler, B. Angele, A. Fontana, R. A. Flavell, and H. W. Pfister. 2002. 'Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice', *Ann Neurol*, 51: 319-29.
- Koelman, D. L. H., M. C. Brouwer, L. Ter Horst, M. W. Bijlsma, A. van der Ende, and D. van de Beek. 2022. 'Pneumococcal Meningitis in Adults: A Prospective Nationwide Cohort Study Over a 20-year Period', *Clin Infect Dis*, 74: 657-67.
- Koelman, D. L. H., M. C. Brouwer, and D. van de Beek. 2020. 'Resurgence of pneumococcal meningitis in Europe and Northern America', *Clin Microbiol Infect*, 26: 199-204.
- Komuta, Y., X. Teng, H. Yanagisawa, K. Sango, K. Kawamura, and H. Kawano. 2010. 'Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain', *Cell Mol Neurobiol*, 30: 101-11.
- Koppe, U., N. Suttorp, and B. Opitz. 2012. 'Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system', *Cell Microbiol*, 14: 460-6.
- Krausgruber, T., N. Fortelny, V. Fife-Gernedl, M. Senekowitsch, L. C. Schuster, A. Lercher, A. Nemeč, C. Schmidl, A. F. Rendeiro, A. Bergthaler, and C. Bock. 2020. 'Structural cells are key regulators of organ-specific immune responses', *Nature*, 583: 296-302.

- Kuznik, A., M. Bencina, U. Svajger, M. Jeras, B. Rozman, and R. Jerala. 2011. 'Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines', *J Immunol*, 186: 4794-804.
- Kwok, B. H., B. Koh, M. I. Ndubuisi, M. Elofsson, and C. M. Crews. 2001. 'The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase', *Chem Biol*, 8: 759-66.
- Ladhani, S. N., S. Collins, A. Djennad, C. L. Sheppard, R. Borrow, N. K. Fry, N. J. Andrews, E. Miller, and M. E. Ramsay. 2018. 'Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000-17: a prospective national observational cohort study', *Lancet Infect Dis*, 18: 441-51.
- Lamkanfi, M. 2011. 'Emerging inflammasome effector mechanisms', *Nat Rev Immunol*, 11: 213-20.
- Lamkanfi, M., and V. M. Dixit. 2014. 'Mechanisms and functions of inflammasomes', *Cell*, 157: 1013-22.
- Lee, B. L., J. E. Moon, J. H. Shu, L. Yuan, Z. R. Newman, R. Schekman, and G. M. Barton. 2013. 'UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs', *Elife*, 2: e00291.
- Lee, J., M. H. Rhee, E. Kim, and J. Y. Cho. 2012. 'BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets', *Mediators Inflamm*, 2012: 416036.
- Lee, K. S., C. A. Scanga, E. M. Bachelder, Q. Chen, and C. M. Snapper. 2007. 'TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to Streptococcus pneumoniae', *Cell Immunol*, 245: 103-10.
- Leib, S. L., D. Leppert, J. Clements, and M. G. Täuber. 2000. 'Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis', *Infect Immun*, 68: 615-20.
- Leppert, D., S. L. Leib, C. Grygar, K. M. Miller, U. B. Schaad, and G. A. Holländer. 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: 80-4.
- Li, L., C. Acioglu, R. F. Heary, and S. Elkabes. 2021. 'Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases', *Brain Behav Immun*, 91: 740-55.
- Liddel, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Münch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, and B. A. Barres. 2017. 'Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia', *Nature*, 541: 481-87.
- Liebner, S., R. M. Dijkhuizen, Y. Reiss, K. H. Plate, D. Agalliu, and G. Constantin. 2018. 'Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease', *Acta Neuropathol*, 135: 311-36.
- Liechti, F. D., F. Bächtold, D. Grandgirard, D. Leppert, and S. L. Leib. 2015. 'The matrix metalloproteinase inhibitor RS-130830 attenuates brain injury in experimental pneumococcal meningitis', *J Neuroinflammation*, 12: 43.
- Liechti, F. D., D. Grandgirard, D. Leppert, and S. L. Leib. 2014. 'Matrix metalloproteinase inhibition lowers mortality and brain injury in experimental pneumococcal meningitis', *Infect Immun*, 82: 1710-8.

- Littmann, M., B. Albiger, A. Frentzen, S. Normark, B. Henriques-Normark, and L. Plant. 2009. 'Streptococcus pneumoniae evades human dendritic cell surveillance by pneumolysin expression', *EMBO Mol Med*, 1: 211-22.
- Lopez-Cazaux, S., G. Bluteau, D. Magne, B. Lieubeau, J. Guicheux, and B. Alliot-Licht. 2006. 'Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note', *Eur Cell Mater*, 11: 35-42; discussion 42.
- Loughran, A. J., C. J. Orihuela, and E. I. Tuomanen. 2019. 'Streptococcus pneumoniae: Invasion and Inflammation', *Microbiol Spectr*, 7.
- Lu, Y., B. Li, A. Xu, X. Liang, T. Xu, H. Jin, Y. Xie, R. Wang, X. Liu, X. Gao, Y. Han, and J. Zeng. 2022. 'NF- $\kappa$ B and AP-1 are required for the lipopolysaccharide-induced expression of MCP-1, CXCL1, and Cx43 in cultured rat dorsal spinal cord astrocytes', *Front Mol Neurosci*, 15: 859558.
- Lucas, M. J., M. C. Brouwer, and D. van de Beek. 2016. 'Neurological sequelae of bacterial meningitis', *J Infect*, 73: 18-27.
- Luo, Y., and S. G. Zheng. 2016. 'Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms', *Front Immunol*, 7: 604.
- Magliozzi, R., O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds, and F. Aloisi. 2007. 'Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology', *Brain*, 130: 1089-104.
- Makihara, N., K. Arimura, T. Ago, M. Tachibana, A. Nishimura, K. Nakamura, R. Matsuo, Y. Wakisaka, J. Kuroda, H. Sugimori, M. Kamouchi, and T. Kitazono. 2015. 'Involvement of platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke', *Exp Neurol*, 264: 127-34.
- Malley, R., P. Henneke, S. C. Morse, M. J. Cieslewicz, M. Lipsitch, C. M. Thompson, E. Kurt-Jones, J. C. Paton, M. R. Wessels, and D. T. Golenbock. 2003. 'Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 1966-71.
- Månberg, A., N. Skene, F. Sanders, M. Trusohamn, J. Remnestål, A. Szczepińska, I. S. Aksoylu, P. Lönnnerberg, L. Ebarasi, S. Wouters, M. Lehmann, J. Olofsson, I. von Gohren Antequera, A. Domaniku, M. De Schaepdryver, J. De Vocht, K. Poesen, M. Uhlén, J. Anink, C. Mijnsbergen, H. Vergunst-Bosch, A. Hübers, U. Kläppe, E. Rodriguez-Vieitez, J. D. Gilthorpe, E. Hedlund, R. A. Harris, E. Aronica, P. Van Damme, A. Ludolph, J. Veldink, C. Ingre, P. Nilsson, and S. A. Lewandowski. 2021. 'Altered perivascular fibroblast activity precedes ALS disease onset', *Nat Med*, 27: 640-46.
- Matsunaga, N., N. Tsuchimori, T. Matsumoto, and M. Ii. 2011. 'TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules', *Mol Pharmacol*, 79: 34-41.
- McGettrick, H. M., L. M. Butler, C. D. Buckley, G. E. Rainger, and G. B. Nash. 2012. 'Tissue stroma as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation', *J Leukoc Biol*, 91: 385-400.
- McGill, F., R. S. Heyderman, S. Panagiotou, A. R. Tunkel, and T. Solomon. 2016. 'Acute bacterial meningitis in adults', *Lancet*, 388: 3036-47.
- McIntyre, P. B., K. L. O'Brien, B. Greenwood, and D. van de Beek. 2012. 'Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide', *Lancet*, 380: 1703-11.

- McLoughlin, R. M., B. J. Jenkins, D. Grail, A. S. Williams, C. A. Fielding, C. R. Parker, M. Ernst, N. Topley, and S. A. Jones. 2005. 'IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 9589-94.
- McLoughlin, R. M., J. Witowski, R. L. Robson, T. S. Wilkinson, S. M. Hurst, A. S. Williams, J. D. Williams, S. Rose-John, S. A. Jones, and N. Topley. 2003. 'Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation', *J Clin Invest*, 112: 598-607.
- McNeela, E. A., A. Burke, D. R. Neill, C. Baxter, V. E. Fernandes, D. Ferreira, S. Smeaton, R. El-Rachkidy, R. M. McLoughlin, A. Mori, B. Moran, K. A. Fitzgerald, J. Tschopp, V. Pétrilli, P. W. Andrew, A. Kadioglu, and E. C. Lavelle. 2010. 'Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4', *PLoS Pathog*, 6: e1001191.
- Mihara, M., M. Hashizume, H. Yoshida, M. Suzuki, and M. Shiina. 2012. 'IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions', *Clin Sci (Lond)*, 122: 143-59.
- Mitchell, S., J. Vargas, and A. Hoffmann. 2016. 'Signaling via the NF $\kappa$ B system', *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 8: 227-41.
- Moen, S. H., B. Ehrnström, J. F. Kojen, M. Yurchenko, K. S. Beckwith, J. E. Afset, J. K. Damås, Z. Hu, H. Yin, T. Espevik, and J. Stenvik. 2019. 'Human Toll-like Receptor 8 (TLR8) Is an Important Sensor of Pyogenic Bacteria, and Is Attenuated by Cell Surface TLR Signaling', *Front Immunol*, 10: 1209.
- Mogensen, T. H., S. R. Paludan, M. Kilian, and L. Ostergaard. 2006. 'Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns', *J Leukoc Biol*, 80: 267-77.
- Møller, K., F. S. Larsen, J. Qvist, J. H. Wandall, G. M. Knudsen, I. E. Gjørup, and P. Skinhøj. 2000. 'Dependency of cerebral blood flow on mean arterial pressure in patients with acute bacterial meningitis', *Crit Care Med*, 28: 1027-32.
- Mook-Kanamori, B. B., M. Geldhoff, T. van der Poll, and D. van de Beek. 2011. 'Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis', *Clin Microbiol Rev*, 24: 557-91.
- Moore, M. R., R. Link-Gelles, W. Schaffner, R. Lynfield, C. Lexau, N. M. Bennett, S. Petit, S. M. Zansky, L. H. Harrison, A. Reingold, L. Miller, K. Scherzinger, A. Thomas, M. M. Farley, E. R. Zell, T. H. Taylor, Jr., T. Pondo, L. Rodgers, L. McGee, B. Beall, J. H. Jorgensen, and C. G. Whitney. 2015. 'Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance', *Lancet Infect Dis*, 15: 301-9.
- Mori, N., Y. Yamada, S. Ikeda, Y. Yamasaki, K. Tsukasaki, Y. Tanaka, M. Tomonaga, N. Yamamoto, and M. Fujii. 2002. 'Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells', *Blood*, 100: 1828-34.
- Muhl, L., G. Genové, S. Leptidis, J. Liu, L. He, G. Mocci, Y. Sun, S. Gustafsson, B. Buyandelger, I. V. Chivukula, Å Segerstolpe, E. Raschperger, E. M. Hansson, J. L. M. Björkegren, X. R. Peng, M. Vanlandewijck, U. Lendahl, and C. Betsholtz. 2020. 'Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination', *Nat Commun*, 11: 3953.
- Mustafa, M. M., M. H. Lebel, O. Ramilo, K. D. Olsen, J. S. Reisch, B. Beutler, and G. H. McCracken, Jr. 1989. 'Correlation of interleukin-1 beta and cachectin concentrations in cerebrospinal fluid and outcome from bacterial meningitis', *J Pediatr*, 115: 208-13.

- Naucler, P., I. Galanis, E. Morfeldt, J. Darenberg, Å Örtqvist, and B. Henriques-Normark. 2017. 'Comparison of the Impact of Pneumococcal Conjugate Vaccine 10 or Pneumococcal Conjugate Vaccine 13 on Invasive Pneumococcal Disease in Equivalent Populations', *Clin Infect Dis*, 65: 1780-89.
- Nishimoto, A. T., J. W. Rosch, and E. I. Tuomanen. 2020. 'Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target', *Front Microbiol*, 11: 1543.
- Olarte, L., W. J. Barson, R. M. Barson, P. L. Lin, J. R. Romero, T. Q. Tan, L. B. Givner, J. S. Bradley, J. A. Hoffman, K. G. Hultén, E. O. Mason, and S. L. Kaplan. 2015. 'Impact of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Meningitis in US Children', *Clin Infect Dis*, 61: 767-75.
- Oldenburg, M., A. Krüger, R. Ferstl, A. Kaufmann, G. Nees, A. Sigmund, B. Bathke, H. Lauterbach, M. Suter, S. Dreher, U. Koedel, S. Akira, T. Kawai, J. Buer, H. Wagner, S. Bauer, H. Hochrein, and C. J. Kirschning. 2012. 'TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification', *Science*, 337: 1111-5.
- Orihuela, C. J., G. Gao, K. P. Francis, J. Yu, and E. I. Tuomanen. 2004. 'Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis', *J Infect Dis*, 190: 1661-9.
- Orihuela, C. J., J. Mahdavi, J. Thornton, B. Mann, K. G. Wooldridge, N. Abouseada, N. J. Oldfield, T. Self, D. A. Ala'Aldeen, and E. I. Tuomanen. 2009. 'Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models', *J Clin Invest*, 119: 1638-46.
- Østergaard, C., C. Brandt, H. B. Konradsen, and S. Samuelsson. 2004. 'Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models', *J Infect Dis*, 190: 1212-20.
- Østergaard, C., H. B. Konradsen, and S. Samuelsson. 2005. 'Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection', *BMC Infect Dis*, 5: 93.
- Ostergaard, C., R. V. Yieng-Kow, T. Benfield, N. Frimodt-Møller, F. Espersen, and J. D. Lundgren. 2000. 'Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits', *Infect Immun*, 68: 3153-7.
- Ostergaard, C., R. V. Yieng-Kow, C. G. Larsen, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Benfield, N. Frimodt-Møller, F. Espersen, A. Kharazmi, and J. D. Lundgren. 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: 207-11.
- Paul, R., U. Koedel, F. Winkler, B. C. Kieseier, A. Fontana, M. Kopf, H. P. Hartung, and H. W. Pfister. 2003. 'Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis', *Brain*, 126: 1873-82.
- Paul, R., S. Lorenzl, U. Koedel, B. Sporer, U. Vogel, M. Frosch, and H. W. Pfister. 1998. 'Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis', *Ann Neurol*, 44: 592-600.
- Pelka, K., D. Bertheloot, E. Reimer, K. Phulphagar, S. V. Schmidt, A. Christ, R. Stahl, N. Watson, K. Miyake, N. Hacohen, A. Haas, M. M. Brinkmann, A. Marshak-Rothstein, F. Meissner, and E. Latz. 2018. 'The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport', *Immunity*, 48: 911-22.e7.
- Pereira, J. M., S. Xu, J. M. Leong, and S. Sousa. 2022. 'The Yin and Yang of Pneumolysin During Pneumococcal Infection', *Front Immunol*, 13: 878244.

- Perez-Alcazar, M., G. Culley, T. Lyckenvik, K. Mobarrez, A. Bjorefeldt, P. Wasling, H. Seth, F. Asztely, A. Harrer, B. Iglseider, L. Aigner, E. Hanse, and S. Illes. 2016. 'Human Cerebrospinal Fluid Promotes Neuronal Viability and Activity of Hippocampal Neuronal Circuits In Vitro', *Front Cell Neurosci*, 10: 54.
- Pfister, H. W., G. D. Borasio, U. Dirnagl, M. Bauer, and K. M. Einhäupl. 1992. 'Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults', *Neurology*, 42: 1497-504.
- Pikor, N. B., J. L. Astarita, L. Summers-Deluca, G. Galicia, J. Qu, L. A. Ward, S. Armstrong, C. X. Dominguez, D. Malhotra, B. Heiden, R. Kay, V. Castanov, H. Touil, L. Boon, P. O'Connor, A. Bar-Or, A. Prat, V. Ramaglia, S. Ludwin, S. J. Turley, and J. L. Gommerman. 2015. 'Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation', *Immunity*, 43: 1160-73.
- Pikor, N. B., J. Cupovic, L. Onder, J. L. Gommerman, and B. Ludewig. 2017. 'Stromal Cell Niches in the Inflamed Central Nervous System', *J Immunol*, 198: 1775-81.
- Ploeger, D. T., N. A. Hosper, M. Schipper, J. A. Koerts, S. de Rond, and R. A. Bank. 2013. 'Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts', *Cell Commun Signal*, 11: 29.
- Polfliet, M. M., P. J. Zwijnenburg, A. M. van Furth, T. van der Poll, E. A. Döpp, C. Renardel de Lavalette, E. M. van Kesteren-Hendriks, N. van Rooijen, C. D. Dijkstra, and T. K. van den Berg. 2001. 'Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis', *J Immunol*, 167: 4644-50.
- Püttmann, S., V. Senner, S. Braune, B. Hillmann, R. Exeler, C. H. Rickert, and W. Paulus. 2005. 'Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization', *Lab Invest*, 85: 1163-71.
- Raboba, J. L., V. L. Rahajamanana, E. P. R. Andriatahirintsoa, A. C. Razafindrakoto, A. M. Andrianarivelo, M. Nimpa Mengouo, Y. Vuo Masembe, G. G. Weldegebriel, L. de Gouveia, J. M. Mwenda, and A. L. Robinson. 2021. 'Decline in Vaccine-Type Streptococcus pneumoniae Serotypes Following Pneumococcal Conjugate Vaccine Introduction in Madagascar', *J Infect Dis*, 224: S285-s92.
- Radin, J. N., C. J. Orihuela, G. Murti, C. Guglielmo, P. J. Murray, and E. I. Tuomanen. 2005. 'beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of Streptococcus pneumoniae', *Infect Immun*, 73: 7827-35.
- Ratner, A. J., K. R. Hippe, J. L. Aguilar, M. H. Bender, A. L. Nelson, and J. N. Weiser. 2006. 'Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins', *J Biol Chem*, 281: 12994-8.
- Riegler, A. N., T. Brissac, N. Gonzalez-Juarbe, and C. J. Orihuela. 2019. 'Necroptotic Cell Death Promotes Adaptive Immunity Against Colonizing Pneumococci', *Front Immunol*, 10: 615.
- Rodriguez, A. F., S. L. Kaplan, E. P. Hawkins, and E. O. Mason, Jr. 1991. 'Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model', *J Infect Dis*, 164: 1207-9.
- Rorke, L. B., and F. W. Pitts. 1963. 'Purulent meningitis: the pathologic basis of clinical manifestations', *Clin Pediatr (Phila)*, 2: 64-71.
- Rose-John, S. 2018. 'Interleukin-6 Family Cytokines', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.
- Rosenberg, G. A. 2009. 'Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases', *Lancet Neurol*, 8: 205-16.

- Royer, P. J., A. J. Rogers, K. G. Wooldridge, P. Tighe, J. Mahdavi, M. G. Rittig, and D. Ala'Aldeen. 2013. 'Deciphering the contribution of human meningotheelial cells to the inflammatory and antimicrobial response at the meninges', *Infect Immun*, 81: 4299-310.
- Satoh, T., and S. Akira. 2016. 'Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins', *Microbiol Spectr*, 4.
- Schaefer, L. 2014. 'Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns', *J Biol Chem*, 289: 35237-45.
- Schaper, M., S. Gergely, J. Lykkesfeldt, J. Zbären, S. L. Leib, M. G. Täuber, and S. Christen. 2002. 'Cerebral vasculature is the major target of oxidative protein alterations in bacterial meningitis', *J Neuropathol Exp Neurol*, 61: 605-13.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John. 2011. 'The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6', *Biochim Biophys Acta*, 1813: 878-88.
- Schneider, O., U. Michel, G. Zysk, O. Dubuis, and R. Nau. 1999. 'Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations', *Neurology*, 53: 1584-7.
- Schulze-Lohoff, E., C. Hugo, S. Rost, S. Arnold, A. Gruber, B. Brüne, and R. B. Sterzel. 1998. 'Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors', *Am J Physiol*, 275: F962-71.
- Schuster, R., J. S. Rockel, M. Kapoor, and B. Hinz. 2021. 'The inflammatory speech of fibroblasts', *Immunol Rev*, 302: 126-46.
- Schut, E. S., M. C. Brouwer, J. de Gans, S. Florquin, D. Troost, and D. van de Beek. 2009. 'Delayed cerebral thrombosis after initial good recovery from pneumococcal meningitis', *Neurology*, 73: 1988-95.
- Schut, E. S., M. J. Lucas, M. C. Brouwer, M. D. Vergouwen, A. van der Ende, and D. van de Beek. 2012. 'Cerebral infarction in adults with bacterial meningitis', *Neurocrit Care*, 16: 421-7.
- Seal, J., Y. Lamotte, F. Donche, A. Bouillot, O. Mirguet, F. Gellibert, E. Nicodeme, G. Krysa, J. Kirilovsky, S. Beinke, S. McCleary, I. Rioja, P. Bamborough, C. W. Chung, L. Gordon, T. Lewis, A. L. Walker, L. Cutler, D. Lugo, D. M. Wilson, J. Witherington, K. Lee, and R. K. Prinjha. 2012. 'Identification of a novel series of BET family bromodomain inhibitors: binding mode and profile of I-BET151 (GSK1210151A)', *Bioorg Med Chem Lett*, 22: 2968-72.
- Selke, P., K. Bork, T. Zhang, M. Wuhrer, C. Strauss, R. Horstkorte, and M. Scheer. 2021. 'Glycation Interferes with the Expression of Sialyltransferases in Meningiomas', *Cells*, 10.
- Sellner, J., and S. L. Leib. 2006. 'In bacterial meningitis cortical brain damage is associated with changes in parenchymal MMP-9/TIMP-1 ratio and increased collagen type IV degradation', *Neurobiol Dis*, 21: 647-56.
- Serlin, Y., I. Shelef, B. Knyazer, and A. Friedman. 2015. 'Anatomy and physiology of the blood-brain barrier', *Semin Cell Dev Biol*, 38: 2-6.
- Shao, S., H. Xia, M. Hu, C. Chen, J. Fu, G. Shi, Q. Guo, Y. Zhou, W. Wang, J. Shi, and T. Zhang. 2020. 'Isotalatizidine, a C(19)-diterpenoid alkaloid, attenuates chronic neuropathic pain through stimulating ERK/CREB signaling pathway-mediated microglial dynorphin A expression', *J Neuroinflammation*, 17: 13.
- Sharif, Y., F. Jumah, L. Coplan, A. Krosser, K. Sharif, and R. S. Tubbs. 2018. 'Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease', *Clin Anat*, 31: 812-23.

- Shi, X., C. Liu, B. Liu, J. Chen, X. Wu, and W. Gong. 2018. 'JQ1: a novel potential therapeutic target', *Pharmazie*, 73: 491-93.
- Shoma, S., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Nomura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, and M. Mitsuyama. 2008. 'Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin- $\alpha$  and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation', *Infect Immun*, 76: 1547-57.
- Shu, Z., J. Yuan, H. Wang, J. Zhang, S. Li, H. Zhang, Y. Liu, Y. Yin, and X. Zhang. 2020. 'Streptococcus pneumoniae PepO promotes host anti-infection defense via autophagy in a Toll-like receptor 2/4 dependent manner', *Virulence*, 11: 270-82.
- Sims, J. E., and D. E. Smith. 2010. 'The IL-1 family: regulators of immunity', *Nat Rev Immunol*, 10: 89-102.
- Sobota, R., M. Szwed, A. Kasza, M. Bugno, and T. Kordula. 2000. 'Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family', *Biochem Biophys Res Commun*, 267: 329-33.
- Soderblom, C., X. Luo, E. Blumenthal, E. Bray, K. Lyapichev, J. Ramos, V. Krishnan, C. Lai-Hsu, K. K. Park, P. Tsoulfas, and J. K. Lee. 2013. 'Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury', *J Neurosci*, 33: 13882-7.
- Spanaus, K. S., D. Nadal, H. W. Pfister, J. Seebach, U. Widmer, K. Frei, S. Gloor, and A. Fontana. 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: 1956-64.
- Strickson, S., D. G. Campbell, C. H. Emmerich, A. Knebel, L. Plater, M. S. Ritorto, N. Shpiro, and P. Cohen. 2013. 'The anti-inflammatory drug BAY 11-7082 suppresses the MyD88-dependent signalling network by targeting the ubiquitin system', *Biochem J*, 451: 427-37.
- Stucki, A., M. Cottagnoud, V. Winkelmann, T. Schaffner, and P. Cottagnoud. 2007. 'Daptomycin produces an enhanced bactericidal activity compared to ceftriaxone, measured by [ $^3$ 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: 2249-52.
- Subramanian, K., D. R. Neill, H. A. Malak, L. Spelmink, S. Khandaker, G. Dalla Libera Marchiori, E. Dearing, A. Kirby, M. Yang, A. Achour, J. Nilvebrant, PÅ Nygren, L. Plant, A. Kadioglu, and B. Henriques-Normark. 2019. 'Pneumolysin binds to the mannose receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival', *Nat Microbiol*, 4: 62-70.
- Sun, Y., Y. Wang, T. Toubai, K. Oravec-Wilson, C. Liu, N. Mathewson, J. Wu, C. Rossi, E. Cummings, D. Wu, S. Wang, and P. Reddy. 2015. 'BET bromodomain inhibition suppresses graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice', *Blood*, 125: 2724-8.
- Surabhi, S., F. Cuypers, S. Hammerschmidt, and N. Siemens. 2020. 'The Role of NLRP3 Inflammasome in Pneumococcal Infections', *Front Immunol*, 11: 614801.
- Surve, M. V., S. Bhutda, A. Datey, A. Anil, S. Rawat, A. Pushpakaran, D. Singh, K. S. Kim, D. Chakravorty, and A. Banerjee. 2018. 'Heterogeneity in pneumolysin expression governs the fate of *Streptococcus pneumoniae* during blood-brain barrier trafficking', *PLoS Pathog*, 14: e1007168.
- Sweeney, M. D., Z. Zhao, A. Montagne, A. R. Nelson, and B. V. Zlokovic. 2019. 'Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back', *Physiol Rev*, 99: 21-78.

- Tabeta, K., K. Hoebe, E. M. Janssen, X. Du, P. Georgel, K. Crozat, S. Mudd, N. Mann, S. Sovath, J. Goode, L. Shamel, A. A. Herskovits, D. A. Portnoy, M. Cooke, L. M. Tarantino, T. Wiltshire, B. E. Steinberg, S. Grinstein, and B. Beutler. 2006. 'The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9', *Nat Immunol*, 7: 156-64.
- Tabusi, M., S. Thorsdottir, M. Lysandrou, A. R. Narciso, M. Minoia, C. V. Srambickal, J. Widengren, B. Henriques-Normark, and F. Iovino. 2021. 'Neuronal death in pneumococcal meningitis is triggered by pneumolysin and RrgA interactions with  $\beta$ -actin', *PLoS Pathog*, 17: e1009432.
- Tacconelli, E., E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outtersson, J. Patel, M. Cavalieri, E. M. Cox, C. R. Houchens, M. L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, and N. Magrini. 2018. 'Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis', *Lancet Infect Dis*, 18: 318-27.
- Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto. 2014. 'IL-6 in inflammation, immunity, and disease', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a016295.
- Tang, D., R. Kang, L. Cao, G. Zhang, Y. Yu, W. Xiao, H. Wang, and X. Xiao. 2008. 'A pilot study to detect high mobility group box 1 and heat shock protein 72 in cerebrospinal fluid of pediatric patients with meningitis', *Crit Care Med*, 36: 291-5.
- Too, L. K., B. Yau, A. G. Baxter, I. S. McGregor, and N. H. Hunt. 2019. 'Double deficiency of toll-like receptors 2 and 4 alters long-term neurological sequelae in mice cured of pneumococcal meningitis', *Sci Rep*, 9: 16189.
- Trostdorf, F., W. Brück, M. Schmitz-Salue, K. Stuert, S. J. Hopkins, N. van Rooijen, I. Huitinga, and R. Nau. 1999. 'Reduction of meningeal macrophages does not decrease migration of granulocytes into the CSF and brain parenchyma in experimental pneumococcal meningitis', *J Neuroimmunol*, 99: 205-10.
- Tuomanen, E., H. Liu, B. Hengstler, O. Zak, and A. Tomasz. 1985. 'The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall', *J Infect Dis*, 151: 859-68.
- Tuomanen, E., A. Tomasz, B. Hengstler, and O. Zak. 1985. 'The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis', *J Infect Dis*, 151: 535-40.
- Tureen, J. H., R. J. Dworkin, S. L. Kennedy, M. Sachdeva, and M. A. Sande. 1990. 'Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits', *J Clin Invest*, 85: 577-81.
- van de Beek, D., M. C. Brouwer, U. Koedel, and E. C. Wall. 2021. 'Community-acquired bacterial meningitis', *Lancet*.
- van de Beek, D., M. Brouwer, R. Hasbun, U. Koedel, C. G. Whitney, and E. Wijdicks. 2016. 'Community-acquired bacterial meningitis', *Nat Rev Dis Primers*, 2: 16074.
- Van Hove, H., L. Martens, I. Scheyltjens, K. De Vlaminck, A. R. Pombo Antunes, S. De Prijck, N. Vandamme, S. De Schepper, G. Van Isterdael, C. L. Scott, J. Aerts, G. Berx, G. E. Boeckxstaens, R. E. Vandenbroucke, L. Vereecke, D. Moechars, M. Williams, J. A. Van Ginderachter, Y. Saeys, and K. Movahedi. 2019. 'A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment', *Nat Neurosci*, 22: 1021-35.
- van Zoelen, M. A., M. Schouten, A. F. de Vos, S. Florquin, J. C. Meijers, P. P. Nawroth, A. Bierhaus, and T. van der Poll. 2009. 'The receptor for advanced glycation end products impairs host defense in pneumococcal pneumonia', *J Immunol*, 182: 4349-56.

- Vergouwen, M. D., E. S. Schut, D. Troost, and D. van de Beek. 2010. 'Diffuse cerebral intravascular coagulation and cerebral infarction in pneumococcal meningitis', *Neurocrit Care*, 13: 217-27.
- Viallon, A., P. Guyomarc'h, S. Guyomarc'h, B. Tardy, F. Robert, O. Marjollet, A. Caricajo, C. Lambert, F. Zéni, and J. C. Bertrand. 2005. 'Decrease in serum procalcitonin levels over time during treatment of acute bacterial meningitis', *Crit Care*, 9: R344-50.
- Wache, C., M. Klein, C. Ostergaard, B. Angele, H. Häcker, H. W. Pfister, M. Pruenster, M. Sperandio, T. Leanderson, J. Roth, T. Vogl, and U. Koedel. 2015. 'Myeloid-related protein 14 promotes inflammation and injury in meningitis', *J Infect Dis*, 212: 247-57.
- Waight, P. A., N. J. Andrews, S. N. Ladhani, C. L. Sheppard, M. P. Slack, and E. Miller. 2015. 'Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study', *Lancet Infect Dis*, 15: 535-43.
- Wall, E. C., J. M. Chan, E. Gil, and R. S. Heyderman. 2021. 'Acute bacterial meningitis', *Curr Opin Neurol*, 34: 386-95.
- Wall, E. C., S. B. Gordon, S. Hussain, U. R. Goonetilleke, J. Gritzfeld, M. Scarborough, and A. Kadioglu. 2012. 'Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality', *Clin Infect Dis*, 54: 701-5.
- Wall, E. C., J. F. Gritzfeld, M. Scarborough, K. M. Ajdukiewicz, M. Mukaka, C. Corless, D. G. Lalloo, and S. B. Gordon. 2014. 'Genomic pneumococcal load and CSF cytokines are not related to outcome in Malawian adults with meningitis', *J Infect*, 69: 440-6.
- Wang, A. Z., J. A. Bowman-Kirigin, R. Desai, L. I. Kang, P. R. Patel, B. Patel, S. M. Khan, D. Bender, M. C. Marlin, J. Liu, J. W. Osbun, E. C. Leuthardt, M. R. Chicoine, R. G. Dacey, Jr., G. J. Zipfel, A. H. Kim, D. G. DeNardo, A. A. Petti, and G. P. Dunn. 2022. 'Single-cell profiling of human dura and meningioma reveals cellular meningeal landscape and insights into meningioma immune response', *Genome Med*, 14: 49.
- Weisfelt, M., D. van de Beek, L. Spanjaard, J. B. Reitsma, and J. de Gans. 2006. 'Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series', *Lancet Neurol*, 5: 123-9.
- Weller, R. O. 2005. 'Microscopic morphology and histology of the human meninges', *Morphologie*, 89: 22-34.
- Wellmer, A., G. Zysk, J. Gerber, T. Kunst, M. Von Mering, S. Bunkowski, H. Eiffert, and R. Nau. 2002. 'Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis', *Infect Immun*, 70: 6504-8.
- Wen, A. Y., K. M. Sakamoto, and L. S. Miller. 2010. 'The role of the transcription factor CREB in immune function', *J Immunol*, 185: 6413-9.
- Whitney, C. G., M. M. Farley, J. Hadler, L. H. Harrison, N. M. Bennett, R. Lynfield, A. Reingold, P. R. Cieslak, T. Pilishvili, D. Jackson, R. R. Facklam, J. H. Jorgensen, and A. Schuchat. 2003. 'Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine', *N Engl J Med*, 348: 1737-46.
- Wippel, C., J. Maurer, C. Förtsch, S. Hupp, A. Bohl, J. Ma, T. J. Mitchell, S. Bunkowski, W. Brück, R. Nau, and A. I. Iliev. 2013. 'Bacterial cytolysin during meningitis disrupts the regulation of glutamate in the brain, leading to synaptic damage', *PLoS Pathog*, 9: e1003380.
- Witzenrath, M., F. Pache, D. Lorenz, U. Koppe, B. Gutbier, C. Tabeling, K. Reppe, K. Meixenberger, A. Dorhoi, J. Ma, A. Holmes, G. Trendelenburg, M. M. Heimesaat, S. Bereswill, M. van der Linden, J. Tschopp, T. J. Mitchell, N. Suttorp, and B. Opitz. 2011. 'The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia', *J Immunol*, 187: 434-40.

- Woehrl, B., M. C. Brouwer, C. Murr, S. G. Heckenberg, F. Baas, H. W. Pfister, A. H. Zwinderman, B. P. Morgan, S. R. Barnum, A. van der Ende, U. Koedel, and D. van de Beek. 2011. 'Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis', *J Clin Invest*, 121: 3943-53.
- Wolf, J., S. Rose-John, and C. Garbers. 2014. 'Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system', *Cytokine*, 70: 11-20.
- Wu, Z., J. Zhang, and H. Nakanishi. 2005. 'Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation', *J Neuroimmunol*, 167: 90-8.
- Xiao, Y., L. Liang, M. Huang, Q. Qiu, S. Zeng, M. Shi, Y. Zou, Y. Ye, X. Yang, and H. Xu. 2016. 'Bromodomain and extra-terminal domain bromodomain inhibition prevents synovial inflammation via blocking I $\kappa$ B kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes', *Rheumatology (Oxford)*, 55: 173-84.
- Xie, F., B. X. Li, A. Kassenbrock, C. Xue, X. Wang, D. Z. Qian, R. C. Sears, and X. Xiao. 2015. 'Identification of a Potent Inhibitor of CREB-Mediated Gene Transcription with Efficacious in Vivo Anticancer Activity', *J Med Chem*, 58: 5075-87.
- Xu, L., and Y. Yao. 2021. 'Central Nervous System Fibroblast-Like Cells in Stroke and Other Neurological Disorders', *Stroke*, 52: 2456-64.
- Yahn, S. L., J. Li, I. Goo, H. Gao, R. Brambilla, and J. K. Lee. 2020. 'Fibrotic scar after experimental autoimmune encephalomyelitis inhibits oligodendrocyte differentiation', *Neurobiol Dis*, 134: 104674.
- Yan, J., W. Xu, C. Lenahan, L. Huang, J. Wen, G. Li, X. Hu, W. Zheng, J. H. Zhang, and J. Tang. 2021. 'CCR5 Activation Promotes NLRP1-Dependent Neuronal Pyroptosis via CCR5/PKA/CREB Pathway After Intracerebral Hemorrhage', *Stroke*, 52: 4021-32.
- Yang, C. C., L. D. Hsiao, and C. M. Yang. 2020. 'Galangin Inhibits LPS-Induced MMP-9 Expression via Suppressing Protein Kinase-Dependent AP-1 and FoxO1 Activation in Rat Brain Astrocytes', *J Inflamm Res*, 13: 945-60.
- Yau, B., N. H. Hunt, A. J. Mitchell, and L. K. Too. 2018. 'Blood-Brain Barrier Pathology and CNS Outcomes in Streptococcus pneumoniae Meningitis', *Int J Mol Sci*, 19.
- Yu, H., L. Lin, Z. Zhang, H. Zhang, and H. Hu. 2020. 'Targeting NF- $\kappa$ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study', *Signal Transduct Target Ther*, 5: 209.
- Zafar, M. A., Y. Wang, S. Hamaguchi, and J. N. Weiser. 2017. 'Host-to-Host Transmission of Streptococcus pneumoniae Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin', *Cell Host Microbe*, 21: 73-83.
- Zhang, Q., M. J. Lenardo, and D. Baltimore. 2017. '30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology', *Cell*, 168: 37-57.
- Zhu, Z. Y., C. Z. Jia, J. M. Luo, and L. Wang. 2018. 'Polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid facilitates interleukin-6, and interleukin-8 secretion in human dermal fibroblasts via the JAK/STAT3 and p38 MAPK signal transduction pathways', *Cytokine*, 102: 1-6.
- Zwijnenburg, P. J., H. M. de Bie, J. J. Roord, T. van der Poll, and A. M. van Furth. 2003. 'Chemotactic activity of CXCL5 in cerebrospinal fluid of children with bacterial meningitis', *J Neuroimmunol*, 145: 148-53.
- Zwijnenburg, P. J., T. van der Poll, S. Florquin, J. J. Roord, and A. M. Van Furth. 2003. 'IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis', *J Immunol*, 170: 4724-30.
- Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck, and H. P. Heinz. 2001. 'Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to

---

brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 69: 845-52.

## Danksagung

Herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Uwe Ködel für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und die herausragende Betreuung. Dank seiner wissenschaftlichen Expertise, seiner Begeisterung für die Forschung und den vielzähligen hilfreichen Anregungen konnte dieses Projekt erfolgreich beendet werden.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister für die Aufnahme in seine neuroinfektiologische Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, dieses Projekt in seinem Forschungslabor durchzuführen.

Frau Dr. med. Susanne Dyckhoff-Shen möchte ich für ihre Betreuung, stetige Unterstützung und Einführung in die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens danken.

Großer Dank geht an Frau Barbara Angele, die mich mit großem Einsatz in die wesentlichen labortechnischen Methoden eingearbeitet hat und deren stetige Hilfsbereitschaft den Laboralltag sehr erleichtert hat. Mein Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und insbesondere meinen Mitdoktoranden für ihre Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Kohler aus dem Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald, die uns freundlicherweise die benötigten Bakterienstämme zur Verfügung stellten. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Kirschning aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen für die Beratung bezüglich des TLR-Projekts danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Freunden für ihre stetige Unterstützung bedanken.

## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Ercegovac, Linda

Name, Vorname

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

Zellkulturelle Untersuchungen zur Rolle meningealer Fibroblasten bei der Pathogenerkennung und Immunaktivierung im Leptomeningealraum

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, den 19.03.2024

Linda Ercegovac

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand