

Aus der
Neurologischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktorin: Prof. Dr. Marianne Dieterich

**Experimentelle Untersuchungen zur Rolle zerebraler Perizyten und des
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Proteins 2 in der Immunpathogenese
der Pneumokokken-Meningitis**

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

vorgelegt von
Nina Carina Teske

aus
Dortmund

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ködel
Mitberichterstatter: PD Dr. Stefan Kastenbauer
Prof. Dr. Dr. Manfred Uhr
PD Dr. Susanne Schwarzmaier

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2024

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie der Pneumokokken-Meningitis	1
1.2	Komplikationen der Pneumokokken-Meningitis	3
1.3	Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis	3
1.3.1	Das Immunsystem im Subarachnoidalraum mit Fokus auf die postkapillären Venolen	4
1.3.2	Aktivierung des Immunsystems im Liquorraum.....	5
1.3.3	Meningitisassoziierte Gewebeschädigung	6
1.4	Perizyten – mögliche zentrale Regulatoren der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis?	7
1.4.1	Eine heterogene Zellart	7
1.4.2	Die Rolle von Perizyten bei Infektionsgeschehen.....	10
1.5	PAI-2 – das unentschlossene Serpin	11
1.5.1	Das Plasminogen-Aktivator-System	11
1.5.2	PAI-2 – Funktionen und Bedeutung.....	13
1.5.3	PAI-2 im Kontext infektiologischer Forschung	14
2	FRAGESTELLUNGEN.....	16
2.1	Fragestellung I	16
2.2	Fragestellung II	17
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	In-vitro Versuche.....	18
3.1.1	Primäre Zellen und Kulturbedingungen	18
3.1.1.1	Murine Perizyten	18
3.1.1.2	Humane Perizyten	20
3.1.1.3	Murine Knochenmarks-Makrophagen	21
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl	22
3.1.3	Zellkultorexperimente	23
3.1.3.1	Murine & humane Perizyten	23
3.1.3.2	Knochenmarks-Makrophagen	24
3.1.4	Messparameter	25
3.1.4.1	LDH-Aktivität	25
3.1.4.2	Messung der Zytokinproduktion und PAI-2 Freisetzung mittels ELISA	25

3.1.4.3	Messung der Zytokinproduktion mittels Proteom Profiler Assay.....	26
3.1.5	RT-qPCR-Analysen von Knochenmarks-Makrophagen.....	27
3.2	Zebrafischmodell der Pneumokokken-Meningitis.....	28
3.2.1	Zebrafischlinien und Haltung.....	28
3.2.2	Infektion	29
3.2.3	Perizytendepletion im Zebrafischmodell	30
3.2.4	Experimentelle Gruppen	31
3.2.5	Histopathologische Analyse.....	32
3.2.6	Fluoreszenz Mikroskopie	32
3.3	Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis.....	33
3.3.1	Versuchsablauf.....	33
3.3.2	Versuchstiere	34
3.3.2.1	Genetische Depletion von Perizyten in Mäusen	34
3.3.2.2	PAI-2-defiziente Mäuse	35
3.3.3	Experimentelle Gruppen	35
3.3.3.1	Experimentelle Gruppen im Rahmen der Untersuchungen zur Rolle der Perizyten.....	35
3.3.3.2	Experimentelle Gruppen im Rahmen der Untersuchungen zur Rolle von PAI-2	36
3.3.4	Immunhistochemische Untersuchungen von Maushirnschnitten.....	36
3.3.4.1	Immunhistochemische Analysen im Perizyten-Projekt	36
3.3.4.2	Immunhistochemische Analysen im PAI-2 Projekt.....	36
3.3.5	mRNA Expressionsprofil von PDGFR β -iDTA Mäusen.....	37
3.3.6	Quantifizierung der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität mittels Evans-Blau.....	38
3.3.7	Tierversuchsgenehmigung	39
3.4	Statistische Methoden	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Rolle der Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis.....	40
4.1.1	Murine und humane Perizyten setzen nach einer Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> ausgewählte Zytokine frei	40
4.1.2	Perizytendepletion führte zu einer verkürzten Überlebenszeit im Zebrafisch Modell	44

4.1.3	Nach einer Perizytendepletion entwickelten Zebrafisch Embryos verstärkt Hirnödeme während der Pneumokokken-Meningitis	47
4.1.4	Verteilung der Perizyten auf Hirngefäßen im Verlauf der Pneumokokken-Meningitis.....	48
4.1.5	Die genetische Ablation von Perizyten im Mausmodell führt zur Verschlechterung des Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Meningitis.....	50
4.1.6	Die genetische Ablation von Perizyten im Mausmodell führt zu einer Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität	53
4.1.7	Die genetische Ablation von Perizyten im Mausmodell führt zur erhöhter Leukozyten-Rekrutierung.....	54
4.2	Die Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis	56
4.2.1	PAI-2 wird während der Pneumokokken-Meningitis in den Liquor und ins Blut freigesetzt	56
4.2.2	Die PAI-2 Defizienz ist mit einem schlechteren Outcome der murinen Pneumokokken-Meningitis assoziiert	57
4.2.3	<i>Serpinb2</i> ^{-/-} Mäuse zeigen eine veränderte Zytokinfreisetzung während der Pneumokokken-Meningitis	59
4.2.4	Die PAI-2 Defizienz führt bei einer Pneumokokken-Exposition zu einer veränderten Zytokinausschüttung von BMDM.....	61
5	DISKUSSION	64
5.1	Die Rolle von Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis	64
5.1.1	Perizyten und die Leukozyten Rekrutierung im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis.....	64
5.1.2	Bedeutung von Perizyten für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke während der Pneumokokken-Meningitis	65
5.1.3	Schwachpunkte unserer Perizyten-Studie	66
5.2	Die Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis	68
5.2.1	PAI-2 im Rahmen der zellulären Immunantwort – Unterschiede im Phänotyp ..	68
5.2.2	PAI-2 beeinflusst den Krankheitsphänotyp der Pneumokokken-Meningitis	69
5.2.3	PAI-2 ist an der Entzündungsregulation beteiligt	69
5.2.4	Einschränkungen dieser Arbeit im Rahmen der Untersuchungen zu PAI-2	71
6	ZUSAMMENFASSUNG	72
6.1	Die Rolle von Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis	72

6.2	Die Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis	75
7	AUSBLICK.....	77
7.1	Perizyten – Zukünftige Projekte.....	77
7.2	PAI-2 – Eine potenzielle Behandlung in der Pneumokokken-Meningitis?.....	77
8	LITERATURVERZEICHNIS	79
9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	96
10	DANKSAGUNG.....	97

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -smooth muscle actin
APN	Aminopeptidase N
BMDM	Bone marrow–derived macrophages
CCL2	CC-Chemokinligand 2
Cfu	Colony-forming units
CXCL1	C-X-C motif Chemokinligand 1
Cre	cAMP-responsive element
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Minimal Essential Medium
Dpf	Days post fertilization (Deutsch: Tage nach Befruchtung)
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HBSS	Hank’s Balanced Salt Solution
Hpf	Hours post fertilization (Deutsch: Stunden nach Befruchtung)
Hpi	Hours post injection (Deutsch: Stunden nach Injektion)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 (Deutsch: Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IL	Interleukin
MenC	Meningokokken C
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MyD	Myeloid differentiation primary response protein
NG2	Neural/Glial Antigen 2
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor β
PTU	<i>N</i> -Phenylthiourea
qPCR	Real-time quantitative PCR
RNA	Ribonucleic acid (Deutsch: Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
t-PA	Tissue-type plasminogen activator
TG	<i>TgBAC(pdgfrb:EGFP/Tg(flila:Myr-mCherry)</i>
Th1	Typ-1-T-Helferzelle

Th2	Typ-2-T-Helferzelle
THY	Todd Hewitt Broth with yeast (Deutsch: Todd Hewitt Bouillon mit Hefe)
TLR	Toll-like Rezeptor
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
u-PAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (Deutsch: Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1)
WBC	White blood cell (Deutsch: Weiße Blutkörperchen)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Pneumokokken-Meningitis

Die akute bakterielle Meningitis stellt nach wie vor weltweit eine große Herausforderung für die moderne Medizin dar. In den 1950ern untersuchten Carpenter und Petersdorf in den USA in einer retrospektiven Studie das klinische Spektrum der bakteriellen Meningitis und identifizierten *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* als die häufigsten Erreger der nicht-tuberkulösen bakteriellen Meningitis (Carpenter & Petersdorf, 1962). Nachdem auch die Ergebnisse einer prospektiven Überwachungsstudie aus dem Jahre 1986 mit einer Population von 34 Millionen Menschen aus den USA die drei oben genannten Erreger als die häufigste Ursache einer bakteriellen Meningitis bestätigten (Wenger et al., 1990), nahm die Entwicklung von Impfungen gegen diese Pathogene an Bedeutung zu. Vor der Verfügbarkeit einer Impfung gegen *H. influenzae* rief dieser Erreger die mit Abstand meisten Fälle bakterieller Meningitiden in den USA hervor (Schlech et al., 1985; Wenger et al., 1990). Jedoch änderte sich dies mit der Einführung der *H. influenzae* Typ B Konjugatimpfung drastisch; die Vakzine sorgte nicht nur in den USA, sondern auch in Europa für eine fast vollständige Elimination der *H. influenzae* Typ B Meningitis (Berg et al., 1996; Chekrouni et al., 2021; Giorgi Rossi et al., 2009; Schuchat et al., 1997; Sigurdardottir et al., 1997; Theodoridou et al., 2007; Thigpen et al., 2011).

Von den 12 identifizierten Serogruppen von *N. meningitidis* sind 6 (A, B, C, W, Y, X) hauptverantwortlich für die meisten Meningokokkenmeningitiden. In Europa dominiert die Serogruppe B, gefolgt von Serogruppe C (Whittaker et al., 2017). Seit 2006 empfiehlt die Ständige Impfkommission in Deutschland allen Kindern im zweiten Lebensjahr die Meningokokken C (MenC) Impfung (Impfkommission, 2023). Viele weitere Länder in Europa haben in den letzten Jahren auch die Meningokokken B Impfung in ihr nationales Immunisierungsprogramm aufgenommen, was gemeinsam mit der MenC Impfung in den letzten beiden Jahrzehnten für einen Rückgang der Inzidenz in Europa geführt hat (Whittaker et al., 2017).

Heutzutage ist *S. pneumoniae* der häufigste Erreger der bakteriellen Meningitis, sowohl in den USA als auch in Europa (Bijlsma et al., 2016; Brouwer et al., 2010; Thigpen et al., 2011). Bislang wurden über 100 verschiedene Strukturen der Polysaccharid Kapsel von *S. pneumoniae*, sogenannte Serotypen, identifiziert. Nicht nur die Häufigkeit der verschiedenen Serotypen in unterschiedlichen Altersklassen variiert, sondern auch das Krankheitspotenzial.

Einleitung

Eine Studie aus Schweden stellte fest, dass es zwei Gruppen von Pneumokokken Serotypen gibt: einerseits Serotypen, die mit einer invasiven Erkrankung assoziiert sind (Typ 1, 4, 7F, und 9V), und andererseits Serotypen, die zwar eine invasive Erkrankung auslösen können, jedoch häufig nur in asymptomatischen Trägern gefunden werden (unter anderem Typ 6A, 6B, 14 und 19F) (Sandgren et al., 2004). Auch die Pneumokokkenimpfung gehört in Deutschland zur Grundimmunisierung von Säuglingen; dabei soll die erste Impfung mit einem 13-valenten Konjugatimpfstoff, die zweite Impfung mit dem 23-valenten Polysaccharid-Impfstoff erfolgen (Impfkommission, 2023). Außerdem gilt die Pneumokokkenimpfung als Standardimpfung für Senioren (älter als 60 Jahre) und als Indikationsimpfung für Personen mit bestimmten Risikofaktoren (Impfkommission, 2023). Bisher deckt keine der entwickelten Impfungen alle humanpathogenen Serotypen von *S. pneumoniae* ab. Vielmehr stiegen die Inzidenzen von Pneumokokkenmeningitiden, die von Serotypen verursacht werden, die nicht in den bisherigen Konjugatimpfstoffen enthalten sind (Hsu et al., 2009; Imohl et al., 2015; Koelman et al., 2020). Die Inzidenz der Pneumokokken-Meningitis variiert je nach Serotyp und Land. In einer prospektiven Kohortenstudie über einen Zeitraum von 20 Jahren in den Niederlanden liegt die mittlere jährliche Inzidenz bei 0,87 pro 100.000 Erwachsene pro Jahr (Koelman et al., 2022). Trotz Antibiotikatherapie sticht die Pneumokokken-Meningitis durch ihre hohe Letalität heraus. In Industriestaaten beträgt diese, je nach Studie, zwischen 5-37% (Brouwer et al., 2010; Buchholz et al., 2016; van de Beek, Brouwer, et al., 2016; van de Beek et al., 2004). In einkommensschwachen Ländern liegt die Inzidenz bei bis zu 51% (Brouwer et al., 2010). Im Jahr 2002 zeigten Jan de Gans und Kollegen in einer europäischen randomisierten Multizenterstudie einen positiven Effekt einer adjuvanten Dexamethason-Behandlung auf den klinischen Verlauf einer akuten bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter (de Gans et al., 2002). Patienten, die an einer Pneumokokken-Meningitis litten, profitierten am deutlichsten von diesem Therapieansatz. Während in der Placebo Gruppe 34% der Fälle verstarben, waren es in der mit Dexamethason behandelten Gruppe nur 14% (de Gans et al., 2002). Die adjunktive Dexamethason Therapie bei Pneumokokken-Meningitis fand schlussendlich Einzug in die Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA) und der deutschen Gesellschaft für Neurologie (Beckham et al., 2006; Pfister & Klein, 2023; van de Beek, Cabellos, et al., 2016).

Wenngleich die Einführung der Impfungen und die Weiterentwicklung der Therapie um Dexamethason die Inzidenz und Letalität der Pneumokokken-Meningitis senken konnten (Buchholz et al., 2016), so stellt sie immer noch eine der gefährlichsten ZNS-

Infektionserkrankungen dar, die nicht nur mit einem relativ hohen Sterberisiko, sondern auch häufig mit schweren Komplikationen und neurologischen Folgeschäden verbunden ist (Lucas et al., 2016) (Kastenbauer & Pfister, 2003).

1.2 Komplikationen der Pneumokokken-Meningitis

Zu den häufigsten neurologischen Folgeschäden nach einer bakteriellen Meningitis gehören fokal neurologische Defizite, Hörverlust, kognitive Einschränkungen und Epilepsie (Lucas et al., 2016). Insbesondere Hörverluste treten gehäuft mit bis zu 69% der erwachsenen Patienten nach einer Pneumokokken-Meningitis auf (Mook-Kanamori et al., 2011; van de Beek et al., 2004; Worsoe et al., 2010). Tierversuche deuten darauf hin, dass es im Rahmen der Infektion anfangs zu einem Integritätsverlust der Blut-Labyrinth-Schranke mit nachfolgendem Verlust der Neurone des Spiralganglions in der Cochlea kommt (Klein et al., 2003).

Im Jahr 1993 berichteten Pfister et al., dass bei etwa der Hälfte der Patienten im Verlauf einer akuten bakteriellen Meningitis lokale, auf das ZNS begrenzte und/oder systemische Komplikationen auftreten können (Pfister et al., 1993). Zehn Jahre später veröffentlichten Kastenbauer und Pfister eine Studie, in der sie das Spektrum an Komplikationen bei der Pneumokokken-Meningitis bei Erwachsenen genauer charakterisierten (Kastenbauer & Pfister, 2003). Von den 87 Fällen, die im Zeitraum von 1984 bis 2002 untersucht wurden, entwickelten 75% meningitisassoziierte intrakranielle Komplikationen und 38% systemische Komplikationen. Zu den meningitisassoziierten intrakraniellen Komplikationen gehörten unter anderem epileptische Anfälle, arterielle zerebrovaskuläre Komplikationen wie Ischämien, intrakranielle Blutungen und Subarachnoidalblutungen, venöse zerebrovaskuläre Komplikationen wie Sinusvenenthrombosen, Hirnödem, Hydrozephalus, Hörverlust, Myelitis und Zerebritis. Meningitisassoziierte systemische Komplikationen waren septischer Schock, disseminierte intravasale Gerinnung, akutes Nierenversagen und akute respiratorische Insuffizienz. Hervorzuheben ist außerdem, dass bei Entlassung nur 48% der Patienten ein gutes Behandlungsergebnis (Glasgow Outcome Scale Score (GOS) = 5) aufwiesen. In einer prospektiven Fallstudie zeigten Weisfelt et al. zwischen 1998 und 2002, dass bei jüngeren Patienten neurologische Komplikationen die häufigste Todesursache darstellten, ältere Patienten vor allem an systemischen Komplikationen starben (Weisfelt et al., 2006).

1.3 Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis

1.3.1 Das Immunsystem im Subarachnoidalraum mit Fokus auf die postkapillären Venolen

Damit eine Pneumokokken-Meningitis entsteht, muss der sogenannte Leptomeningealraum infiziert werden. Dies geschieht entweder hämatogen oder über eine kontinuierliche Ausbreitung von Infektionen angrenzender Regionen (Koedel, Scheld, et al., 2002; Mook-Kanamori et al., 2011). Die Entwicklung einer Pneumokokken-Meningitis über den hämatogenen Infektionsweg erfordert im Allgemeinen, dass die Bakterien den Nasenrachenraum besiedeln (Weiser et al., 2018). Unter bestimmten Bedingungen können Pneumokokken dann in die Blutbahn gelangen, die Blut-Hirn-Schranke passieren und den Leptomeningealraum infizieren (Mook-Kanamori et al., 2011). Die kontinuierliche Infektion, auch teilweise „Durchwanderungsmeningitis“ genannt, zeichnet sich durch eine direkte Ausbreitung lokaler Infektionen in den Leptomeningealraum aus. Dabei werden umliegende Gewebestrukturen wie zum Beispiel Knochen direkt durchbrochen. Hier spielen unter anderem die Mastoiditis, die Sinusitis und die Otitis media eine große Rolle (Koedel et al., 2010; Koedel, Scheld, et al., 2002; Mook-Kanamori et al., 2011).

Um die Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis zu verstehen, muss man sich das Immunsystem im Subarachnoidalraum genauer anschauen. Zuerst trennt die sogenannte Blut-Liquor-Schranke den Liquorraum vom zirkulierenden Blut und lässt nur sehr eingeschränkt Blutbestandteile durch (Engelhardt & Sorokin, 2009). Des Weiteren herrscht im mit Liquor gefüllten Subarachnoidalraum ein Mangel an sogenannten löslichen Mustererkennungsrezeptoren (z.B. Komplementfaktoren und IgG); gleichzeitig finden sich dort konstitutiv antiinflammatorische und immunsuppressive Faktoren (Dujardin et al., 1985; Niederkorn, 2006; Stahel et al., 1997). Trotz dieser erschwerten Voraussetzungen existieren im Subarachnoidalraum Systeme, die eine Pathogenerkennung im Liquorraum ermöglichen (Rustenhoven & Kipnis, 2022). Experimentelle Grundlagenforschung konnte zeigen, dass postkapilläre Venolen im Subarachnoidalraum und in den perivaskulären Zwischenräumen die Haupteintrittspforte von Leukozyten und Bakterien, wie *S. pneumoniae*, in das ZNS darstellen (Coureuil et al., 2017; Gradstedt et al., 2013; Hyun & Hong, 2017; Iovino et al., 2017; Lorenzl et al., 1993; Wilson et al., 2010). Postkapilläre Venolen sind Gefäße, die sich zwischen den Kapillaren und dem Venensystem befinden und das Blut aus dem Kapillarsystem sammeln und in größere Venolen drainieren. Sie bestehen aus spezialisierten Endothelzellen, die an einer Basalmembran haften und mit Zell-Zellkontakten, wie z.B. den Tight Junctions-Proteinen, miteinander verbunden sind (Harrison-Brown et al., 2016; Owens et al., 2008). In die Basalmembran eingebettet sind Perizyten, die über sogenannte „Peg-and-Socket-

Einleitung

Invaginationen“ mit den Endothelzellen in Kontakt stehen (Liebner et al., 2018). Postkapilläre Venolen werden von einem mit Pia mater bedeckten, flüssigkeitsgefüllten perivaskulären Raum umgeben, der von immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen und Mastzellen besiedelt ist (Brendecke & Prinz, 2015; Faraco et al., 2017; Lopez-Atalaya et al., 2018) (**Abbildung 1**). Diese Zellen sind in der Lage, Bakterien, die in das ZNS eingedrungen sind, mithilfe verschiedener Mustererkennungsrezeptoren wahrzunehmen, zu phagozytieren und eine Immunantwort im Liquorraum zu initiieren (Barichello et al., 2016; Letiembre et al., 2007; McGreal et al., 2005; Mukhopadhyay & Gordon, 2004; Serna-Rodriguez et al., 2022).

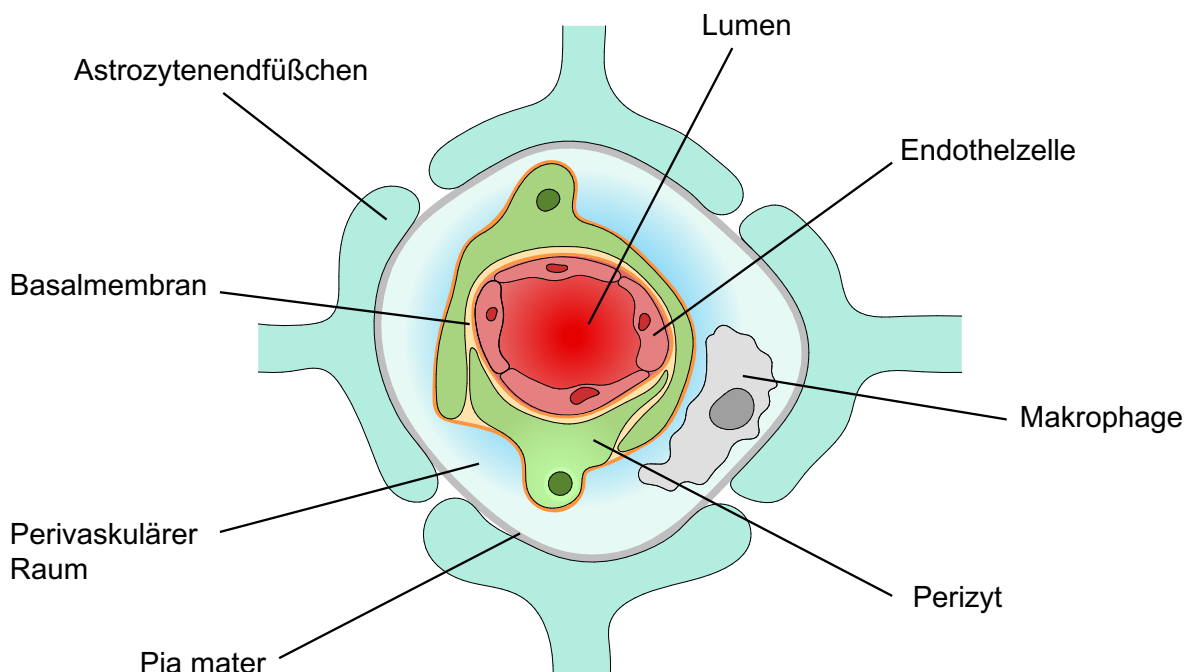


Abbildung 1: Postkapilläre Venole im perivaskulären Raum. (Eigene Darstellung in Anlehnung an Rustenhoven et al., 2017 und Cao et al., 2021; erstellt von R. Hees).

1.3.2 Aktivierung des Immunsystems im Liquorraum

Aufgrund des Opsoninmangels mit konsekutiv eingeschränkter Phagozytoseaktivität kann *S. pneumoniae*, sobald im Liquorraum angekommen, dort ähnlich hohe bakterielle Konzentrationen wie im Kulturmedium erreichen (Small et al., 1986). Erst bei hohen Titern werden die immunkompetenten Zellen aktiviert. Durch Proliferation und damit einhergehender Autolyse kommt es zur Freisetzung von immunstimulierenden pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) in den Liquorraum (Fischer & Tomasz, 1984; Moscoso & Claverys, 2004). Diese werden von verschiedenen Mustererkennungsrezeptoren, insbesondere

den sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR), erkannt (van de Beek, Brouwer, et al., 2016; van de Beek et al., 2021). Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass in der Maus TLR2 und TLR13 eine wichtige Rolle bei der Detektion von *S. pneumoniae* und der Induktion einer Immunantwort spielen (Dyckhoff-Shen et al., 2024; Klein et al., 2008). Die Aktivierung von TLR2 und TLR13 führt dann zu einer *myeloid differentiation primary response protein* (MyD) 88 abhängigen Produktion einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine (zum Beispiel Interleukin (IL)-1 β), Chemokine und Komplementfaktoren (Hoegen et al., 2011; Koedel et al., 2004; Koedel, Winkler, et al., 2002; Woehrl et al., 2011; Zwijnenburg et al., 2003). Daraufhin werden Leukozyten, in erster Linie neutrophile Granulozyten in den Subarachnoidalraum rekrutiert. Die Akkumulation enormer Mengen an neutrophilen Granulozyten im Liquor ist ein auffälliges Merkmal der Pneumokokken-Meningitis. Dieses Phänomen wird hauptsächlich durch zwei Effekte verursacht: Zum einen durch eine anhaltende Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aufgrund von hohen Konzentrationen an chemotaktisch wirkenden Zytokinen und zum anderen durch eine verlängerte Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten im Liquor (Koedel et al., 2009). Die zugrundeliegenden Mechanismen für die verlängerte Lebensdauer sind (I) das Fehlen von externen Zelltodsignalen (Hoffmann et al., 2007), (II) die Anwesenheit von externen Überlebenssignalen (Coxon et al., 1999) und (III) die ineffiziente Phagozytose von *S. pneumoniae* im Liquor (Mook-Kanamori et al., 2011). Durch die ineffiziente Phagozytose verbleibt *S. pneumoniae* im Liquor und stellt damit die treibende Kraft für die andauernde Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten dar.

1.3.3 Meningitisassoziierte Gewebeschädigung

In den letzten Jahrzehnten konnte durch Studien festgestellt werden, dass die resultierende Hirnschädigung bei der Pneumokokken-Meningitis nicht nur durch bakterielle Toxine, sondern auch durch eine überschießende Immunantwort im Subarachnoidalraum verursacht wird (Gerber & Nau, 2010). Bakterielle Bestandteile zeigen proinflammatorische Eigenschaften, zudem können sie auch direkten Zelltod auslösen. Pneumolysin, ein zytolytisches porenbildendes Toxin, wird von fast allen Pneumokokken Serotypen gebildet (Mitchell, 2000) und ist verantwortlich für den Zelltod von Neuronen und Endothelzellen (Braun et al., 2002; Zysk et al., 2001). Experimentelle Studien konnten zeigen, dass Pneumolysin-defiziente Pneumokokkenstämme zu einer reduzierten Virulenz und Gewebeschädigung in der murinen Meningitis führen (Hirst et al., 2008; Wellmer et al., 2002). Zellwand-Lipoproteine gelten als stark proinflammatorisch wirkende Vermittler der Immunantwort während der Pneumokokken-Meningitis (Gisch et al., 2013; Kohler et al., 2016). Weitere wichtige bakterielle Faktoren, die

eine meningitisassoziierte Gewebeschädigung begünstigen sind Autolysin und Wasserstoffperoxid (Braun et al., 2002; Hirst et al., 2008).

In der Vergangenheit konnte durch Studien an Versuchstieren gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten die Hauptverursacher meningitisassoziiierter Gewebeschädigung sind. In den Studien wurden die Versuchstiere unter anderem mit Antikörpern gegen neutrophile Granulozyten, Antikörpern gegen adhäsions-fördernde Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten oder mit pharmakologischen Apoptose-induzierenden Faktoren behandelt und wiesen somit eine geringere Zahl an neutrophilen Granulozyten auf. Dies führte zu reduziertem neuronalem Zelltod, verhinderte die Entwicklung von Hirnödemen und Tod der Tiere und wirkte sich positiv auf den Krankheitsverlauf aus (Hoffmann et al., 2007; Koedel et al., 2009; Mildner et al., 2008; Tuomanen et al., 1989; Woehrl et al., 2011). Wenn aktivierte neutrophile Granulozyten nicht auf ihre mikrobielle Zielstruktur treffen, setzen sie aus ihren Granula unter anderem proteolytische Enzyme und Oxidationsmittel in den extrazellulären Raum frei (Kolaczowska & Kubes, 2013). Diese Abwehrmechanismen sind für das Wirtsgewebe potenziell schädlich (Kruger et al., 2015; Mayadas et al., 2014). Peroxynitrit kann als starkes Oxidationsmittel auf vielfältige Weise zytotoxisch wirken; in Tiermodellen der Pneumokokken-Meningitis konnte eine Beteiligung von Peroxynitrit bei der Gewebeschädigung festgestellt werden (Klein, Koedel, et al., 2006; Koedel et al., 2001; Winkler et al., 2001). Studien konnten außerdem zeigen, dass proteolytische Enzyme, wie Matrix Metalloproteinasen (MMP) in der experimentellen Meningitis mitverantwortlich an Blut-Hirn-Schranken Störungen sind (Leib et al., 2000; Meli et al., 2004). Somit sind die wichtigsten Effektorzellen der meningitisassoziierten Gewebeschädigung und die Mechanismen, die der massiven Akkumulation im Liquor zugrunde liegen, weitgehend charakterisiert. Jedoch besteht immer noch Ungewissheit über die zellulären Regulatoren der meningealen Entzündung.

1.4 Perizyten – mögliche zentrale Regulatoren der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis?

1.4.1 Eine heterogene Zellart

Aktuelle Studien zeigen keine oder nur geringe Effekte einer Defizienz von Mastzellen oder Makrophagendepletion in Mausmodellen der Pneumokokken-Meningitis (Fritscher et al., 2018; Polfliet et al., 2001; Trostdorf et al., 1999; Zysk et al., 1997). Dies könnte darauf hindeuten, dass weitere Zellen, die sich im perivaskulären Raum befinden, an der Immunaktivierung bei Pneumokokken-Meningitis beteiligt sind. Neben Makrophagen und Mastzellen findet man Perizyten an der Blut-Liquor/Hirn Schranke. Diese befinden sich eingebettet in der

Einleitung

Basalmembran von Endothelzellen und stehen mit ihnen über „Peg-and-Socket-Invaginationen“ in Kontakt (Liebner et al., 2018). Schon 1873 beschrieb der französische Forscher Charles-Marie Benjamin Rouget kontraktile Zellen, die kleine Blutgefäße umgeben, die bis zur weiteren Beschreibung des deutschen Forschers Karl Wilhelm Zimmermann unter dem Namen „Rouget Zellen“ bekannt wurden (Rouget, 1873). Zimmermann benannte diese Zellen später zu „Perizyten“ um und führte erstmals eine Definition ein (Zimmermann, 1923). Er unterschied drei unscharf voneinander abzugrenzende Arten anhand ihrer Lokalisation im Gefäßbett: Präkapilläre, Kapilläre und Postkapilläre Perizyten. Die Tatsache, dass Perizyten anhand ihrer spezifischen anatomischen Position und Morphologie identifiziert werden, hat sich bis heute kaum verändert. Ein Problem in der genauen Identifikation eines Perizyten besteht darin, dass sie glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten phenotypisch ähnlich sind. Bis heute gibt es keinen hochspezifischen molekularen Marker, der Perizyten definitiv von anderen mesenchymalen Zellen unterscheidet. Aufgrund dessen hat sich der Kompromiss entwickelt, Perizyten anhand einer Kombination mehrerer Kriterien zu definieren, nämlich ihrer Morphologie, Lokalisation und ihres molekularen Expressionsmusters. Perizyten repräsentieren eine heterogene Zellpopulation: Perizyten an den präkapillären Arteriolen stellen eine Art Übergangsform von glatten Gefäßmuskelzellen dar (*hybrid smooth muscle-pericyte cells*). An den Hirnkapillaren haben sie einen runden, erhobenen Zellkörper und umgeben die Mikrogefäße spiralförmig mit langen Fortsätzen (*thin-strand* oder *helical pericytes*). An den postkapillären Venolen findet man dann letztendlich Perizyten mit einem abgeflachten Zellkörper und vielen netzartig angeordneten Fortsätzen, die das gesamte Gefäß bedecken

Einleitung

(*mesh pericytes*) (Armulik et al., 2011; Attwell et al., 2016; Grant et al., 2019; Hartmann et al., 2015) (**Abbildung 2**).

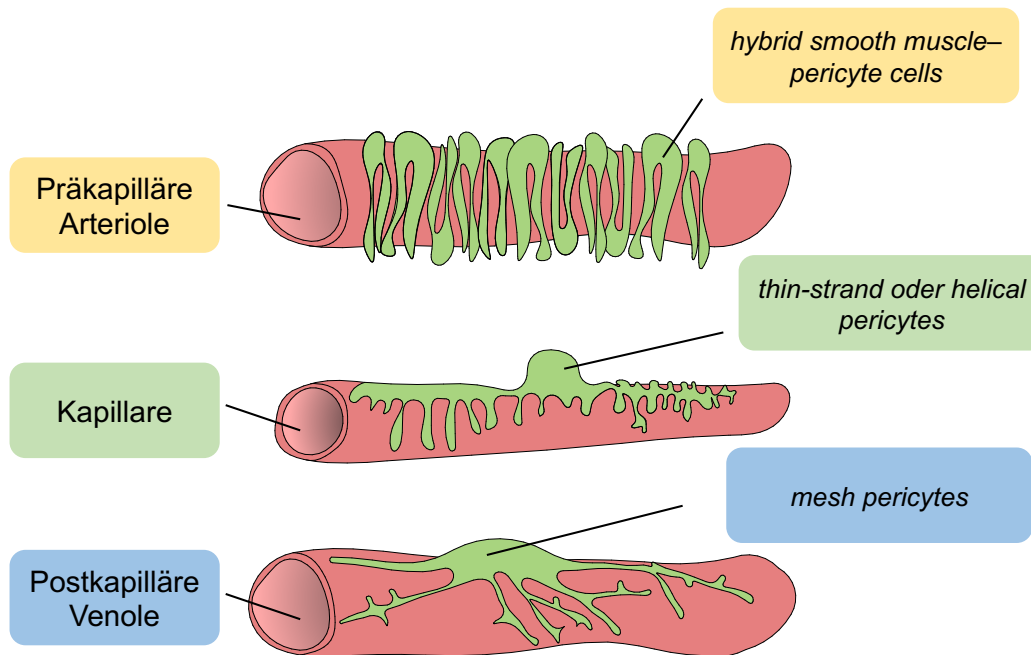


Abbildung 2: Unterschiedliche Arten von Perizyten anhand ihrer Lokalisation im Gefäßbett. (Eigene Darstellung modifiziert nach Armulik et al., 2011; erstellt von R. Hees).

Diese morphologische Vielfalt wird durch eine molekulare Heterogenität unterstrichen. Während Perizyten, die sich entlang postkapillärer Venolen befinden, negativ für den Perizytenmarker neural/glial antigen 2 (NG2), aber positiv für α -smooth muscle actin (α -SMA) sind, findet sich eine andere Gruppe von NG2- und α -SMA-doppelpositiven Perizyten entlang der Arteriolen und Kapillaren (Murfee et al., 2005). Markerproteine, die von Perizyten auf den postkapillären Venolen exprimiert werden, sind beispielsweise platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) und die Aminopeptidase N (APN, CD13) (Sweeney et al., 2016). Da das ZNS im Vergleich zu peripheren Geweben/Organen die dichteste Perizytenbedeckung von Blutgefäßen aufweist (ZNS-Perizyten-Endothelzellen-Verhältnis = 1:1 vs. Lungen-Perizyten-Endothelzellen-Verhältnis = 1:10) (Armulik et al., 2005; Shepro & Morel, 1993), wird angenommen, dass Perizyten eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der zerebrovaskulären Homöostase spielen. Studien konnten zeigen, dass Perizyten durch ihre Interaktion mit Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, die Integrität der Blut-Hirn-Schranke sowie die Angiogenese zu beeinflussen (Armulik et al., 2010; Fernandez-Klett et al., 2010; Hall et al., 2014; Kim et al., 2006; Torok et al., 2021; Villasenor et al., 2017). In den letzten Jahren haben experimentelle Studien darauf hingedeutet, dass der Verlust oder die Fehlfunktion von Perizyten bei akuten und chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie traumatische

Hirnverletzungen (Whitehead et al., 2024; Zehendner et al., 2015), zerebraler Ischämie (Fernandez-Klett et al., 2013; Ghosh et al., 2015; Underly et al., 2017; Whitehead et al., 2023) und der Alzheimer-Krankheit (Kurz et al., 2022; Sagare et al., 2013) zu Störungen der Blut-Hirn-Schranken-Funktion und zum Absterben von Neuronen beitragen kann. Insgesamt deutet die strategische Lage der Perizyten und ihre vielfältigen Funktionen auf eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Hirnerkrankungen hin, jedoch ist ihre Rolle im Rahmen von Infektionskrankheiten des ZNS weitgehend unbekannt.

1.4.2 Die Rolle von Perizyten bei Infektionsgeschehen

Durch ihre Lokalisation im perivaskulären Raum sind Perizyten in der idealen Position, bestimmte Aspekte der ZNS Immunantwort zu regulieren (Alarcon-Martinez et al., 2021; Barkaway et al., 2022; Medina-Flores et al., 2023).

In vitro Studien konnten zeigen, dass sie an der Erkennung von PAMPs, Leukozytenrekrutierung und Endozytose von Antigenen und Abfallprodukten beteiligt sind (Rustenhoven et al., 2017; Sweeney et al., 2016). Um die Anwesenheit von Pathogenen zu erkennen, sind Perizyten mit den entsprechenden Mustererkennungsrezeptoren (z.B. TLR, nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)) ausgestattet, die mit diversen bakteriellen PAMPs interagieren können (Guijarro-Munoz et al., 2014; Navarro et al., 2016; Nyul-Toth et al., 2017; Stark et al., 2013). Auf die Aktivierung ausgewählter Mustererkennungsrezeptoren oder bei Exposition mit Entzündungsmediatoren können Perizyten mit der Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6, Chemokinen wie CC-Chemokinligand 2 (CCL2), C-X-C motif Chemokinligand 1 (CXCL1) und Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) reagieren (Giannoni et al., 2018; Jansson et al., 2014; Kovac et al., 2011; Matsumoto et al., 2014; Nyul-Toth et al., 2017; Pieper et al., 2014). Perizyten sind außerdem in der Lage sowohl in stimulierten also auch im nicht-stimulierten Zustand eine Vielzahl an Chemokinen freizusetzen, welche frei zirkulierende Leukozyten über einen Konzentrationsgradienten ins Gehirn anziehen könnten. Des Weiteren exprimieren Perizyten interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und MMPs, die die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und deren Auswanderung aus dem Gefäßsystem unterstützen könnten (Jansson et al., 2014; Kovac et al., 2011; Matsumoto et al., 2014; Pieper et al., 2013).

Diese *in vitro* Ergebnisse wurden durch *in vivo* Untersuchungen in den letzten Jahren bestätigt, indem man eine Beteiligung von Perizyten an der Leukozytenmigration in Entzündungsherde von peripheren Organen, wie dem Cremaster Muskel oder der Haut, nachweisen konnte (Girbl

et al., 2018; Tan et al., 2015). Darüber hinaus können Perizyten eine Reihe von Substanzen, die eine beschädigte Blut-Hirn-Schranke durchdringen, durch rezeptorvermittelte Endozytose oder unspezifische Pinozytose internalisieren; die in Perizyten beobachteten lysosomalen Granula deuten darauf hin, dass sie strukturell für den Abbau von internalisiertem Material ausgestattet sind (Kristensson & Olsson, 1973; Rustenhoven et al., 2017). Überdies spielen Perizyten eine wichtige Rolle für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke, die für die Abwehr von Krankheitserregern und anderen schädlichen Substanzen in das ZNS unerlässlich ist (Armulik et al., 2010; Mae et al., 2021; Villasenor et al., 2017).

Unter *in vitro* Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Viren des Japanischen Enzephalitis Virus, humanen Zytomegalie Virus und humanen Immundefizienz-Virus-1 Perizyten im Gehirn infizieren und sich in ihnen replizieren können, was in einer Perizyten Dysfunktion und Lyse enden und letztendlich zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke beitragen kann (Alcendor, 2019; Chang et al., 2017; Chen et al., 2014; Nakagawa et al., 2012; Persidsky et al., 2016). Auch in *in vitro* Blut-Hirn-Schranken Modellen (bestehend aus Ko-Kulturen von primären Gehirn Endothelzellen und Perizyten) führte die Stimulation mit *Escherichia coli* und *Haemophilus influenzae* Typ A zur Perizyten-Dysfunktion und daraufhin zur Schranken Störung (Caporarello et al., 2018; Salmeri et al., 2013). Wenn Perizyten mit *S. pneumoniae* stimuliert werden, verstärken sie die Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch eine *in vitro* Endothelzellbarriere; bemerkenswerterweise blieb dabei die Permeabilität der Barriere unverändert (Gil, Venturini, et al., 2022). Anstelle eines direkten bakteriellen Einflusses wurden parakrine Signale aus benachbarten Makrophagen für die Hochregulation der Produktion neutrophiler Chemokine in den Perizyten verantwortlich gemacht (Gil, Venturini, et al., 2022). Ob diese Befunde auch für bakterielle ZNS-Infektion wie die Pneumokokken-Meningitis *in vivo* gültig sind, ist unklar und muss evaluiert werden.

1.5 PAI-2 – das unentschlossene Serpin

1.5.1 Das Plasminogen-Aktivator-System

Zerebrovaskuläre Komplikationen treten bei jedem vierten Patienten mit Pneumokokken-Meningitis auf und sind eine wichtige Ursache für einen schlechten Verlauf und erhöhter Mortalität (Artiaga et al., 2023; Deliran et al., 2021; Engelen-Lee et al., 2018; Pfister et al., 1992; Schut et al., 2012). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Gerinnungskaskade und Hemmung der Fibrinolyse mit einem erhöhten Risiko von Hirninfarkten bei einer bakteriellen Meningitis assoziiert sind (Brouwer et al., 2014; Paul et al., 2005; Weisfelt et al., 2007; Winkler et al., 2002). Es wurde bereits eine direkte Interaktion

Einleitung

zwischen den Virulenzfaktoren der Pneumokokken mit Gerinnungs- oder Fibrinolysefaktoren vermutet, jedoch ist nicht eindeutig festzustellen, ob dieser Vorgang tatsächlich unabhängig von der eigentlichen Entzündungsreaktion ist (Takemura et al., 2022).

Das Plasminogen-Aktivator-System, das aus dem gewebespezifischen Plasminogen-Aktivator (tissue-type plasminogen activator, t-PA), dem Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (u-PA), seinem Rezeptor u-PA-Rezeptor (u-PAR), Plasminogen und den Inhibitoren Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 und Typ 2 (PAI-1 und PAI-2) besteht, ist ein entscheidender Regulator der Fibrinolyse im Menschen (Irigoyen et al., 1999; Ismail et al., 2021; Jaiswal et al., 2018) (**Abbildung 3**). Für das Auflösen von Fibringerinnseln (Fibrinolyse) spaltet die Serin-Protease Plasmin Fibrin in wasserlösliche Abbauprodukte. Plasmin entsteht aus dem Vorläuferprotein Plasminogen durch die Katalyse von zwei Plasminogen-Aktivatoren: dem gewebespezifischen Plasminogen-Aktivator (Tissue-type plasminogen activator, t-PA) oder dem Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (u-PA). Ersterer wird in den Endothelzellen gebildet, während u-PA in der Niere entsteht (Deutzmann et al., 2012). PAI-1 und PAI-2 gelten als wichtige Regulatoren der Aktivität von t-PA und u-PA, wobei PAI-1 als zentraler Inhibitor im Menschen betrachtet wird (Iwaki et al., 2012).

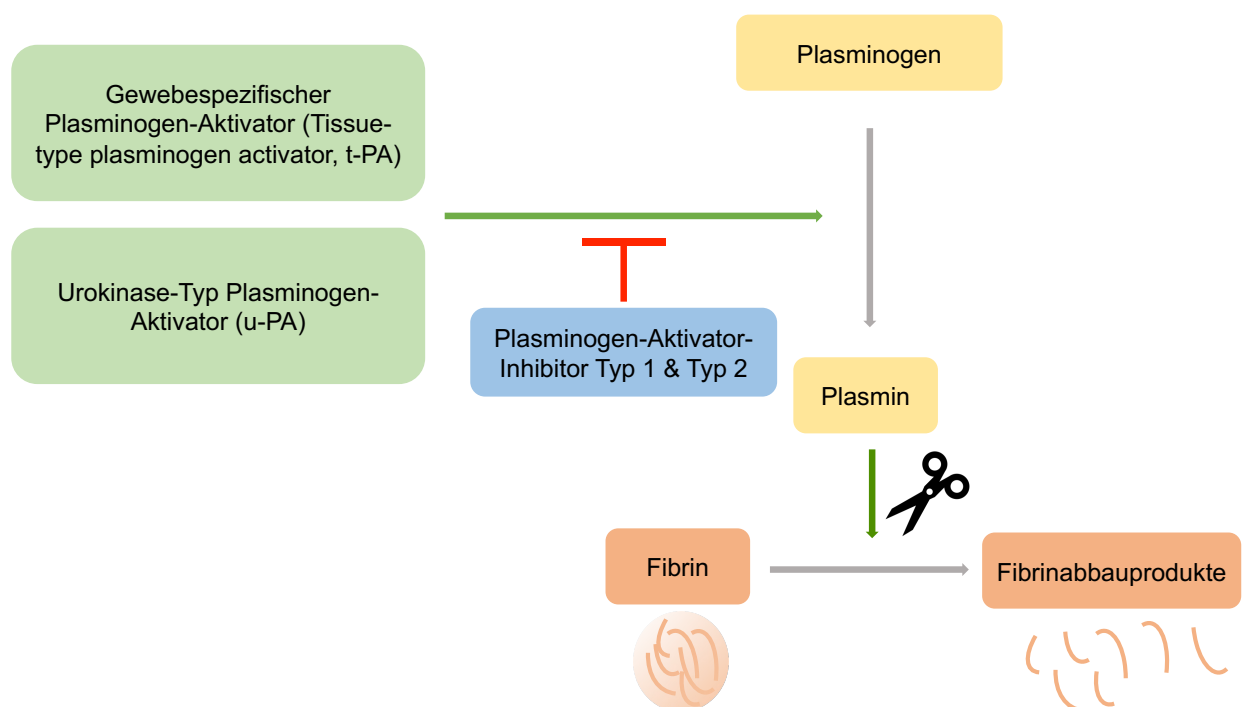


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Plasminogen-Aktivator-Systems. (Eigene Darstellung in Anlehnung an Napolitano & Montuori, 2021).

In den letzten Jahrzehnten wurde deutlich, dass PAI-1, kodiert durch *SERPINE1*, neben seiner Aufgabe in der Hämostase noch viele weitere Funktionen ausübt, unter anderem im Rahmen

von Entzündungsprozessen, Krebsentstehung und Gewebeschädigungen (Brandtzaeg et al., 1990; Li et al., 2018; Madoiwa et al., 2006; Renckens et al., 2005). In einer Studie zur Rolle von PAI-1 in der Pneumokokken-Meningitis konnte gezeigt werden, dass die funktionelle genetische Variation rs1799889 in *SERPINE1* das Risiko für Hirninfarkte, Hirnblutungen, einen schlechten Krankheitsverlauf und einen tödlichen Ausgang bei Patienten erhöht (Brouwer et al., 2014). Anschließend stellte sich bei Untersuchungen in einem etablierten Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis heraus, dass *Serpine1*-Knockoutmäuse eine höhere Sterblichkeit sowie häufiger und großflächigere Hirnblutungen als die entsprechenden Wildtypmäuse aufwiesen, was auf eine schützende Rolle von PAI-1 bei der Pneumokokken-Meningitis hindeutet (Brouwer et al., 2014). Die genaue Funktion von PAI-2 hingegen, insbesondere bei bakteriellen ZNS Erkrankungen, war bisher weitestgehend unbekannt.

1.5.2 PAI-2 – Funktionen und Bedeutung

PAI-2, kodiert durch *SERPINB2*, gilt als ein weiterer endogener Hemmstoff der Fibrinolyse; jedoch ist dieser im Vergleich zu PAI-1 weniger effektiv (Kruithof et al., 1986; Lobov et al., 2008). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die PAI-2-mRNA-Expression im Gehirn im Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis deutlich stärker hochreguliert wird als die PAI-1-Expression (Paul et al., 2005). PAI-2 liegt überwiegend intrazellulär (dort in hohen Konzentrationen) vor; daher scheint die Hemmung extrazellulärer Plasminogen-Aktivatoren nicht die einzige Funktion von PAI-2 zu sein (Lindberg et al., 2001; Swartz et al., 2004). *SERPINB2* wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, einschließlich Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Monozyten, und die Expression wird durch proinflammatorische Stimuli, wie bakterielle Infektionen, hochreguliert (Paul et al., 2005; Schroder et al., 2011). Darüber hinaus übt PAI-2 zahlreiche weitere Funktionen aus, die während einer Infektion relevant sein können. Es konnte gezeigt werden, dass PAI-2 p38-abhängig die Apoptose von TLR-4 aktivierten Makrophagen verhindern kann (Park et al., 2005). Außerdem kann PAI-2 an der Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Monozyten beteiligt sein. Die Transfektion von monozytenähnlichen Zellen, welche selber kein PAI-2 produzieren, mit Plasmiden, die aktives PAI-2 exprimieren, verringerte die zelleigene Adhäsionseigenschaften und erhöhte die Proliferation (Yu et al., 2002). Des Weiteren legen Studien nahe, dass PAI-2 als ein Regulator des Inflammasoms agieren kann, da ein Mangel an PAI-2 über einen TLR Signalweg zu einer Inflammasom-abhängigen Caspase-1-Aktivierung und IL-1 β -Sekretion von Makrophagen führte (Chuang et al., 2013). Die meisten Arbeiten zu PAI-2 haben sich bisher auf seine Rolle in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen konzentriert (Croucher et al.,

2008). In diesen Studien waren eine *SERPINB2* Überexpression und hohe PAI-2-Spiegel oft mit einem längeren Überleben oder einer guten Prognose verbunden (Foekens et al., 2000; Ramnefjell et al., 2017; Su et al., 2015; Zhang et al., 2019). Aufgrund der vielfältigen unterschiedlichen physiologischen Funktionen wird es auch oft als "das unentschiedene Serpin" („The undecided Serpin“) bezeichnet (Medcalf & Stasinopoulos, 2005).

1.5.3 PAI-2 im Kontext infektiologischer Forschung

PAI-2 scheint eine zentrale Rolle in der Regulation der adaptiven Immunantwort zu spielen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass PAI-2 die Typ-1-T-Helferzelle (Th1)/Typ-2-T-Helferzelle (Th2)-Immunantworten während einer Infektion moduliert (Major et al., 2013; Schroder, Gardner, et al., 2010; Schroder et al., 2011; Zhao et al., 2013). Über die genaue Funktion von *SERPINB2* im angeborenen Immunsystem ist dagegen immer noch wenig bekannt. Vor vielen Jahre berichtete eine klinische Studie von einem Zusammenhang zwischen dem Nachweis von löslichem PAI-2 im Blut und damit einhergehend einer erhöhten Sterblichkeit bei Sepsis-Patienten (Robbie et al., 2000). Dieser klinische Verdacht konnte in experimentellen Studien nicht nachvollzogen werden. So wiesen PAI-2-defiziente Mäuse keine Unterschiede in der Sterblichkeitsrate im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen in zwei differenten „Sepsis“-Modellen auf, nämlich nach einer Stimulation mit einer hohen Endotoxindosis und nach Ligatur und Punktion des Zökums (Dougherty et al., 1999). Über die Expression von PAI-2 bei Infektionen ist weit mehr bekannt: so wird diese durch bakterielle DNA und verschiedene Krankheitserreger hochreguliert, darunter *Borrelia burgdorferi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* (Berk et al., 2001; Haile et al., 2006; Semeraro et al., 1996; Stacey et al., 1996). Die Stimulation mit *B. burgdorferi* und die damit einhergehende erhöhte PAI-2 Expression resultierte in einer signifikant verminderten uPA-abhängigen Invasion durch Monozyten, was auf eine Rolle von PAI-2 in der Leukozytenmigration hinweisen könnte (Haile et al., 2006). Überdies demonstrierte eine experimentelle Studie einen 14-fachen Anstieg der PAI-2 Freisetzung in isolierten humanen Monozyten, die mit Lipopolysaccharid-haltigen äußeren Membranvesikeln stimuliert wurden, die spontan von bekannten Meningitiserreger *Neisseria meningitidis* freigesetzt wurden (Mirlashari et al., 2001). Dies könnte ein erster schwacher Hinweis dafür sein, dass *SERPINB2* in der Immunpathogenese einzelner bakterieller Meningitisformen beteiligt ist. Unterstützt wurde diese Beobachtung durch den Nachweis einer dramatischen Hochregulierung der zerebralen PAI-2 mRNA-Expression in den Gehirnen infizierter Mäuse während der

Einleitung

Pneumokokken-Meningitis (Paul et al., 2005). Die tatsächliche Rolle von PAI-2 in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis ist jedoch bislang nicht untersucht worden.

2 Fragestellungen

2.1 Fragestellung I

Im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis kommt es zu einer massiven Entzündungsreaktion, die maßgeblich für einen meningitisassoziierten Gewebeschaden im Gehirn verantwortlich ist (Gerber & Nau, 2010; Koedel, Scheld, et al., 2002). Über die zellulären Initiatoren dieser Entzündungsreaktion besteht immer noch Ungewissheit. Experimentelle Arbeiten erbrachten den Nachweis, dass postkapilläre Venolen die primäre Eintrittspforte sowohl für Pneumokokken als auch für Leukozyten in das ZNS darstellen (Coureuil et al., 2017; Gradstedt et al., 2013; Hyun & Hong, 2017; Iovino et al., 2017; Lorenzl et al., 1993; Wilson et al., 2010). Postkapilläre Venolen, die sich aus spezialisierten Endothelzellen und, eingebettet in die Basalmembran, Perizyten bestehen, sind von einem flüssigkeitsgefüllten Raum umgeben, der von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen und Mastzellen besiedelt ist (Brendecke & Prinz, 2015; Faraco et al., 2017; Liebner et al., 2018; Lopez-Atalaya et al., 2018; Owens et al., 2008). Neuere Studien zeigten keine oder nur partielle Effekte einer Mastzell-Defizienz oder Makrophagendepletion in Mausmodellen der Pneumokokken-Meningitis. Dies deutet daraufhin, dass zusätzliche Zellen, die sich im perivaskulären Raum befinden, an der Immunaktivierung beteiligt sind (Fritscher et al., 2018; Polfliet et al., 2001; Trostdorf et al., 1999; Zysk et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis im Detail charakterisiert werden. Es ergaben sich folgende Ziele:

- 1) Wie reagieren isolierte zerebrale Perizyten von Mensch und Maus auf eine Exposition mit Pneumokokken?
- 2) Welche Auswirkungen hat eine Reduktion der zerebralen Perizytenpopulation (pharmakologisch im Zebrafischmodell und genetisch im Mausmodell) auf den Krankheitsverlauf?
- 3) Können im Verlauf einer Pneumokokken-Meningitis Veränderungen an der zerebralen Perizytenpopulation in zwei unterschiedlichen Tiermodellen - im Zebrafischmodell und im Mausmodell - beobachtet werden?

2.2 Fragestellung II

Die Pneumokokken-Meningitis ist mit einer Dysregulation der Gerinnungskaskade und der Fibrinolyse assoziiert; dies kann zu Thromboembolien, Hämorrhagien und disseminierter intravaskulärer Gerinnung führen (Brouwer et al., 2014; Paul et al., 2005; Weisfelt et al., 2007; Winkler et al., 2002). Diese zerebrovaskulären Komplikationen sind häufig bestimmend für einen ungünstigen Krankheitsverlauf und eine erhöhte Mortalität (Pfister et al., 1992; Schut et al., 2012). In früheren Untersuchungen beobachtete unsere Arbeitsgruppe eine dramatische Hochregulierung der zerebralen PAI-2 Expression während einer Pneumokokken-Meningitis (Paul et al., 2005). PAI-2 werden vielfältige Funktionen zugeschrieben, die von einem klassischen Serpin bis hin zu einem Regulator des Inflammasoms oder der Komplementaktivierung reichen, jedoch bleibt seine genaue Rolle ein Rätsel (Medcalf & Stasinopoulos, 2005; Rittirsch et al., 2008; Schroder, Le, et al., 2010; Schroder et al., 2011). In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde versucht, die Rolle von PAI-2 im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis zu evaluieren. Folgende Ziele ergaben sich für die Arbeit:

- 1) Wie wirkt sich eine PAI-2 Defizienz im Verlauf der akuten und fortgeschrittenen Pneumokokken-Meningitis aus?
- 2) Wie beeinflusst PAI-2 Knochenmarksmakrophagen im Rahmen einer Infektion mit *S. pneumoniae*?

3 Material und Methoden

3.1 In-vitro Versuche

3.1.1 Primäre Zellen und Kulturbedingungen

Alle primären Zellen wurden in einem Brutschrank mit einer Temperatur von 37 °C und 5 % -iger CO₂-Begasung kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums, das Passagieren von Zellen und die Versuche fanden ausschließlich unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen statt.

3.1.1.1 Murine Perizyten

Für die Isolation und Kultivierung primärer muriner Perizyten wurde eine bereits publizierte Methode für diese Zellpopulation als Vorlage verwendet (Tigges et al., 2012). Zur Vorbereitung der Kultivierung wurde zuerst frisches Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) hergestellt. Dieses besteht aus 50 ml Nutrient Mixture F-12 Ham Medium (F12, #N4888, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), dem Endotoxin-freies, fetales bovines Serum (FBS, Konzentration im Medium 10 Volumenprozent, #10082-147, Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts), Penicillin/Streptomycin (P/S, Konzentration im Medium 1 Volumenprozent, #P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Endothelial cell growth supplement (ECGS, Konzentration im Medium 30 µg/ml, #02-101, MilliporeSigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Ascorbin (Konzentration im Medium 2,5 µg/ml, #A4034, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Glutamin (Konzentration im Medium 584 µg/ml, #G7513, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und Heparin (Konzentration im Medium 40 µg/ml, Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, Ratiopharm) zugesetzt wurden. Außerdem wurde frisches F12 Medium mit FBS (Konzentration im Medium 10 Volumenprozent) und P/S (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) vorbereitet. Nach Vorbereitung der Medien wurden 2 Wells einer 6-Well-Platte mit Kollagen (Verdünnt mit sterilem Wasser, Konzentration 10 Volumenprozent, #C8919, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) beschichtet, die daraufhin 2 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Danach wurden die Wells drei Mal gründlich mit phosphathaltiger Kochsalzlösung (PBS, phosphate buffered saline, #D8537, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gewaschen. Für die Präparation der C57BL6/n-Maushirne (Anzahl: 2) wurden vorab alle Klingen und Instrumente sterilisiert. Nachdem die Tiere durch Inhalation eines Gemisches aus 3.5 % Isofluran und Sauerstoff mittels eines Verdampfers (Vaporisateurs) in einer Plexiglas-Kammer narkotisiert wurden, wurden sie durch Genickbruch euthanasiert. Unter einer Sicherheitswerkbank wurden die Maushirne

Material und Methoden

freipräpariert und entnommen. Anschließend wurden die Maushirne in einer Petrischale (100 Millimeter), gefüllt mit Minimum Essential Medium (MEM) - HEPES-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 1% P/S, eingelegt und mit einer Rasierklinge zerkleinert. Daraufhin wurde das Hirngewebe mit umgebender Flüssigkeit in ein 15 ml Falcon pipettiert und für 5 Minuten zentrifugiert (bei 1200 UPM, Umdrehungen pro Minute). In der Zwischenzeit wurde die Papain Dissociation Solution (Papain Cell Dissociation System, Worthington Biochemical Corp., Lakewood, New Jersey, USA) vorbereitet. Dazu wurde 5 ml MEM-HEPES mit 1% P/S zu Papain hinzugefügt und 0.5 ml Medium zur DNase. Beides wurde anschließend für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der abgeschlossenen Zentrifugation der Maushirne wurde der Überstand abgesaugt und pro Maushirn 0.833 ml Papain-Lösung und 41.7 µl DNase-Lösung hinzugefügt. Nach mehrmaligem Mischen mit der Pipette wurde die Suspension für insgesamt 1 Stunde und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Gewebe mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit 19G und 21G Einmal-Kanülen zerkleinert. Anschließend wurde 7 ml einer 22%-igen Albumin-Lösung (bovines Serum-Albumin = BSA, Konzentration 22 %, #A7284, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) hinzugefügt und die Suspension erneut durchmischt. Darauf wurde die Suspension abermals zentrifugiert (für 10 min bei 2600 UPM) und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde dann mit 2 ml ECGM resuspendiert und wieder zentrifugiert (für 5 min bei 1200 UPM). Schließlich wurde das restliche Zellpellet mit 4 ml ECGM resuspendiert, in die 2 Wells der beschichteten 6-Well-Platte pipettiert und für eine Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem ECGM. In den darauffolgenden Tagen wurde alle 2-3 Tage das Zellkulturmedium gewechselt und unter einem Lichtmikroskop das Wachstum der Zellen beobachtet. Sobald sich eine konfluente Einzelzellschicht gebildet hatte, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit frischem F12 Medium mit FBS (Konzentration im Medium 10 Volumenprozent) und P/S (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) gewaschen. Nach Entfernung des F12 Mediums wurde in jedes Well 2 ml Trypsin-Lösung (Konzentration 0.05 % in EDTA, #T4049, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gegeben und die Platte für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde unter einem Lichtmikroskop überprüft, ob die Zellen sich vom Boden der Gewebekulturplatte gelöst hatten. Wenn dies der Fall war, wurde in jedes Well zusätzlich 2 ml F12 Medium gegeben. Die Suspension wurde dann in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert und zentrifugiert (für 5 min bei 1200 UPM). Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in 8 ml ECGM resuspendiert. Das Zellgemisch wurde anschließend in 4 Wells a 2 ml aufgeteilt.

Die Platte wurde wieder inkubiert. Sobald sich wieder eine konfluente Einzelzellschicht formiert hatte, wurden die Zellen nach dem Passagieren in Pericyte Growth Medium (PGM, Pericyte Medium, ScienCell #1201, San Diego, Kalifornien und 1 % Pericyte Growth Supplement, ScienCell #1252, San Diego, Kalifornien) resuspendiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen nur noch in PGM kultiviert und je nach Zellwachstum in größeren Zellkulturflaschen (mit einer Fläche bis zu 75 cm²) gezüchtet. Zur Bestimmung der Zellzahl im weiteren Verlauf wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer benutzt (Siehe Unterpunkt 3.1.2 zur genauen Beschreibung).

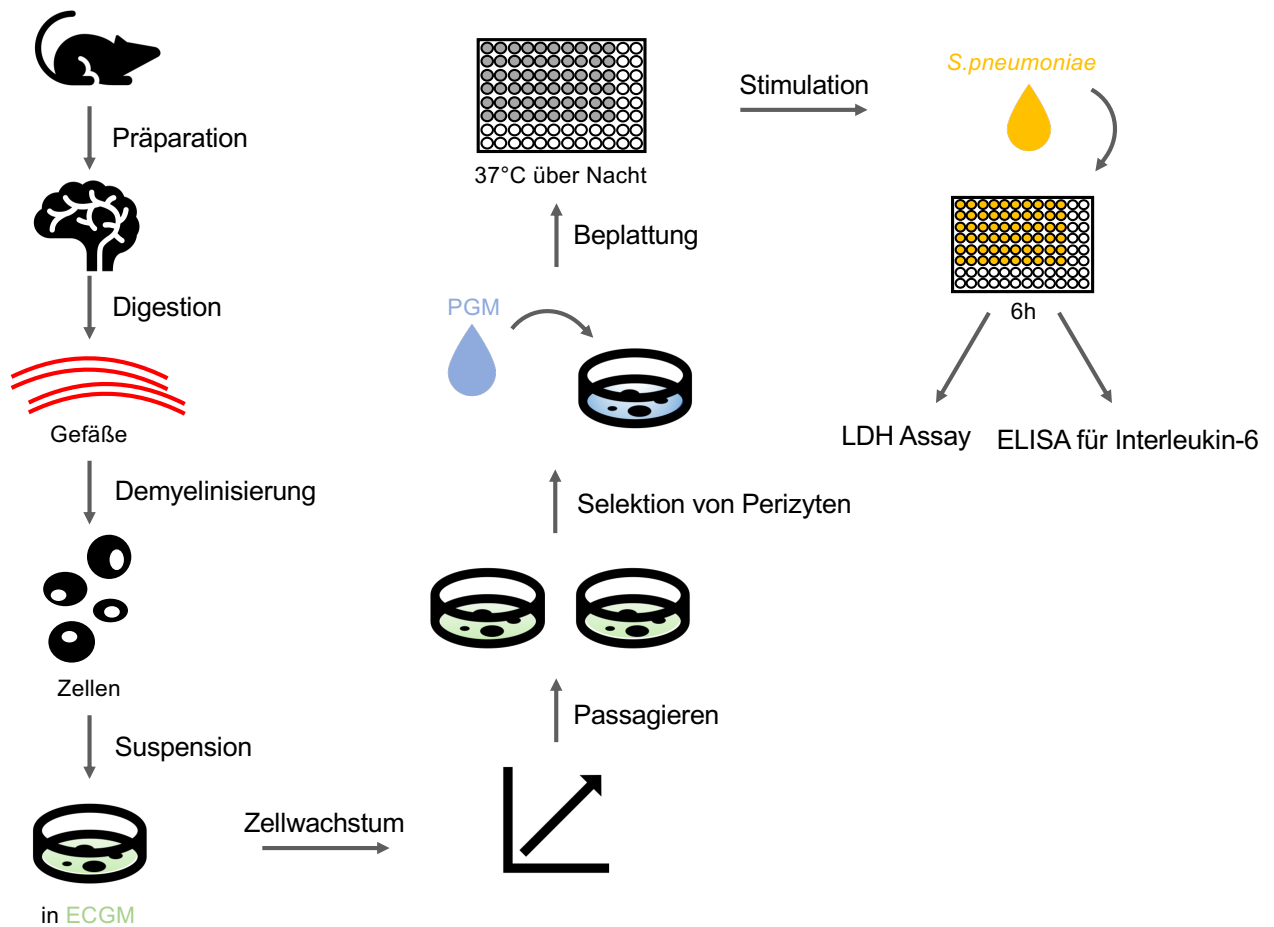


Abbildung 4: Flussdiagramm zur Kultivierung von murinen Perizyten.

3.1.1.2 Humane Perizyten

Um zu klären, ob die in murinen Perizyten-Kultursystemen erhobenen Befunde auf den Menschen zu übertragen sind, wurden in zusätzlichen Versuchsreihen kommerziell erhältliche primäre humane zerebrale Gefäßperizyten (HBVP, Human Brain Vascular Pericytes, #1200 ScienCell, San Diego, Kalifornien) eingesetzt. Für die Kultivierung der kryokonservierten Zellen mussten diese bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut werden. Zur Vorbereitung der Zellkultur wurde ein Tag vorher eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Poly-L-Lysin (2 µg/cm²,

Material und Methoden

#0403, ScienCell, San Diego, Kalifornien, USA) beschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium (Pericyte Growth Medium, PGM) vorbereitet, das in seiner Zusammensetzung dem der murinen Perizyten gleicht. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie unter einer Sicherheitswerkbank steril in die beschichteten, mit Medium gefüllten Zellkulturflaschen transferiert. Danach wurden die Flaschen vorsichtig geschüttelt, um die Zellen zu verteilen. Anschließend wurden sie in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Von nun wurde an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Sobald der Boden der Zellkulturflasche zu über 50% mit Zellen bewachsen war, wurde das Medium täglich gewechselt.

Für das Passagieren der Zellen wurden Kulturen verwendet, bei denen die Böden der Flaschen so gut wie lückenlos mit Zellen bedeckt waren. Erneut wurden Poly-L-Lysin beschichtete 75 cm² Zellkulturflaschen vorbereitet. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit Dulbeccos's phosphate-Buffered Saline (DPBS, #0303, ScienCell, San Diego, Kalifornien, USA) gewaschen. Bei dem zweiten Waschvorgang wurde dem DPBS (10 ml) 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0.25 %, #0103, ScienCell, San Diego, Kalifornien, USA) beigelegt und die Zellen für 1-2 Minuten inkubiert. Nachdem unter einem Lichtmikroskop festgestellt wurde, dass die Zellen sich vom Boden gelöst hatten, wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen pipettiert, in das vorab 5 ml FBS gegeben worden war. Daraufhin wurde in den 75 cm² Zellkulturkolben 5 ml Trypsin Neutralisationslösung (TNS, Trypsin Neutralization Solution, #0113, ScienCell, San Diego, Kalifornien, USA) zugegeben und die gesamte Suspension in dasselbe 50 ml Falcon transferiert. Danach wurde der Zellkulturflasche erneut 5 ml TNS hinzugefügt und diese Flüssigkeit abermals in das Falconröhrchen pipettiert. Nach diesem Vorgang sollten in der Zellkulturflasche weniger als 5 % der initial vorhandenen Zellen zu sehen sein. Das Falconröhrchen wurde nun zentrifugiert (für 5 min bei 1000 UPM) und das resultierende Zellpellet mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine neue beschichtete Zellkulturflasche pipettiert. Diese wurde nun wieder inkubiert. Zur Bestimmung der Zellzahl im weiteren Verlauf wurde wieder eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer benutzt (Siehe Unterpunkt 3.1.2 zur genauen Beschreibung).

3.1.1.3 Murine Knochenmarks-Makrophagen

Murine Knochenmarks-Makrophagen (Engl.: bone marrow-derived macrophages, BMDM) (aus WT (C57BL6/n-Mäuse) und PAI-2-defiziente Mäuse (siehe Unterpunkt: 3.3.2.2) wurden einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll folgend (Hoegen et al., 2011) aus

Knochenmarkszellen hergestellt, die aus Femora gewonnen wurden. Dafür wurden die Mäuse wie oben beschrieben narkotisiert und euthanasiert. Danach wurden die Femora entnommen, die Knochen mit jeweils 5 ml gekühlter und steriler PBS gespült und das Knochenmark gesammelt. Anschließend wurden die Zellen durch ein 70µm Netz filtriert und das Filtrat anschließend zentrifugiert. Nach Lyse der Erythrozyten durch hypotone NaCl-Lösung wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Nach einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation konnte die obere Bande, die von mononukleären Zellen gebildet wird, abpipettiert und nochmals zentrifugiert werden. Daraufhin wurden die Zellen in Makrophagenmedium (enthält Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM, #D6429 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 50 ng/ml (rM)-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, #300-25 Peprotech Germany, Hamburg, Deutschland), 10% FCS (Fetal Calf Serum, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 mM HEPES und 10 mg/ml P/S) resuspendiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach 4 Tagen wurde das Medium ausgetauscht. Ab Tag 7 konnten die Zellen für die Stimulationsexperimente verwendet werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer benutzt (Siehe Unterpunkt 3.1.2 zur genauen Beschreibung).

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension der jeweiligen Zelltypen mit 80 µl Trypanblau-Lösung (Trypan-Blau Lösung 0.4 %, #T8154, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gemischt. Der Farbstoff Trypanblau reichert sich im Zytoplasma toter Zellen an und färbt diese tiefblau, während vitale Zellen den Farbstoff aus der Zelle ausschleusen; dadurch kann man im lichtmikroskopischen Bild vitale (erscheinen im Bild hell) von toten Zellen (erscheinen im Bild dunkel) unterscheiden. Nachdem die Zellsuspension in die Zählkammer gegeben wurde, wurde die Anzahl vitaler Zellen eines Großquadrates mittels Lichtmikroskop ermittelt und die Zellzahl/µl nach folgender Formel berechnet:

$$X = \frac{N \times VF}{T}$$

X = Zellzahl/µl

N = Anzahl der gezählten Zellen in einem Großquadrat

VF = Verdünnungsfaktor; hier 5 bei 1:5 Verdünnung

T = Kammertiefe 0,2 mm

3.1.3 Zellkulturexperimente

3.1.3.1 Murine & humane Perizyten

Da die Experimente der murinen und humanen Perizyten einem identischen Protokoll gefolgt sind, werden sie hier gemeinsam besprochen. Bevor die Experimente durchgeführt werden konnten, mussten die Zellen in ein sogenanntes Stimulationsmedium ausgesät werden: Dazu wurde das Zellpellet nach dem Passagieren, wie im Unterpunkt 3.1.1.1 beschrieben, in PGM und FCS (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellzahl, wie im Unterpunkt 3.1.2, beschrieben bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von 200.000 Zellen pro Vertiefung (200 μ l) in eine 96-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert. Anschließend wurden sie für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und konnten am nächsten Morgen für die Experimente verwendet werden.

Um einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, ob Perizyten an der Immunantwort bei der Pneumokokken-Meningitis beteiligt sein könnten, wurden die Zellen in einem ersten Versuchsansatz mit aufsteigenden Konzentrationen (2,5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 4 x 10⁷, 16 x 10⁷ koloniebildenden Einheiten pro ml (Engl.: Colony-forming units, cfu)) von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39-Stamm, der uns freundlicherweise von Herrn Prof. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, Deutschland, zur Verfügung gestellt wurde) stimuliert. Nach 4 Stunden wurde zur Abtötung der Bakterien P/S hinzugefügt (Konzentration im Medium, 1 Volumenprozent). Nach 6 Stunden wurde das Experiment beendet und der Zellkultur-Überstand für die Messung der LDH-Aktivität und nach folgende Zytokin-Bestimmungen mittels ELISA (siehe unten) sowie Proteome-Profiler-Assays (siehe unten) verwendet.

Als nächstes versuchten wir mit Hilfe einer Inhibitionsstrategie, mögliche PRRs zu identifizieren, die an der Erkennung von Pneumokokken durch Perizyten beteiligt sind. Dazu wurden dem Kulturmedium zusätzlich zum *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39-Stamm; 4x10⁷ cfu/ml) folgende Hemmstoffe beigefügt: der endosomale TLR Inhibitor Chloroquin (20 μ g/ml, #C6628, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), ein funktionsblockierender Anti-Toll-like-Rezeptor-2-Antikörper (Anti-TLR-2, 25 μ l/ml, #HM1054, Hycult Biotech, Uden, the Netherlands), der NF- κ B Inhibitor Parthenolid (5 μ M, #70080, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) und der TLR-4 Inhibitor Resatorvid (5 μ M, #TAK-242, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Wirkung der einzelnen Hemmstoffe wurden auch Kombinationen verschiedener Hemmstoffe getestet (anti-TLR-2 AK, Resatorvid und Chloroquin; Anti-TLR-2 und Chloroquin). Auch hier wurde nach 4

Stunden zur Abtötung der Bakterien P/S hinzugefügt (Konzentration im Medium, 1 Volumenprozent). Nach 6 Stunden wurde das Experiment beendet und der Zellkultur-Überstand für die Messung der LDH-Aktivität und für Zytokin-Bestimmungen verwendet.

In einem dritten Versuchsansatz exponierten wir murine und humane Perizyten mit aufsteigenden Konzentrationen ($2,5 \times 10^6$, 1×10^7 , 4×10^7 , 16×10^7 cfu/ml) von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39-Stamm), der Pneumolysin (PLY)-defizienten isogenen Mutante des Serotyp 2, Serotyp 6B und Serotyp 7F. In diesem Versuch wurde dem Stimulationsmedium direkt bei der Aussaat P/S (Konzentration im Medium 1 Volumenprozent) hinzugegeben, um Unterschiede im Wachstum der Bakterien entgegenzuwirken, die zu unterschiedlichen bakteriellen Konzentration im Medium führen und dadurch einen Vergleich zwischen den Serotypen unmöglich machen würden. Nach 6 Stunden wurde das Experiment beendet und der Zellkultur-Überstand für die Messung der LDH-Aktivität und für Zytokin Bestimmungen verwendet. Alle Experimente wurden in Duplikaten mindestens 3 Mal durchgeführt.

3.1.3.2 Knochenmarks-Makrophagen

Am Tag 7 wurden PAI-2-defiziente und WT BMDM nach Abnahme des Mediums für 10 Minuten in einer Akkutase Lösung inkubiert und so von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zentrifugiert und die Zellen in ein Stimulationsmedium (1% FBS, kein M-CSF) aufgenommen. Nun wurde die Zellzahl, wie im Unterpunkt 3.1.2. beschrieben, bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von 200.000 Zellen pro Vertiefung (200 μ l) in eine 96-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert, für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, und am nächsten Morgen nach einem weiteren Mediumwechsel (nun Stimulationsmedium: 1% FBS, kein P/s) für die Experimente verwendet.

Um herauszufinden, inwiefern PAI-2 an der Immunantwort bei der Pneumokokken-Meningitis beteiligt sein könnte, wurden PAI-2-defiziente und WT BMDM mit aufsteigenden Konzentrationen (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml) von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39-Stamm) stimuliert. Nach 4 Stunden wurde zur Abtötung der Bakterien Ceftriaxon (100 μ g/ml, Hikma Pharma, Martinsried, Deutschland) hinzugefügt. Nach insgesamt 24 Stunden wurde das Experiment beendet und der Zellkultur-Überstand für die Messung der LDH-Aktivität und die Zytokin- und PAI-2-Bestimmungen verwendet bzw. weggefroren. Außerdem wurden Ribonukleinsäuren (Engl.: Ribonucleic acid, RNA) von infizierten und nicht-infizierten PAI-2-defizienten und WT BMDM isoliert und für RT-PCR-Analysen ausgewählter Oberflächen- und Phänotypmarker für Makrophagen sowie von PAI-2 verwendet (Siehe Unterpunkt 3.1.5). Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und drei Mal wiederholt.

3.1.4 Messparameter

3.1.4.1 LDH-Aktivität

Die Zellvitalität wurde mithilfe des „LDH Cytotoxicity Assay Kit II“ (Biovision Research Products, Mountain View, USA) untersucht. Bei diesem Test wird die extrazelluläre Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) analysiert, eines Enzyms, das konstitutiv im Zytoplasma von Zellen zu finden ist. Bei Schäden an der Plasmamembran der Zelle und beim Zelltod wird LDH freigesetzt. Zur Quantifizierung der Zellvitalität kann mithilfe des Kits eine biologische Reaktion von LDH genutzt werden. Das freigesetzte LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat und die Umwandlung von NAD^+ zu NADH/H^+ . Daraufhin wird ein Tetrazolium-Salz-Substrat (wasserlösliches Tetrazolium-Salz; WST) hinzugegeben, das in Gegenwart von NADH/H^+ in einen gelben Farbstoff umgewandelt wird. Dessen Absorption kann spektrophotometrisch gemessen werden und korreliert mit der Anzahl der lysierten Zellen.

Wie oben erwähnt wurde die LDH-Aktivität mit Hilfe des „LDH Cytotoxicity Assay Kit II“ bestimmt. Dazu wurden die jeweiligen Zellkulturplatten nach Beendigung des Experiments zentrifugiert (für 5min bei 1200 UPM). Daraufhin wurden jeweils 10 μl des Überstandes in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Nach Zugabe von 100 μl einer Reaktionsmischung, die aus dem WST-Substrat und LDH-Assay-Puffer bestand, wurde die Suspension 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Absorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm mit einem Mikroplattenleser gemessen. Als Hintergrundkontrollen wurden reines Zellkulturmedium (Negativkontrolle) und mit Triton X-100 (*t*-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) lysierte Zellen (Positivkontrolle) verwendet. Die Zytotoxizität wurde durch die jeweilige optische Dichte (optical density, OD) beschrieben.

$$D_{\text{opt}} = \lg I_0/I$$

I_0 = einfallende Lichtintensität

I = durchgelassene Lichtintensität

3.1.4.2 Messung der Zytokinproduktion und PAI-2 Freisetzung mittels ELISA

Zur Messung der Zytokinproduktion der Zellen wurden „Mouse-“ bzw. „Human ELISA Kits“ von R&D Systems (Minneapolis, Minnesota) verwendet. Zur Messung der PAI-2 Freisetzung

wurde ein „Mouse ELISA Kit“ von Fine Test (Wuhan, Hubei, China) benutzt. Der ELISA ist eine immunologische Methode, die dem Nachweis bestimmter Moleküle dient.

Die Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kits wurden entsprechend der Anleitung der Hersteller verwendet. Am jeweiligen Versuchsende wurden die Zellkulturplatten zentrifugiert (für 5 min bei 1200 UPM und 5°C). Daraufhin wurde der Zellkulturüberstand in eine neue 96-Loch-Platte transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -30 °C eingefroren. In einem ersten Schritt wurde eine 96-Loch-Platte mit einem primären Antikörper über Nacht beschichtet. Am nächsten Morgen wurde die Platte 3 mal mit einer Waschpufferlösung gewaschen. Im Anschluss wurden die zu untersuchenden Proben sowie eine Verdünnungsreihe des Standards in die 96-Loch-Platte pipettiert. Letztere diente der späteren Berechnung der Zytokin-Konzentrationen der Proben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem erneuten Waschvorgang wurde ein Biotin-gekoppelter sekundärer Antikörper in der vorgegebenen Konzentration hinzugeben und die Platte abermals für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut gewaschen und das mit Avidin konjugierte HRP hinzu pipettiert. Dieses musste 20 Minuten bei Raumtemperatur einwirken. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde ein Farbsubstrat, bestehend aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin, hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch die HRP vermittelte Umwandlung des Farbstoffsubstrats wurde abschließend durch Zugabe von H₂SO₄ gestoppt. Anschließend wurde die Farbintensität der Proben mittels Mikroplattenleser bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Zur Auswertung konnte mithilfe einer Standardkurve aus den gemessenen optischen Dichten der Proben die Zytokin- und PAI-2 Konzentrationen berechnet werden.

3.1.4.3 Messung der Zytokinproduktion mittels Proteom Profiler Assay

Zur Messung der Zytokinproduktion von murinen und humanen Perizyten verwendeten wir Proteom Profiler Assays (Muriner Proteom Profiler Array ARY006 von R&D Systems und Humaner C3 Array von Raybiotech). Mit einem Proteom Profiler Array Kit können multiple Zytokine gleichzeitig nachgewiesen werden. Das Prinzip ist ein membranbasierter Sandwich-Immunoassay. Zunächst werden alle Reagenzien und Proben gemäß Anleitung vorbereitet. Dann wird der Array-Puffer in eine 4-Well-Platte pipettiert, um als Blockpuffer zu dienen. Die Membranen werden aus den Schutzblättern entfernt und in die 4-Well-Platte gelegt, gefolgt von einer einstündigen Inkubation auf einer Wippschüttelplattform. Währenddessen werden die Proben vorbereitet. Zu den Proben werden dann die Maus/Humanen-Zytokin-Array-

Detektions-Antikörper hinzugefügt und eine weitere einstündige Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wird der Puffer aus der 4-Well-Platte entfernt und durch die vorbereiteten Proben/Antikörper-Mischungen ersetzt. Die 4-Well-Platte wird über Nacht bei 2-8 °C auf einer Wippschüttelplattform inkubiert. Danach werden die Membranen in individuellen Behältern mit Waschpuffer gewaschen und anschließend weitere Waschschrte durchgeführt. Verdünntes Streptavidin-HRP wird zu den Vertiefungen der Multischale gegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation und erneutem Waschen der Membranen. Dann wird das Reagenzgemisch auf die Membranen pipettiert und eine einminütige Inkubation durchgeführt. Schließlich werden die Membranen mit einer Plastikfolie bedeckt und mittels verstärkter Chemilumineszenz (Femtomax-110; Rockland, USA) mit einem UVP Chemidoc-IT Imaging System (UVP, UK) sichtbar gemacht. Die Bilder wurden mit der Software ImageJ (NIH, USA) ausgewertet.

3.1.5 RT-qPCR-Analysen von Knochenmarks-Makrophagen

Zur Messung der Expression von Makrophagen Oberflächenmarker (CX₃CR1, ITGAM (CD11b), MRC1 (CD206), CD36), Makrophagen Phänotypmarker (iNOS, ARG1), sowie PAI-2, wurde sowohl von infizierten als auch nicht infizierten PAI-2-defizienten und WT BMDM RNA isoliert (AurumTM Total RNA Mini Kit, #732-6820, BioRad, Hercules, Kalifornien) und mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und quantitativer Echtzeit-PCR (Engl.: Real-time quantitative PCR, qPCR) (iScriptTM gDNA Clear cDNA Synthesis Kit, #172-5034, BioRad, Hercules, Kalifornien) (unter Verwendung von kommerziell erhältlichen PrimePCRTM Primer Pärchen von BioRad, Hercules, Kalifornien) analysiert. Die RT-PCR ist ein Verfahren, mit welchem man RNA vervielfältigen kann, um somit die mRNA-Genexpression von Zellen zu analysieren (Bachman, 2013). Dabei nutzt man als Enzym die Reverse Transkriptase, welche vorerst RNA in cDNA (Engl.: complementary DNA) umschreibt. Nachträglich kann nun die cDNA durch die PCR amplifiziert werden. Zur Quantifizierung der DNA verwendeten wir die qPCR, bei der die PCR-Produkte während der Amplifikation durch Fluoreszenzmessungen in Echtzeit nachgewiesen werden (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016).

Zur RNA-Isolierung verwendeten wir das AurumTM Total RNA Mini Kit nach Herstellerangaben. Nach Ablösen der Zellen aus den Zellkulturplatten wurden diese zusammen mit PBS und Lyse-Lösung in ein Gefäß gegeben und durch 12-maliges auf und ab Pipettieren gemischt. Anschließend wird 70% Ethanol zugegeben und erneut gemischt. Die Lysatlösung wird in ein 2 ml-Röhrchen ohne Kappe übertragen und zentrifugiert, um das Filtrat zu

entfernen. Nach Zugabe einer Niedrigstringenz-Waschlösung wird erneut zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Eine verdünnte DNase-Lösung wird dem Lysat zugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneut zentrifugiert wird, um das Filtrat zu entfernen. Anschließend wird eine Lösung für die Hochstringenz-Wäsche hinzugefügt, zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Eine weitere Niedrigstringenz-Waschlösung wird zugegeben, zentrifugiert und das Filtrat entsorgt. Nach einer zusätzlichen Zentrifugation für 1 Minute wird die RNA-Bindungssäule in ein 1,5 ml-Röhrchen mit Kappe überführt. Eine Lösung zur Elution bei 70°C wird auf den Membranstapel gegeben, inkubiert und dann für 2 Minuten zentrifugiert, um die Elution durchzuführen. Um die nun isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben verwendet. Der Vorgang beginnt mit der Vorbereitung des DNase-Mastermixes. Anschließend wird der DNase-Mastermix zu den RNA-Proben gegeben und bei 25°C für 5 Minuten inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 75°C für weitere 5 Minuten. Danach wird der iScript-Reverse-Transkriptase-Supernix zu den DNase-behandelten RNA-Proben gegeben und erneut inkubiert. Zuerst bei 25°C für 5 Minuten, dann bei 46°C für 20 Minuten und schließlich bei 95°C für 1 Minute. Die nun generierte cDNA wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen PrimePCR™ Primer Pärchen mittels qPCR amplifiziert und durch Fluoreszenzmessungen in Echtzeit nachgewiesen. Die quantitative PCR (qPCR) wurde auf einem qTower³ Real-Time PCR Detection System (Analytik Jena) durchgeführt.

3.2 Zebrafischmodell der Pneumokokken-Meningitis

3.2.1 Zebrafischlinien und Haltung

Ausgewachsene Wildtyp (WT)-Zebrafische der Linie *Tüpfel long fin* (Früher: Tübingen long fin) und *TgBAC(pdgfrb:EGFP/Tg(flila:Myr-mCherry)* (TG)-Zebrafische (die TG Zebrafischeier wurden uns freundlicherweise von Naoki Mochizuki and Shigetomo Fukuhara, Osaka, Japan, zur Verfügung gestellt) wurden, wie zuvor beschrieben, bei 26°C in belüfteten 5-Liter-Behältern mit einem 10/14 Stunden Hell/Dunkel Zyklus gehalten (Chi et al., 2008; Ellett et al., 2011; Renshaw et al., 2006). Die Zebrafischeier wurden innerhalb der ersten Stunde nach der Befruchtung (Engl.: hours post fertilization, hpf) entnommen und dann bei 28°C in E3-Medium (5,0 mM NaCl, 0,17 mM KCL, 0,33 mM CaCl₂·2H₂O, 0,33 mM MgCl₂·7H₂O, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) gehalten. 24 hpf wurden die Embryos mechanisch mittels Pinzette dechorionisiert. Alle Verfahren, die Zebrafisch Embryos involvierten, entsprachen den örtlichen (Niederlande) Tierschutzbestimmungen.



Abbildung 5: 24 Stunden alter Zebrafisch Embryo. Der Maßstabsbalken zeigt 100 μm Länge an.

3.2.2 Infektion

2 Tage nach der Befruchtung (Engl.: days post fertilization, dpf) wurden die Embryos zunächst mittels 0,02 % (w/v) gepuffertem 3-Aminobenzoensäuremethylester (pH 7,0, Tricaine #A5040, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) narkotisiert. Daraufhin wurden die Zebrafisch- Embryos einzeln durch Mikroinjektion mit 1 nl *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39-Stamm)-Lösung (verdünnt in 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung [#P0290, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri]) in den Hinterhirnventrikel infiziert (Benard et al., 2012). Kontrollen wurden mit 1 nl 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung injiziert (**Abbildung 6, 7**), wobei in jeder Gruppe 20 Embryos pro Well einzeln injiziert wurden. Nach der Infektion wurden die Zebrafisch Embryos in 6-Well-Platten bei 28 °C gehalten. Die Anzahl der cfu pro Injektion wurde durch quantitative Ausplattierung des Injektionsvolumens bestimmt. Wir bestimmten die Sterblichkeitsrate, indem wir die Anzahl lebender (Herzschlag vorhanden) und toter Embryos (Kein Herzschlag vorhanden) zu festgelegten Zeitpunkten (24, 48, 72 Stunden nach der Injektion) ermittelten. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

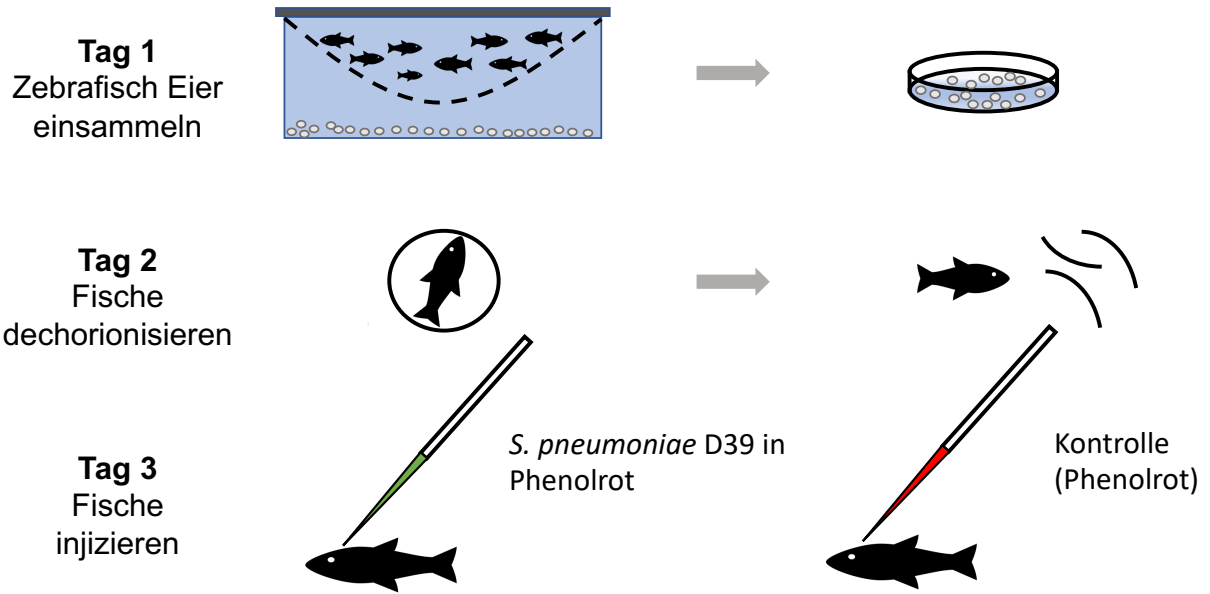


Abbildung 6: Versuchsaufbau und Protokoll für das Zebrafischmodell der Pneumokokken-Meningitis.

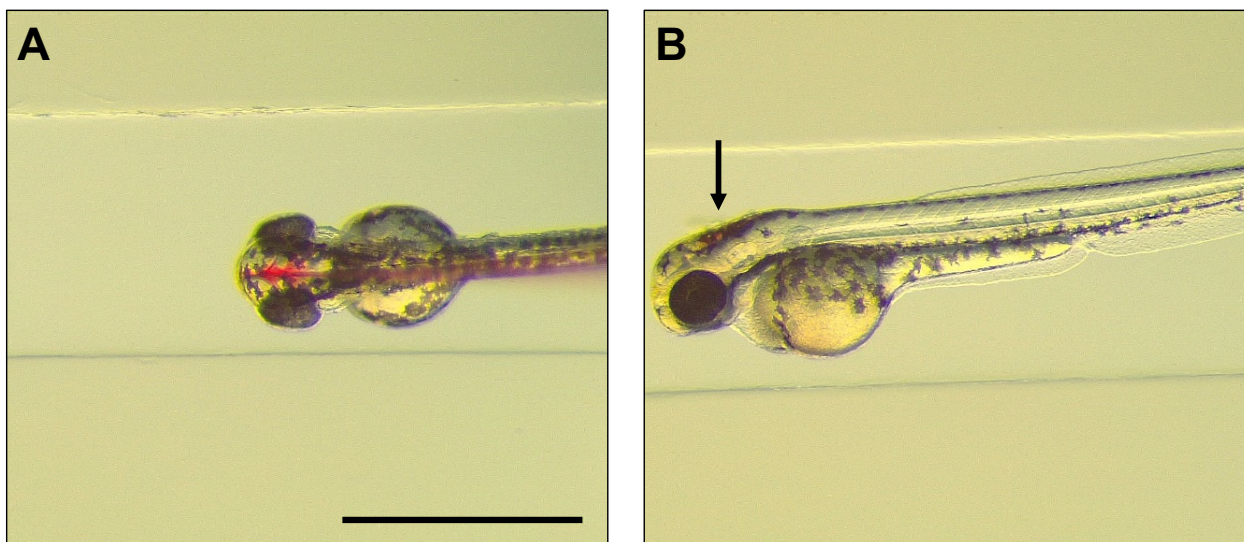


Abbildung 7: Ein 3 Tage alter Zebrafisch-Embryo (Aufsicht (A) und Seitenansicht (B)) nach Injektion von Phenolrot. Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm Länge an.

3.2.3 Perizytendepletion im Zebrafischmodell

Zur Reduktion der Perizytenpopulation in WT und TG Zebrafisch Embryos verwendeten wir eine von Ando et al. etablierte Methode, nämlich eine Behandlung mit dem PDGFR β -Inhibitor AG1296 (#ab141170, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) (Ando et al., 2016). Dem Haltemedium (E3-Medium) von Kontroll- und infizierten Zebrafisch Embryos wurde dafür ab dem dritten Tag (Infektionstag) entweder der genannte PDGFR β Inhibitor AG1296 (verdünnt

in DMSO, 20 μ M) oder aber als Placebo DMSO (20 μ M, #8418, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) hinzugefügt (**Abbildung 8**).

3.2.4 Experimentelle Gruppen

Die folgenden Versuchsgruppen wurden untersucht (**Abbildung 8**):

- 1) WT und TG Zebrafische, die mit 1 nl 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung in den Hinterhirnventrikel injiziert und mit DMSO behandelt wurden (Kontrollen mit Placebo behandelt; $n = 20$ pro Experiment);
- 2) WT und TG Zebrafische, die mit 1 nl 1: 4 verdünnter Phenolrot-Lösung injiziert und mit dem PDGFR β -Inhibitor AG1296 behandelt wurden (Kontrollen mit Inhibitor behandelt; $n = 20$ pro Experiment);
- 3) WT und TG Zebrafische, die in den Hinterhirnventrikel mit 1 nl von *S. pneumoniae* (verdünnt in 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung) injiziert und mit DMSO behandelt wurden (Placebo-Gruppe, $n = 20$ pro Experiment);
- 4) WT und TG Zebrafische, denen 1 nl *S. pneumoniae* (verdünnt in 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung) in den Hinterhirnventrikel injiziert und die mit dem PDGFR β -Inhibitor AG1296 behandelt wurden (Inhibitor-Gruppe, $n = 20$ pro Experiment).

Im Rahmen der Analysen für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden zusätzliche Versuchsgruppen gebildet. Zur Evaluierung des Effektes des Inhibitors AG1296:

- 1) TG Zebrafische, die mit 1 nl 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung in den Hinterhirnventrikel injiziert und mit DMSO behandelt wurden ($n = 4$);
- 2) TG Zebrafische, die mit 1 nl 1: 4 verdünnter Phenolrot-Lösung injiziert und mit dem PDGFR β -Inhibitor AG1296 behandelt wurden ($n = 4$).

Zur Analyse der Verteilung der Perizyten auf den zerebralen Gefäßen im Verlauf der *S. pneumoniae*-Infektion:

- 1) TG Zebrafische, die mit 1 nl 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung in den Hinterhirnventrikel injiziert wurden ($n = 5$);

- 2) TG Zebrafische, denen 1 nl *S. pneumoniae* (verdünnt in 1:4 verdünnter Phenolrot-Lösung) in den Hinterhirnventrikel injiziert wurden ($n = 5$).

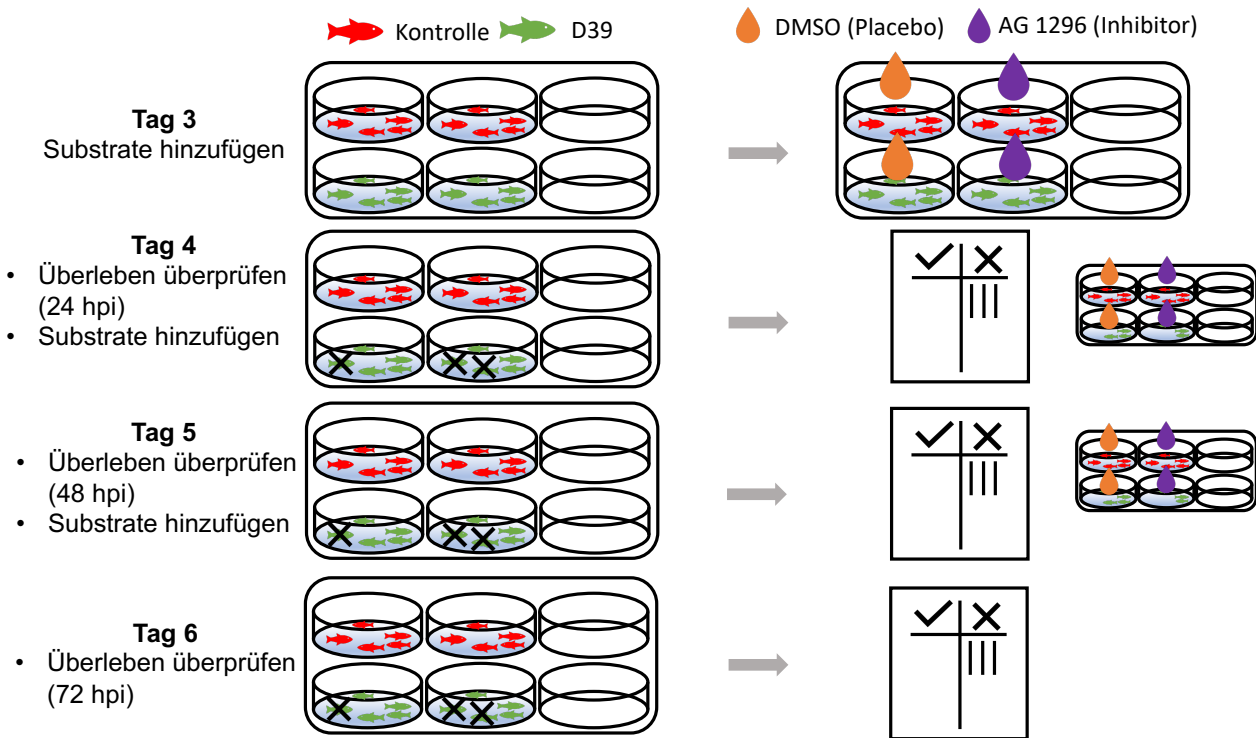


Abbildung 8: Experimentelle Gruppen und Versuchsaufbau der Perizytendepletion im Zebrafischmodell.

3.2.5 Histopathologische Analyse

Für die histopathologische Analyse wurden Zebrafisch Embryos, aus jeder der oben genannten Gruppen in 4 % Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in PBS fixiert, in Paraffin eingebettet und sagittal in 4 μm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf StarFrost-Objektträger aufgetragen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die gefärbten Objektträger wurden mit einem Menari D-SIGHT Fluo-Scanner (Florenz, Italien) bei 100-facher Vergrößerung mit Ölimmersion für die histopathologische Beurteilung gescannt.

3.2.6 Fluoreszenz Mikroskopie

Damit die Zebrafisch Embryos auch zu einem späteren Zeitpunkt noch transparent bleiben und keine Pigmentflecken ausbilden, wurden alle Zebrafische für die Fluoreszenz Mikroskopie der oben genannten Gruppen ab 12 hpf und dann jeden Tag bis 48 hpi mit *N*-Phenylthiourea (PTU, 200 μM , #103-85-5, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) behandelt. 48 hpi wurden die Zebrafisch Embryos entnommen und 2 Stunden lang in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Embryos mit PBS gewaschen und für maximal einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt. Für eine optimale Bildgebung wurden die Embryos in 1,5 %

niedrigschmelzender Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), die in PBS gelöst war, in einer offenen, unbeschichteten 8-Well-Mikroskopie- μ -Slide (<http://ibidi.com>) eingebettet. Bilder wurden mit einem Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop (Wetzlar, Deutschland) erstellt und anschließend mit der Leica Application Suite X und der Software ImageJ bearbeitet, insbesondere für Helligkeits-/Kontrastverbesserungen und die Erstellung zusammengesetzter Bilder.

3.3 Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis

3.3.1 Versuchsablauf

Wir verwendeten ein bereits gut charakterisiertes Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis (Hoegen et al., 2011). Zu Versuchsbeginn wurden die Mäuse gewogen, klinisch bewertet, die Temperatur gemessen und das Erkundungsverhalten mittels Open-Field-Test (OFT) (Gould et al., 2009) evaluiert. Die klinische Bewertung umfasste einen Balkengangtest (Carter et al., 2001), einen Haltungsreflextest (Vidal et al., 2004), das Vorhandensein/Fehlen von Fell- und Vigilanzveränderungen, sowie von Krampfanfällen. Die maximale klinische Punktzahl war 13, hinweisend für schwerer erkrankte Mäuse, die aus Gründen des Tierschutzes euthanasiert werden mussten, während eine Punktzahl von 0 für gesunde Mäuse stand. Nach einer initialen klinischen Beurteilung wurde den Mäusen subkutan Buprenorphin zur Analgesie appliziert. Eine Stunde später wurde eine bakterielle Meningitis durch intrazisternale Injektion von 15 μ l von 10^7 cfu/ml *S. pneumoniae* Typ 2 (D39-Stamm) unter einer Kurzzeitanästhesie mit Isofluran ausgelöst. Um den Tod durch eine überschießende bakterielle Infektion zu verhindern, wurden die Mäuse nach 18 Stunden (im Rahmen der Perizyten Untersuchungen) bzw. nach 24 Stunden (im PAI-2-Projekt) mit Ceftriaxon behandelt, klinisch bewertet und anschließend für weitere 24 Stunden (insgesamt 42 Stunden im Perizyten-Projekt bzw. 48 Stunden im PAI2-Projekt) beobachtet. Am Ende der Versuche wurden die Tiere jeweils erneut klinisch untersucht.

Danach wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) betäubt, und es wurde ein Katheter in die Zisterna magna eingeführt, um Liquorproben für die Bestimmung der weißen Blutkörperchen (Engl.: White blood cell, WBC) und ggf. zusätzlich PAI-2 zu gewinnen. Es wurden überdies Blutproben entnommen, um den Bakterientiter zu bestimmen. Anschließend wurden die Tiere transkardial mit eiskalter heparinierter PBS perfundiert. Das Kleinhirn wurde zerkleinert und zur Bestimmung des Bakterientiters in 1 ml sterilem PBS homogenisiert. Die Kleinhirnhomogenate wurden seriell verdünnt, auf Blutagarplatten aufgetragen und 24 Stunden lang kultiviert, bevor die KBE (Kolonien-bildende Einheiten) gezählt wurden.

Zusätzlich wurden im Rahmen des Perizyten-Projekts IL-6 sowie die Hirnalbuminkonzentration und bei den Untersuchungen zur Rolle von PAI-2 die Konzentrationen von C5a, IL-10 und IL-1 β in homogenisierten Gehirnen mittels ELISA (Kit von R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Um die Anzahl und Fläche intrazerebraler Blutungen zu erfassen, wurden tiefgefrorene Mäusehirne in der Frontalebene in 10 μ m dicke Scheiben geschnitten. Beginnend am rostralen Ende der Seitenventrikel wurden in Abständen von 0,3 mm (durch das gesamte Ventrikelsystem) insgesamt zehn Schnitte mit einer Digitalkamera aufgenommen und anschließend die Blutungsanzahl und - in ausgewählten Experimenten - die Blutungsfläche mit Hilfe der Software ImageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>) ermittelt.

3.3.2 Versuchstiere

3.3.2.1 Genetische Depletion von Perizyten in Mäusen

Zur Erzeugung von konditionalen Knockout-Mäusen wurde ein mit Östrogenrezeptorengekoppeltes Cre/loxP-System verwendet, das eine zellspezifische und zeitlich definierte (temporäre) Depletion spezifischer Zellen ermöglichte (Feil et al., 2009). Die Zellspezifität wird dadurch erreicht, dass die CreER-Rekombinase gemeinsam mit einem zellspezifischen Promotor für Perizyten und zwar PDGFR β in das Genom der Mäuse eingebracht wird („Cre Mäuse“, welche die Cre ERT2 Rekombinase unter Kontrolle von PDGFR β exprimieren; JAX Stock # 030201) (Gerl et al., 2015). Indem man die CreER Rekombinase mit einer modifizierten Ligandenbindungsdomäne von Östrogenrezeptoren, welche Tamoxifen, jedoch, kein endogenes Östrogen identifizieren, koppelt, ist eine zeitliche Induzierbarkeit möglich. Diese PDGFR β -cre/ERT2 Mäuse („Cre Mäuse“) wurden mit ROSA26-dTomato-DTA Mäusen gekreuzt. In das Genom von ROSA26-dTomato-DTA Mäusen wurde „gefloxtes“ und damit inaktives Diphtherie Toxin Subunit A (DTA) eingebracht (Genabschnitt, JAX Stock #010527) (Ivanova et al., 2005). Die gekreuzten Mäuse (PDGFR β -iDTA) wurden 3 Tage lang alle 24 Stunden mit 75 mg Tamoxifen (#T5648, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) pro Kg Körpergewicht behandelt. Tamoxifen induziert die CreER-Rekombinase in den entsprechenden Zellen (PDGFR β -positiven Zellen), diese erkennt das „gefloxte“ Gensegment und exzidiert es. Das daraufhin nun freigewordene Diphtherie-Toxin tötet dann die PDGFR β -positiven Zellen spezifisch ab (Kalin et al., 2021). Als WT wurden männliche C57BL6 Mäuse verwendet und Maisöl als Kontrollsubstanz.

3.3.2.2 PAI-2-defiziente Mäuse

Für die Untersuchungen der Rolle von PAI-2 bei der Pneumokokken-Meningitis nutzten wir männliche C57BL6 WT Mäuse und *Serpinb2*-Knockout-Mäuse. Die *Serpinb2*-defizienten Mäuse wurden über mehr als 10 Generationen auf den C57BL6-Hintergrund rückgekreuzt und uns freundlicherweise von Prof. Carsten Kirschning (Institut für medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

3.3.3 Experimentelle Gruppen

3.3.3.1 Experimentelle Gruppen im Rahmen der Untersuchungen zur Rolle der Perizyten

Die folgenden experimentellen Gruppen wurden untersucht:

- 1) C57BL6 WT Mäuse, die mit 15 µl PBS intrazisternal injiziert wurden (Kontrollen; $n = 4$);
- 2) C57BL6 WT Mäuse, die mit 15 µl *S. pneumoniae* intrazisternal injiziert und mit Maisöl (Trägerlösung von Tamoxifen) behandelt wurden ($n = 11$);
- 3) C57BL6 WT Mäuse, die mit 15 µl *S. pneumoniae* intrazisternal injiziert und mit Tamoxifen behandelt wurden ($n = 11$);
- 4) PDGFR β -iDTA Mäuse, die mit 15 µl *S. pneumoniae* intrazisternal injiziert und mit Maisöl behandelt wurden ($n = 11$);
- 5) PDGFR β -iDTA Mäuse, die mit 15 µl *S. pneumoniae* intrazisternal injiziert und mit Tamoxifen behandelt wurden ($n = 12$).

Für weitere Untersuchungen wurden zusätzliche Versuchsgruppen gebildet. Für die immunhistochemischen und transkriptomischen Analysen wurden Hirne von Mäusen am Ende der 42 Stunden verwendet. Die Transkriptomanalysen wurden mit Hilfe eines sogenannten „custom-made“ PrimePCR™ SYBR® Green-Array durchgeführt, der die Analyse der Expression von 25 verschiedenen Zytokinen und –rezeptoren ermöglichte (siehe auch Punkt 4.3.5.). Als Probenmaterial wurde gepoolte RNA von jeweils 4 Mäusen verwendet (in zwei Analyseansätzen). Die Messung der Evans-Blue Konzentration wurde nach 24 Stunden Versuchszeit mit nicht infizierten Kontrollen, infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die mit Maisöl behandelt wurden, und infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die mit Tamoxifen behandelt wurden durchgeführt (jeweils $n = 4$).

3.3.3.2 Experimentelle Gruppen im Rahmen der Untersuchungen zur Rolle von PAI-2

Die folgenden experimentellen Gruppen wurden untersucht:

- 1) C57BL6 WT Mäuse, die mit 15 μ l PBS intrazisternal injiziert wurden (Kontrollen; $n = 4$ (24 Stunden nach Infektion untersucht); $n = 6$ (48 Stunden nach Infektion untersucht));
- 2) C57BL6 WT Mäuse, die mit 15 μ l 10^7 KBE/ml *S. pneumoniae* intrazisternal injiziert wurden ($n = 9$ (24 Stunden nach Infektion untersucht); $n = 8$ (48 Stunden nach Infektion untersucht));
- 3) *Serpinb2*-defiziente Mäuse, die mit 15 μ l 10^7 KBE/ml *S. pneumoniae* intrazisternal injiziert wurden ($n = 9$ (24 Stunden nach Infektion untersucht); $n = 12$ (48 Stunden nach Infektion untersucht)).

Zur Analyse der PAI-2 Proteinkonzentrationen im Liquor und Plasma von Mäusen im Verlauf der Krankheit wurden zusätzliche Versuchsgruppen durchgeführt, nämlich nicht infizierte Kontrollen ($n = 5$) und infizierte WT Mäuse, bei denen 24 oder 48 Stunden nach Infektion die Probenentnahme erfolgte ($n = 12$ in jeder Gruppe).

3.3.4 Immunhistochemische Untersuchungen von Maushirnschnitten

3.3.4.1 Immunhistochemische Analysen im Perizyten-Projekt

Zehn μ m dicke koronare Hirnschnitte, die die Seitenventrikel und das Hippocampusgewebe enthielten, wurden entweder mit einem monoklonalen Ratten-Anti-Maus-Antikörper gegen PDGFR β (AF1042, R&D Systems, 1:80), CD13 (MCA2183GA, Bio-Rad, 1:100) oder den Fibroblastenmarker ER-TR7 (sc-73355, Santa Cruz, 1:80) sowie den entsprechenden sekundären Antikörpern und Chromogenen gefärbt (alle von Vector Laboratories, Burlingame, USA). Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Gewebeschnitte mit einem Olympus BX-51 Lichtmikroskop betrachtet und Bilder mit einer gekühlten Moticam 5000 Videokamera aufgenommen, die an einen PC mit der Bildverarbeitungssoftware Image Plus 3.0 angeschlossen war.

3.3.4.2 Immunhistochemische Analysen im PAI-2 Projekt

Die Gehirne von nicht infizierten und infizierten WT und *Serpinb2*-defizienten Mäusen wurden in 10% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und 7 μ m große Gewebeschnitte angefertigt. Die Hirnschnitte wurden mit primären Antikörpern gegen PAI-2 (Verdünnung 1:100, #ab137588, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und MRP-14 (Verdünnung 1:2000, Invitrogen Antibodies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) einem Marker für

neutrophile Granulozyten, sowie den entsprechenden sekundären Antikörpern und Chromogenen gefärbt. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Gewebeschnitte mit einem Olympus BX-51 Lichtmikroskop untersucht und Bilder mit einer gekühlten Moticam 5000 Videokamera aufgenommen, die an einen PC mit der Bildverarbeitungssoftware Image Plus 3.0 angeschlossen war.

3.3.5 mRNA Expressionsprofil von PDGFR β -iDTA Mäusen

Um ein zerebrales Genexpressionsprofil von PDGFR β -iDTA Mäusen zu erstellen, isolierten wir RNA aus homogenisierten Maushirnen von nicht infizierten Kontrollen, infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die mit Maisöl behandelt wurden, und infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die mit Tamoxifen behandelt wurden (jeweils $n = 4$) (AurumTM Total RNA Mini Kit, #732-6820, BioRad, Hercules, Kalifornien) und führten einen PrimePCRTM Array (iScriptTM gDNA Clear cDNA Synthesis Kit, #172-5034, BioRad, Hercules, Kalifornien) gemäß den Anweisungen des Herstellers durch (Zur detaillierten Beschreibung siehe 3.1.5). Die quantitative PCR (qPCR) wurde auf einem qTower3 Real-Time PCR Detection System (Analytikjena) unter Verwendung des SsoAdvanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad, 1725280) und PrimePCRTM SYBR® Green Assays sowie eines speziell angefertigten PrimePCRTM SYBR® Green Arrays durchgeführt, der 25 Entzündungsfaktoren (Zytokine und Chemokine) und Zelloberflächenmarker sowie 2 verschiedene Hauskeeping-Gene enthält. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet (**Tabelle 1**). Der maßgeschneiderte Array wurde in zweifacher Ausführung mit gepoolter cDNA von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Material und Methoden

Gencode	Protein
<i>Aim2</i>	AIM2, absent in melanom 2
<i>Anpep</i>	aminopeptidase N, CD13, etc.
<i>Arg1</i>	arginase 1
<i>Casp1</i>	CASP1, caspase 1
<i>Ccl2</i>	CCL2, C-C motif chemokine 2
<i>Cd163</i>	CD163, scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130
<i>Cd36</i>	CD36, platelet glycoprotein 4, etc.
<i>Col1A1</i>	Col1A1, collagen alpha 1 chain
<i>Cxcl1</i>	CXCL1, growth-regulated alpha protein, C-X-C motif chemokine 1
<i>Cxcl2</i>	CXCL2, C-X-C motif chemokine 2, growth-regulated protein beta
<i>Gfap</i>	GFAP, glial fibrillary acidic protein
<i>Il10</i>	IL-10, interleukin-10
<i>Il18</i>	IL-18, interleukin-18
<i>Il1b</i>	IL-1 β , interleukin-1beta
<i>Il6</i>	IL-6, interleukin-6
<i>Itgam</i>	ITGAM, integrin subunit alpha M, CD11B
<i>Mrc1</i>	MRC1, macrophage mannose receptor 1, CD206
<i>Nanos2</i>	NOS2, nitric oxide synthase 2
<i>Nefl</i>	NEFL, neurofilament light polypeptide
<i>Nlrp3</i>	NLRP3, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
<i>Pdgfra</i>	PDGFR α , platelet-derived growth factor receptor alpha
<i>Pdgfrb</i>	PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor alpha
<i>Tlr13</i>	TLR13, Toll-like receptor 13
<i>Tlr2</i>	TLR2, Toll-like receptor 2
<i>Tlr4</i>	TLR4, Toll-like receptor 4
<i>Actb*</i>	ActB, actin, cytoplasmic 1, beta-actin
<i>Gapdh*</i>	GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

* Housekeeping-Gen

Tabelle 1: Liste der Faktoren auf dem angepassten PrimePCR Array

3.3.6 Quantifizierung der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität mittels Evans-Blau

Zur genaueren Beurteilung der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität verwendeten wir zusätzlich zur Messung der Albuminkonzentration im Gehirn eine etablierte Evans-Blau-Extravasations-Methode. Die fluorometrische Bestimmung von Evans-Blau im perfundierten Gewebe ist eine häufig verwendete Methode, um vaskuläre Proteinlecks zu quantifizieren (Manaenko et al., 2011; Uyama et al., 1988). Dafür wurden nicht infizierte Kontrollen, infizierte PDGFR β -iDTA Mäuse, die mit Maisöl behandelt wurden, und infizierte PDGFR β -iDTA Mäuse, die mit Tamoxifen behandelt wurden (jeweils $n = 4$) mit einer 2%-Lösung von Evans Blue (EB) in PBS intraperitoneal injiziert und diese wurde 2 Stunden lang zirkulieren gelassen.

Daraufhin wurden Blutproben durch eine kardiale Punktion gewonnen. In der Folge wurden die Mäuse unter Punkt 3.3.1 beschrieben perfundiert und anschließend die Gehirne entnommen; diese wurden in 1 ml PBS homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden aufgefangen

und seriell in PBS verdünnt. Jeder Probe wurde eine gleiche Menge 50-%iger Trichloressigsäure (TCA) zugesetzt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Die Evans-Blau Konzentration im resultierenden Überstand wurde spektrophotometrisch (Ultrospec III, Pharmacia, Deutschland) durch Absorptionsmessung bei 620 nm bestimmt und anhand einer Standardkurve quantifiziert (Koedel et al., 2004).

3.3.7 Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 211-2531-67/99, -47/08, und AZ 55.2-1-54-2532.Vet_02-18-169).

3.4 Statistische Methoden

Statistische Tests und Graphen wurden mittels GraphPad Prism Software erstellt. Für stetige Variablen wurde der Mann-Whitney U Test verwendet, für gruppierte Daten ein one-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons Test und für Überlebenskurven ein log-rank test (Mantel). Unterschiede wurden ab einem p Wert < 0.05 als signifikant gewertet. Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Für die Bestimmung der Gruppengrößen im Rahmen der Tierexperimente wurde eine Fallzahlanalyse unter Anleitung eines/einer StatistikerInn durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Rolle der Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis

4.1.1 Murine und humane Perizyten setzen nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* ausgewählte Zytokine frei

Um die Reaktion primärer muriner und humaner Hirn-Perizyten auf eine Exposition gegenüber *S. pneumoniae* zu untersuchen, führten wir zunächst Proteinarray-Analysen durch. Murine Perizyten zeigten eine vermehrte Expression von 4 der 40 untersuchten Zytokine, nämlich von M-CSF, IL-6, CXCL13 und G-CSF, (**Abbildung 9A**). Humane Perizyten setzten hingegen vermehrt 3 Zytokine frei, nämlich M-CSF, IL-6 und Gro- $\alpha/\beta/\gamma$. Es kam zu keinem Anstieg der G-CSF-Freisetzung (**Abbildung 9B**). Da wir sowohl bei menschlichen als auch bei murinen Zellen einen ausgeprägten Anstieg der IL-6 Konzentration beobachteten, entschieden wir uns IL-6 als Surrogat Marker für weitere Analysen zu verwenden.

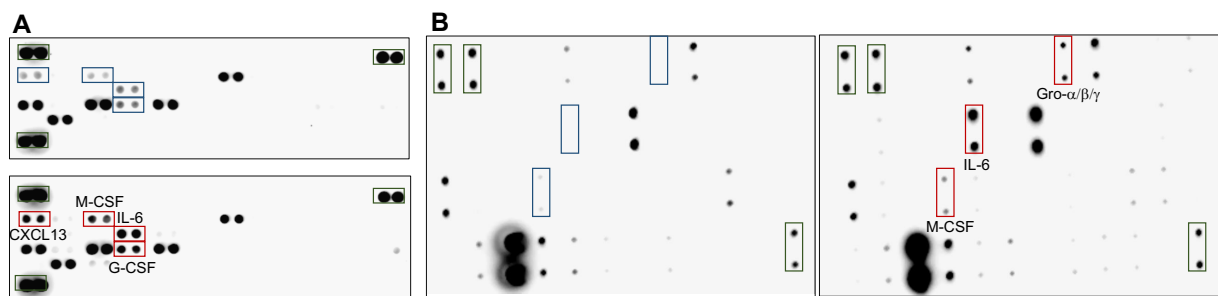


Abbildung 9: Proteinarray-Analysen von Zellkulturüberständen von murinen (**A**) und humanen (**B**) Perizyten, die 6 Stunden mit *S. pneumoniae* D39 (Serotyp 2) stimuliert wurden. Todd Hewitt Bouillon mit Hefe (Engl.: Todd Hewitt Broth with yeast, THY), das Kulturmedium von *S. pneumoniae*, wurde als Kontrolle benutzt.

Sowohl murine (**Abbildung 10B**) als auch humane (**Abbildung 10D**) Perizyten zeigten bei einer Stimulation mit *S. pneumoniae* eine erhöhte Freisetzung von IL-6 im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Bei Exposition mit höheren Konzentrationen (speziell bei $1,6 \times 10^8$ cfu/ml), schütteten die Zellen auch eine signifikante Menge an LDH aus, was auf eine durch Pneumokokken ausgelöste Zytotoxizität hinweist, die mit einem Verlust der IL-6 Produktion einherging (**Abbildung 10A, C**)

Ergebnisse

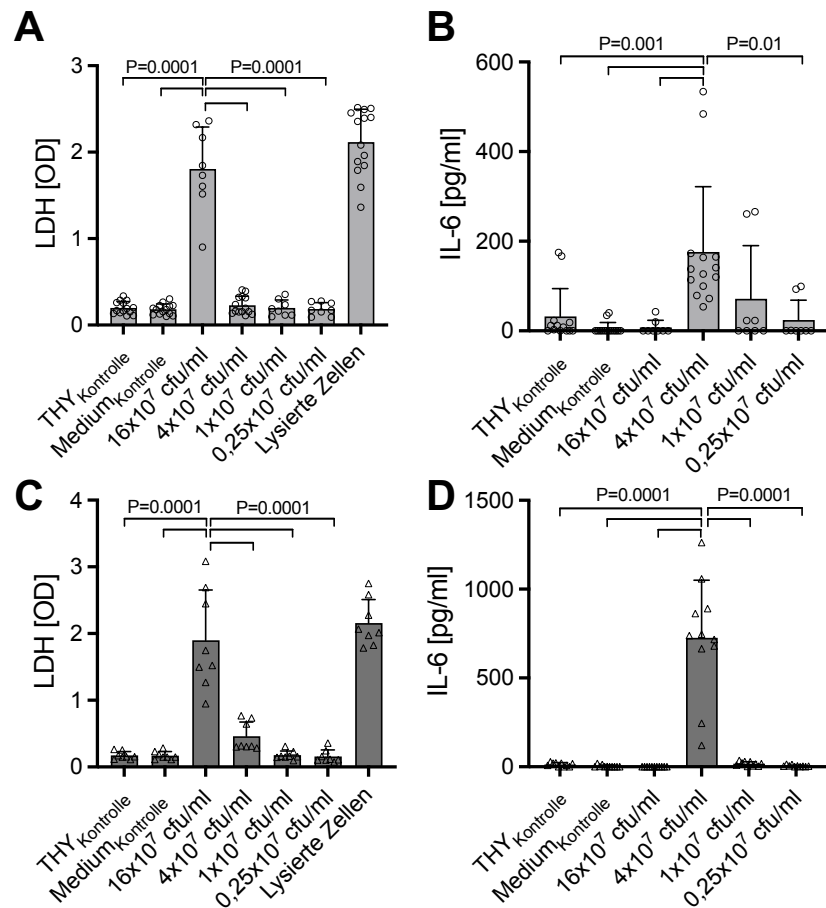


Abbildung 10: LDH- und IL-6 Freisetzung von murinen (A, B) und humanen (C, D) Perizyten bei Exposition mit steigenden Konzentrationen von *S. pneumoniae* D39 (Serotyp 2). Murine und humane Perizyten reagierten auf die Stimulation mit Pneumokokken mit gesteigerter IL-6 Freisetzung im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (B, D). Bei Exposition mit höheren Pneumokokken Konzentrationen setzten die Zellen signifikante Mengen an LDH in den Zellkulturüberstand frei (A, C). Todd Hewitt Bouillon mit Hefe (Engl.: Todd Hewitt Broth with yeast, THY), das Kulturmedium von *S. pneumoniae*, wurde als Kontrolle benutzt.

Wir konnten zeigen, dass sowohl bei murinen (Abbildung 11B) als auch bei humanen (Abbildung 11D) Perizyten die Behandlung mit einem NF- κ B Inhibitor zu einer deutlichen Verringerung der durch Pneumokokken-induzierten IL-6 Produktion führte. Murine, aber nicht humane Perizyten zeigten eine signifikant verringerte IL-6 Ausschüttung bei der kombinierten Behandlung mit Anti-TLR2-Antikörper, Anti-TLR4-Antagonist und Chloroquin sowie bei der Kombination von Anti-TLR2 und Chloroquin. Sie scheinen das Vorhandensein von Pneumokokken anhand von TLR-2 und endosomalen TLR zu erkennen. Da die Zellen nicht mit den höchsten Konzentrationen ($1,6 \times 10^8$ cfu/ml) an Pneumokokken exponiert wurden, kam es zu keiner signifikanten Freisetzung von LDH und auch die Behandlung mit den entsprechenden Substraten löste keinen signifikanten Zelltod aus (Abbildung 11A, C).

Ergebnisse

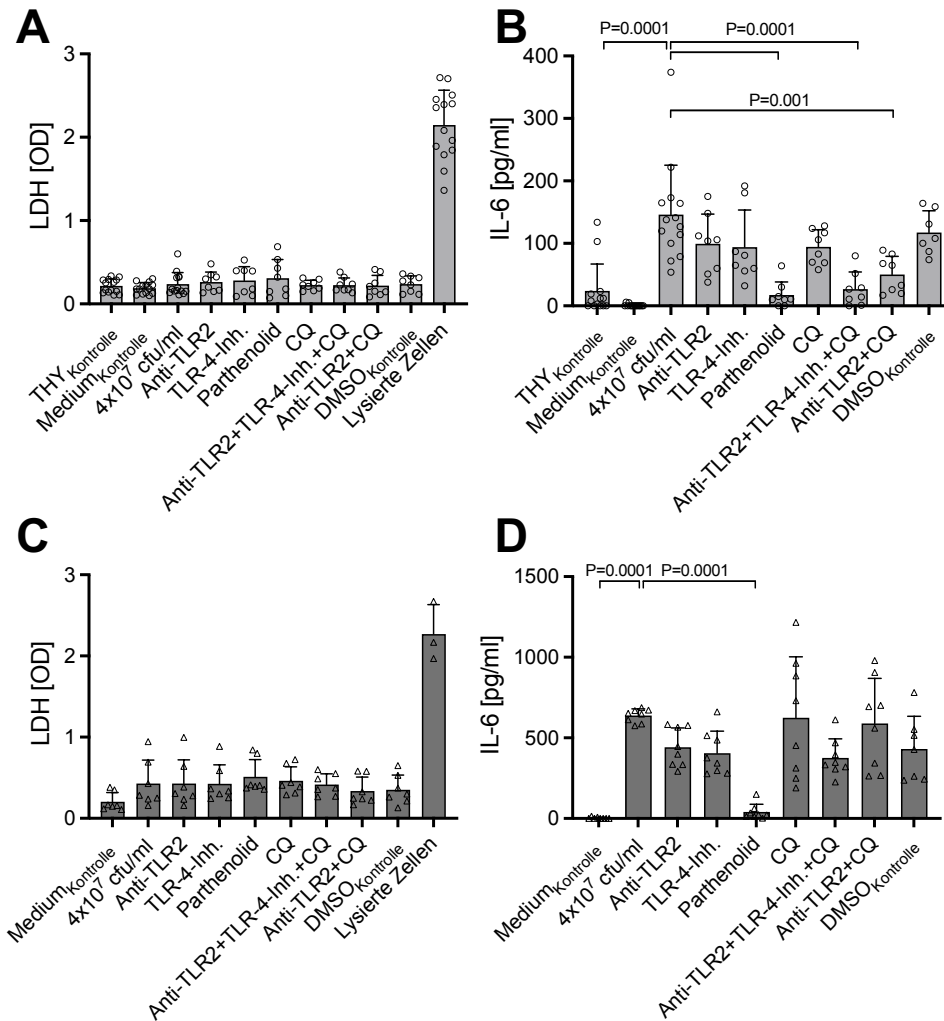


Abbildung 11: Auswirkung von Inhibitoren auf die Pneumokokken-induzierte LDH-Freisetzung und IL-6-Produktion von murinen (A, B) und humanen (C, D) Perizyten. Die Behandlung mit dem NF- κ B Inhibitor führte sowohl bei murinen als auch bei humanen Perizyten zu einer deutlichen Reduktion der IL-6 Produktion (B, D). Murine, aber nicht humane Perizyten, zeigten eine verringerte IL-6 Freisetzung bei kombinierter Behandlung mit Anti-TLR2-Antikörper (Anti-TLR2), TLR4-Inhibitor (Inh.) und Chloroquin (CQ) (B).

Sowohl murine als auch humane Perizyten reagierten auf die drei verschiedenen Pneumokokken Serotypen (ST2, ST6B und ST7F) mit einer erhöhten IL-6 Freisetzung. Die Reaktion variierte erheblich zwischen den verschiedenen Pneumokokken-Serotypen. Im Gegensatz zum Wildtyp *S. pneumoniae* Serotyp 2 übte die PLY-defiziente Mutante keine zytotoxische Wirkung aus und löste wenig bis keine IL-6-Freisetzung aus (Abbildung 12).

Ergebnisse

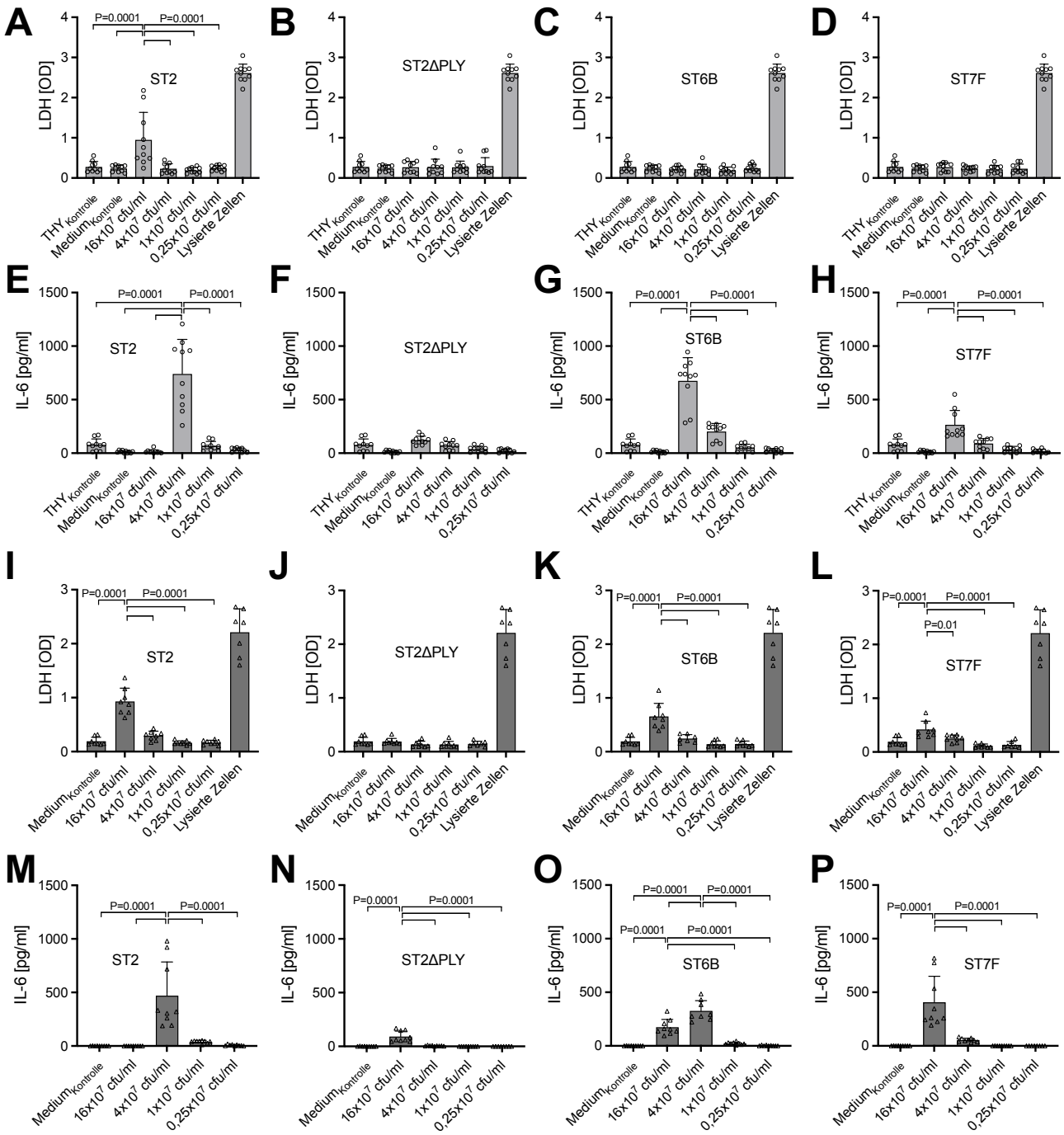


Abbildung 12: LDH-Freisetzung und IL-6 Produktion von murinen (A-H) und humanen (I-P) Perizyten bei einer Exposition mit verschiedenen *S. pneumoniae*- Serotypen und einer Pneumolysin (PLY)-defizienten, isogenen Mutante des Serotyps 2. Sowohl murine als auch humane Perizyten reagierten auf verschiedenen Serotypen mit einer IL-6 Freisetzung (F-H, M-P). Die PLY-defiziente Mutante wirkte nicht zytotoxisch und induzierte – wenn überhaupt – nur eine minimale IL-6 Produktion (B, F, J, N).

4.1.2 Perizytendepletion führte zu einer verkürzten Überlebenszeit im Zebrafisch

Modell

Um zu überprüfen, ob der PDGFR β Inhibitor AG1296 die Perizyten- Population von WT und TG Zebrafisch Embryos wie von Ando et al. beschrieben (Ando et al., 2016) dezimieren kann, untersuchten wir nicht infizierte, jeweils mit Placebo und Inhibitor behandelte TG Zebrafisch Embryos unter dem Fluoreszenzmikroskop. Achtundvierzig Stunden nach Behandlungsbeginn mit der entsprechenden Substanz fanden sich bei Zebrafisch Embryos, die mit dem Placebo behandelt wurden, eine Vielzahl GFP-positiver Zellen (PDGFR β -positive Zellen, Perizyten) entlang der zerebralen Blutgefäße. Im Gegensatz dazu waren nach der Behandlung mit dem Inhibitor keine oder nur noch vereinzelte GFP-positive Zellen zu beobachten (**Abbildung 13**).

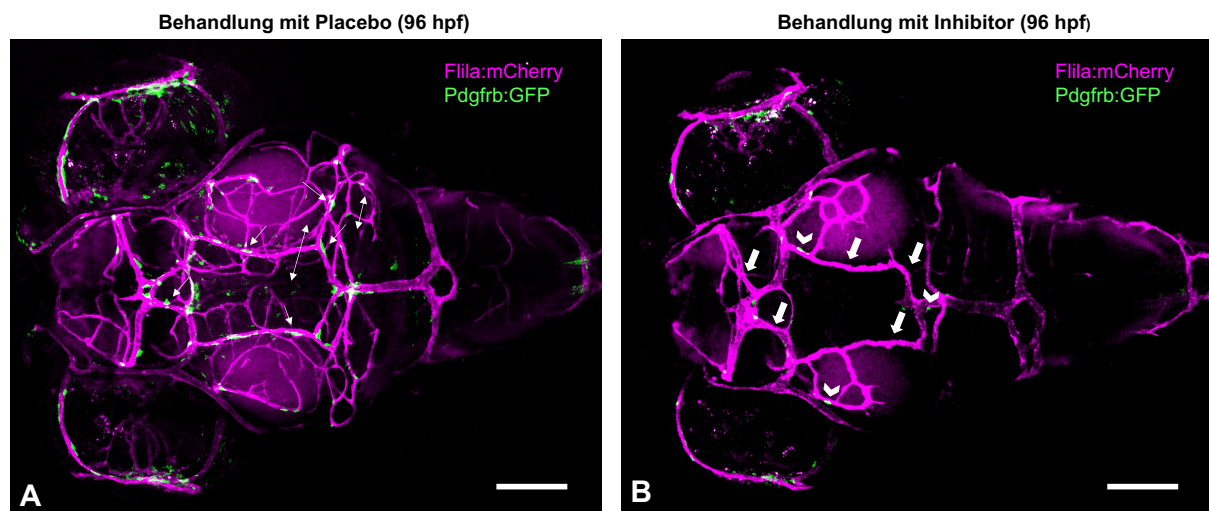


Abbildung 13: Konfokale Mikroskopie-Bilder von zwei repräsentativen *TgBAC(pdgfrb:EGFP/Tg(flila:Myr-mCherry)* Zebrafisch Embryos, die entweder mit DMSO als Placebo (**A**) oder dem PDGFR β Inhibitor AG1296 (**B**) behandelt wurden. Bei Placebo-behandelten Zebrafisch Embryos waren zahlreiche GFP-positive Zellen (PDGFR β -positive Zellen, Perizyten) an den Blutgefäßen zu erkennen, während Inhibitor-behandelte Embryos nur noch vereinzelt (Weiße Pfeilspitzen) oder keine (weiße Blockpfeile) GFP-positiven Zellen mehr aufwiesen. Der Maßstabsbalken zeigt 100 μ m Länge an.

Um zu untersuchen, ob die Depletion von Perizyten einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Meningitis hat, haben wir die Perizytenpopulation im Gehirn von WT und TG Zebrafisch Embryos durch eine Behandlung mit dem PDGFR β -Inhibitor AG1296 (wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben) depletiert bzw. deutlich reduziert. Pneumokokken-infizierte WT und TG Zebrafisch Embryos mit reduzierten Perizyten haben eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu Zebrafischen ohne Depletion. Die Überlebensrate bei den Experimenten mit WT Zebrafisch Embryos lag 48 Stunden nach der Injektion bei 98 % (59 von 60 Embryos) bei nicht-infizierten, Placebo-behandelten Kontrollen, bei 96 % (58 von 60) bei nicht-infizierten,

Ergebnisse

AG1296-behandelten Kontrollen, bei 83 % (50 von 60) bei Zebrafisch Embryos, die mit *S. pneumoniae* infiziert und mit Placebo behandelt wurden, und bei lediglich 1 % (1 von 60) der infizierten Zebrafisch Embryos, die mit dem Inhibitor AG1296 behandelt wurden. Zweiundsiebzig Stunden nach der Injektion betrug das Überleben der Kontrollen 98 % in der Placebo-Gruppe und 96 % in der Inhibitor-Gruppe, wohingegen nur noch 10 % der infizierten, Placebo-behandelten Zebrafisch Embryos lebten und alle infizierten, AG1296-behandelten Embryos verstorben waren. Die mediane Überlebenszeit der Embryos, die mit *S. pneumoniae* infiziert und mit Placebo behandelt wurden, betrug 72 Stunden, während die mediane Überlebenszeit der Embryos, die mit *S. pneumoniae* infiziert und mit AG1296 behandelt wurden, bei 48 Stunden lag (**Abbildung 14A**).

Die Überlebensrate bei den TG Zebrafisch-Embryo- Experimente betrug 48 Stunden post injectionem 100 % (60 von 60 Embryos) bei nicht-infizierten, Placebo-behandelten Kontrollen, bei 98% (59 von 60) bei nicht-infizierten, AG1296-behandelten Kontrollen, bei 68% (41 von 60) bei Zebrafisch Embryos, die mit *S. pneumoniae* infiziert und mit dem Placebo behandelt wurden und bei 33% (20 von 60) der infizierten Zebrafisch Embryos, die mit dem Inhibitor AG1296 behandelt wurden. Zweiundsiebzig Stunden nach der Injektion betrug das Überleben bei den Kontrollen weiterhin 100 % in der Placebo Gruppe und 95 % in der Inhibitor Gruppe, wohingegen nur noch 15% der infizierten, Placebo-behandelten Zebrafisch Embryos lebten und alle infizierten, AG1296-behandelten Embryos verstorben waren. Die mediane Überlebenszeit der Embryos, welche mit *S. pneumoniae* infiziert, und mit dem Placebo behandelt wurden beträgt 72 Stunden, wohingegen die mediane Überlebenszeit der Embryos, welche mit *S. pneumoniae* infiziert, und mit dem Inhibitor behandelt wurden bei 48 Stunden lag (**Abbildung 14B**).

Ergebnisse

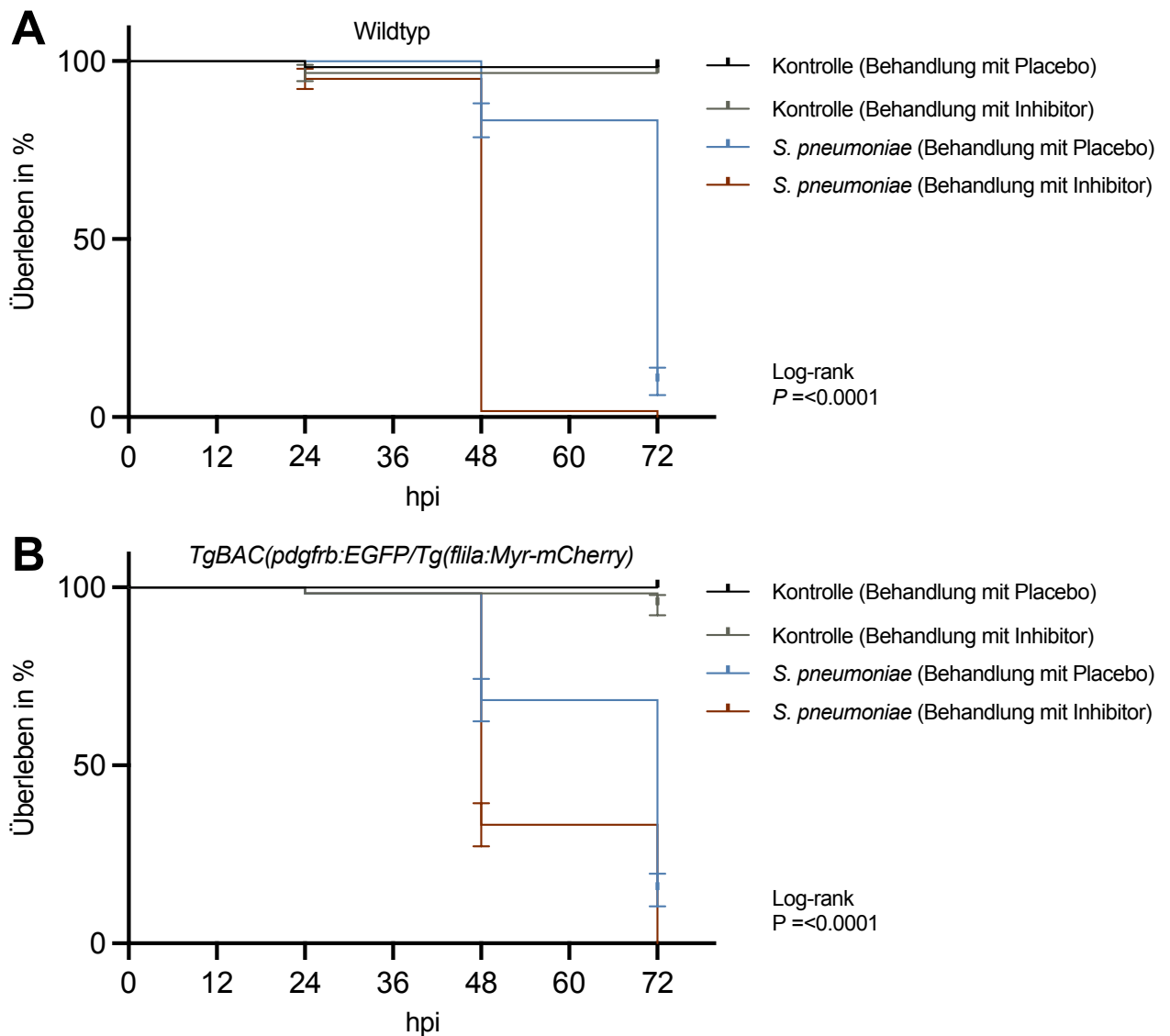


Abbildung 14: Überlebenskurve von WT Zebrafisch Embryos, die mit 1900 cfu *S. pneumoniae* D39 oder Phenolrot-Lösung (Kontrolle) injiziert wurden (A). Überlebenskurve von *TgBAC(pdgfrb:EGFP/Tg(fila:Myr-mCherry)* Zebrafisch Embryos, die mit 2200 cfu von *S. pneumoniae* D39 oder Phenolrot Lösung (Kontrolle) injiziert wurden (B). Die Zebrafische wurden entweder mit DMSO als Placebo (Trägerlösung von AG1296) oder mit dem PDGFR β Inhibitor AG1296 behandelt. Die Daten präsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei individuellen Experimenten mit jeweils 20 Embryos pro Gruppe.

4.1.3 Nach einer Perizytendepletion entwickelten Zebrafisch Embryos verstärkt Hirnödeme während der Pneumokokken-Meningitis

Bei der histopathologische Analyse zeigte sich, dass *S. pneumoniae*-infizierte WT Zebrafisch Embryos, die mit dem PDGFR β Inhibitor behandelt wurden, Hirnödeme entwickeln, während das Hirnparenchym von *S. pneumoniae*-infizierten, Placebo-behandelten WT Zebrafisch Embryos kompakt blieb (**Abbildung 15C, G**). Zusätzlich fiel auf, dass infizierte, Inhibitor-behandelte Zebrafische deutlich erweiterte perivaskulären Räume aufweisen als infizierte, Placebo-behandelten Zebrafisch Embryos (**Abbildung 15D, H**). Bei nicht infizierten Zebrafisch Embryos wurden keine auffallenden Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt (**Abbildung 15B, F**).

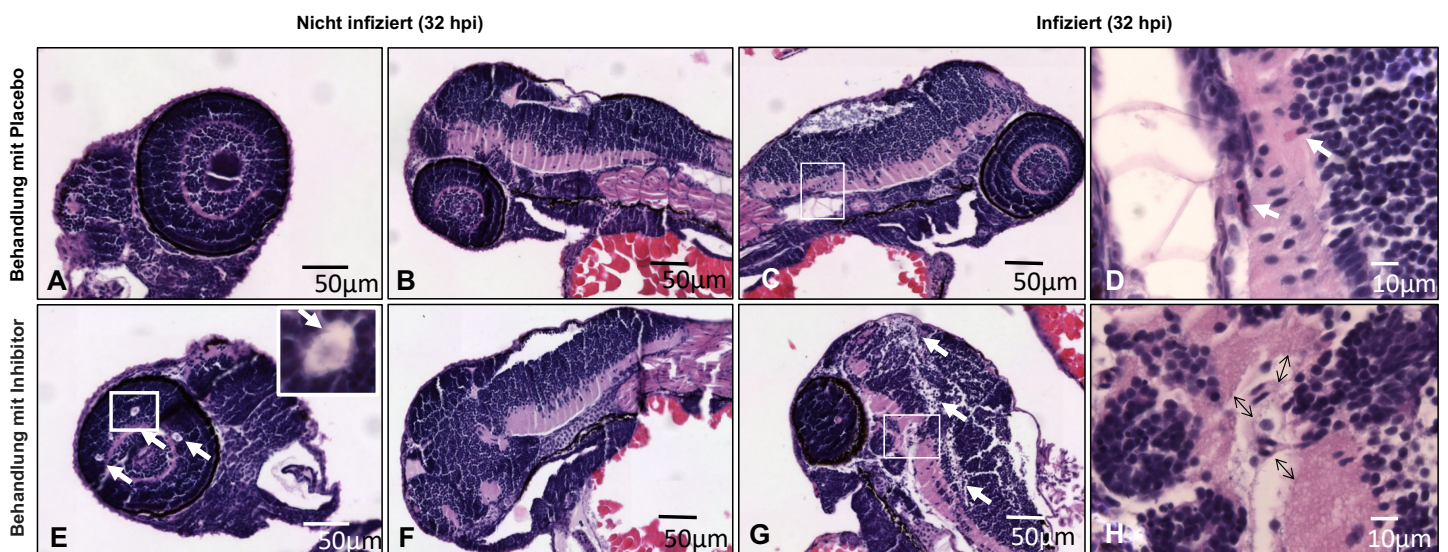


Abbildung 15: Histopathologische Analyse nicht infizierter und *S. pneumoniae*-infizierter WT Zebrafisch-Embryos, die entweder mit DMSO als Placebo (**A-D**) oder mit dem PDGFR β Inhibitor AG1296 (**E-H**) behandelt wurden, jeweils zum Zeitpunkt 32 hpi. Zebrafisch Embryos, die mit dem Inhibitor behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Placebo-behandelten Embryos multiple zystische Abnormalitäten in den Augen (**E**, Pfeile). Die Gehirne beider Gruppen zeigten im nicht infizierten Zustand keine Unterschiede (**B, F**). Nach Infektion mit *S. pneumoniae* fanden sich in beiden Gruppen als Zeichen der Meningitis polymorphkernige Leukozyten im Ventrikel sowie eine Infiltration des Parenchyms durch die Bakterien. Das Hirnparenchym von AG1296-behandelten Zebrafisch Embryos zeigte ein Hirnödem, im Sinne eines aufgelockerten Parenchyms (**G**, Pfeile), während das Hirnparenchym von Zebrafisch Embryos mit Placebo-Behandlung kompakt blieb (**C**). Der perivaskuläre Raum im Hirnparenchym war bei Zebrafisch Embryos, die mit dem Inhibitor behandelt wurden (**G**, weißer Kasten) im Vergleich zu Zebrafischen mit Placebo-Behandlung deutlich vergrößert (**C**, weißer Kasten). In **H** sieht man den perivaskulären Raum vergrößert und die Ausdehnung durch Doppelpfeile hervorgehoben. Die Gefäße von Zebrafisch Embryos mit Placebo-Behandlung blieben unverändert (Vergrößert in **D**).

4.1.4 Verteilung der Perizyten auf Hirngefäßen im Verlauf der Pneumokokken-Meningitis

Um einen Einblick in mögliche Veränderungen in der zerebralen Perizytenpopulation im Verlauf der Pneumokokken-Meningitis zu erhalten, führten wir zunächst fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an infizierten und nicht-infizierten TG Zebrafisch Embryos durch und im weiteren Verlauf zudem immunhistochemische Analysen an Maushirnen.

Im Zebrafischmodell wurden infizierte und nicht-infizierte transgene Embryos verwendet, bei denen sich Gefäße konstitutiv (bei entsprechender Anregung) lila, PDGFR β -positive Zellen dagegen grün fluoreszierend darstellten.

Zum Untersuchungszeitpunkt (48 hpi) beobachteten wir in infizierten Zebrafisch-Embryos eine Destruktion und generelle Reduktion zerebraler Blutgefäßen im Vergleich zu nicht-infizierten Zebrafischen (**Abbildung 16D, E, F**). In einigen infizierten Zebrafisch Embryos kam es zu einer Abnahme der GFP-positiven Zellen (PDGFR β -positive Zellen, Perizyten) (**Abbildung 16E, F**). Darüberhinaus stellten wir fest, dass in infizierten Zebrafisch Embryos verbliebene GFP-positiven Zellen häufig keinen direkten Kontakt zu den Blutgefäßen mehr aufwiesen und einen kugelförmigen Phänotyp bekamen (**Abbildung 16D, E, F**). In anderen ZebrafischEmbryos wurden Gruppen GFP-positiver Zellen im Hirnparenchym (ohne Gefäßkontakt) beobachtet (**Abbildung 16E**). In unserem Maus-Modell färbten wir Hirnschitte vor der Infektion, sowie 18 und 42 Stunden nach der Infektion mit *S. pneumoniae* mit den bekannten Perizytenmarkern PDGFR β und CD13 an (**Abbildung 16G, H**). Ähnlich wie beim Zebrafisch-Embryo-Modell beobachteten wir bei der Maus ein heterogenes Färbemuster für beide Markerproteine. Es zeigten sich Bereiche mit normaler Färbung für PDGFR β oder CD13 neben Bereichen mit stark reduzierter Färbung. Aufgrund der Heterogenität der Befunde wurde auf eine quantitative Analyse verzichtet.

Ergebnisse

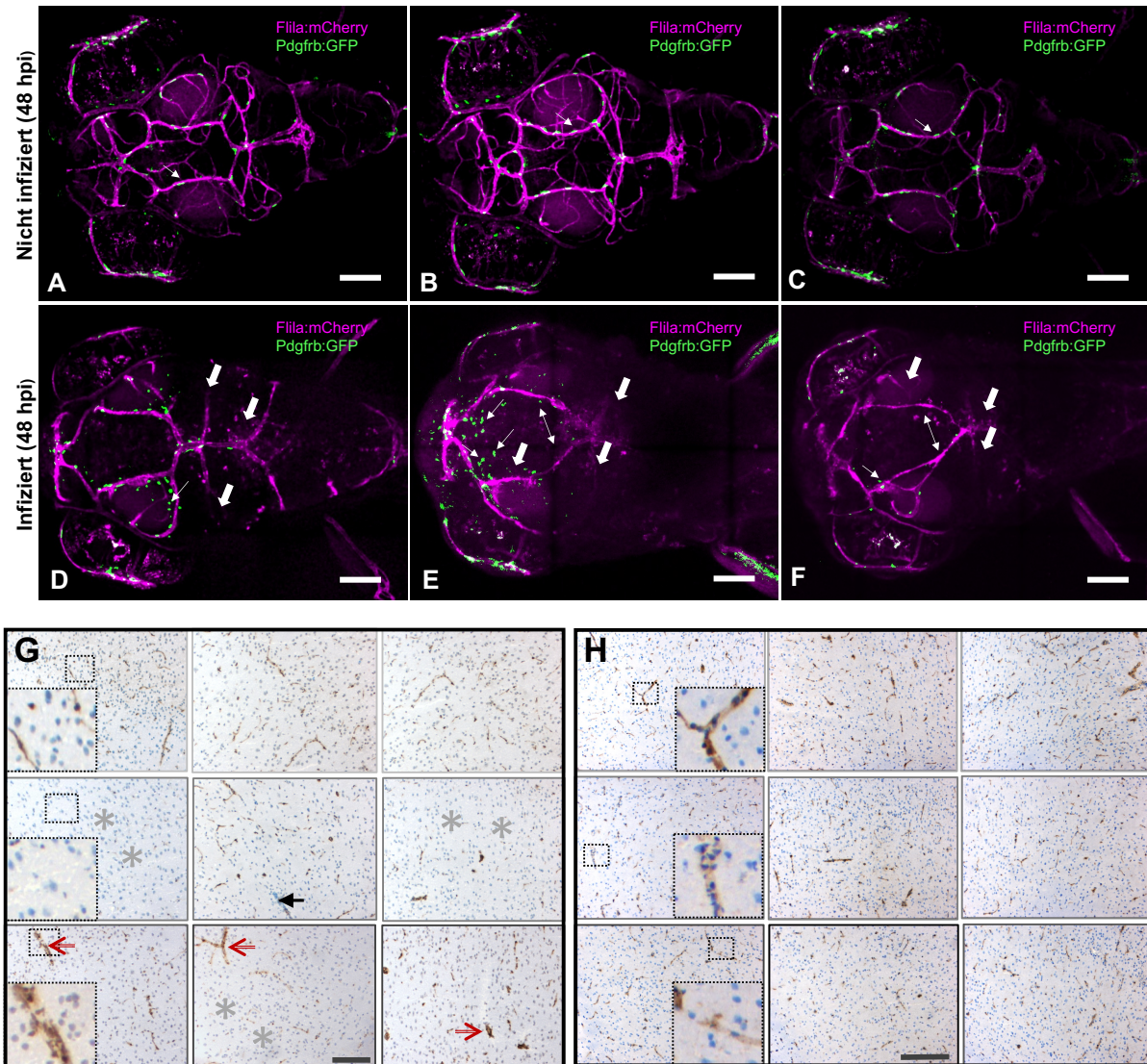


Abbildung 16: Vergleich zwischen nicht-infizierten und *S. pneumoniae*-infizierten *TgBAC(pdgfrb:EGFP/Tg(fli1a:Myr-mCherry)* Zebrafisch Embryos 48 hpi. Konfokale Mikroskopie-Bilder von jeweils drei repräsentativen nicht infizierten (A-C) und *S. pneumoniae*-infizierten TG Zebrafisch Embryos (D-F). Nicht-infizierte Zebrafisch Embryos zeigen ein intaktes Gefäßsystem und GFP-positive Zellen (PDGFRβ-positive Zellen, Perizyten) unmittelbar an den Blutgefäßen (A-C, Dünne weiße Pfeile). Infizierte Zebrafisch Embryos präsentierten eine Destruktion und Reduktion sichtbarer Blutgefäße (D-F, Weiße Blockpfeile) und teilweise eine verringerte Anzahl an GFP-positiven Zellen (F, Doppelpfeile). In infizierten Zebrafisch Embryos schienen GFP-positiven Zellen häufig nicht mehr an den Blutgefäßen lokalisiert zu sein (D-F, Dünne weiße Pfeile). Regionale Veränderungen der Immunreaktivität für PDGFRβ (G) und CD13 (H) in Gehirnen von Mäusen bei der Pneumokokken-Meningitis. Hirnschnitte wurden von gesunden Kontrolltieren (G,H obere Reihe) sowie von infizierten Mäusen 18 und 42 Stunden nach der intrazisternalen Inokulation von *S. pneumoniae* gewonnen (3 Mäuse pro Gruppe; mittlere bzw. untere Reihe). Die Schnitte wurden entweder mit anti-murinen PDGFRβ- oder anti-murinen CD13-Antikörpern gefärbt und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Die PDGFRβ-Immunreaktivität erschien regional gestört (graue Sternchen) und fehlte in einigen Gefäßsegmenten (schwarzer Pfeil), während in anderen Gefäßsegmenten die PDGFRβ-Färbung unverändert

oder sogar verstärkt erschien (rote Pfeile). Ein ähnliches Färbemuster fand sich bei Anfärbung mit dem anti-CD-13 Antikörper. Der Maßstabsbalken zeigt 100 μm Länge an.

4.1.5 Die genetische Ablation von Perizyten im Mausmodell führt zur

Verschlechterung des Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Meningitis

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob unsere Erkenntnisse aus dem Zebrafisch-Embryomodell auf ein Mausmodell übertragen werden können. Bei diesen Untersuchungen setzten wir eine transgene Mäuselinie (kurz PDGFR β -iDTA Mäuse) ein, die eine durch eine Tamoxifen-Gabe auslösbare (temporäre) Depletion PDGFR β -positiver Zellen ermöglichte. Zum Nachweis einer erfolgreichen Depletion von PDGFR β -positiver Zellen, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, in denen eine deutliche Abnahme der PDGFR β -Färbung bei Tamoxifen behandelten Mäusen im Vergleich zu Maisöl behandelten Tieren gezeigt werden konnte (**Abbildung 17A**). Um festzustellen, ob die Ablation von Perizyten auch die Anzahl an Fibroblasten, ein ähnlicher perivaskulärer Zelltyp, der laut Fachliteratur auch PDGFR β exprimieren kann, verringert, führten wir weitere immunhistochemische Untersuchungen durch. Dabei färbten wir PDGFR β -iDTA Mäuse, welche jeweils mit Tamoxifen oder Maisöl behandelt wurden, und Kontrollmäusen mit einem Antikörper gegen ER-TR7, einem etablierten Marker für Fibroblasten. Es kam zu keiner Reduktion oder Unterschied in den Immunreaktivität zwischen den untersuchten Gruppen (**Abbildung 17B**).

Ergebnisse

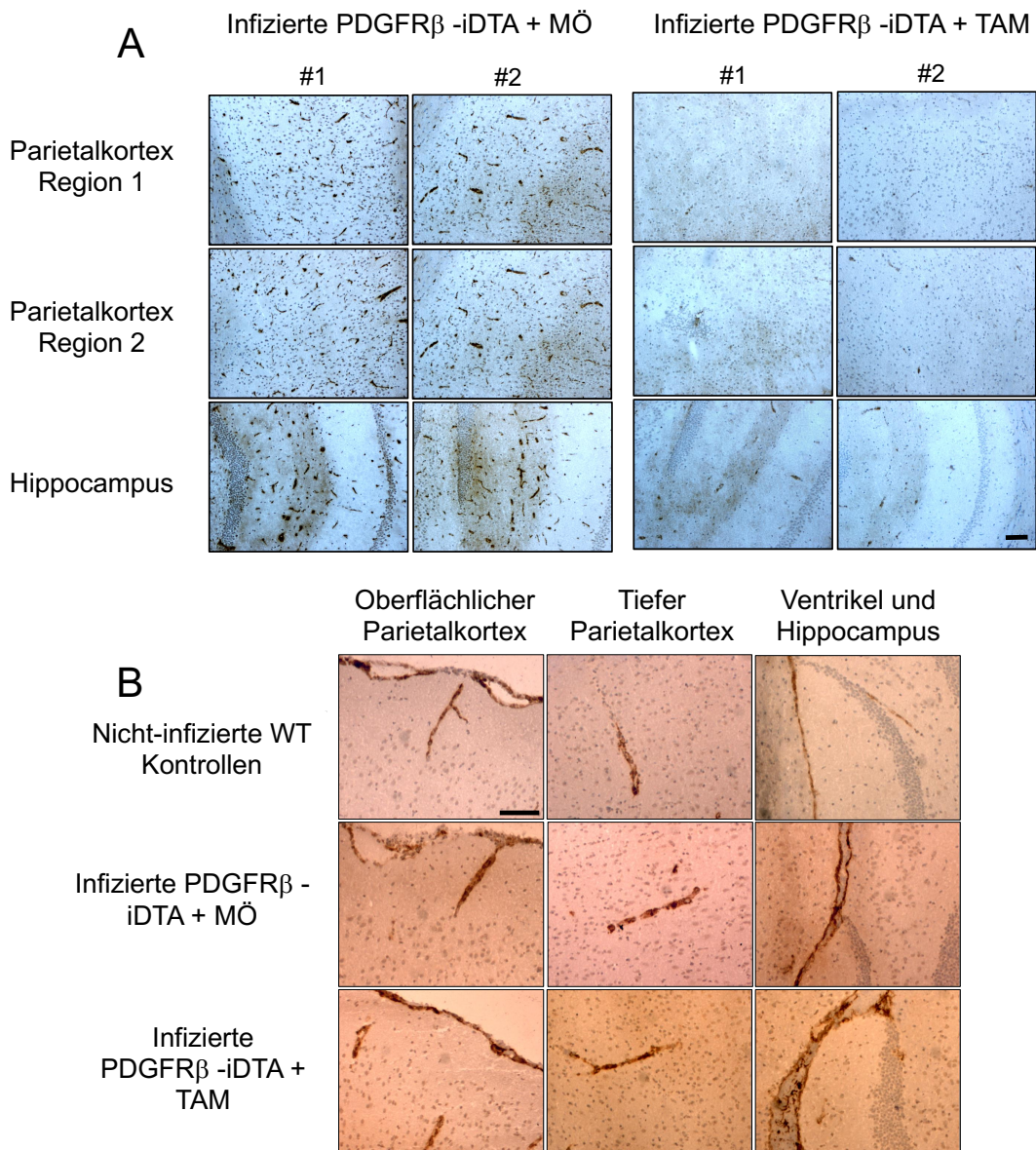


Abbildung 17: Immunhistochemische Anfärbung von Hirnschnitten der Maus mit PDGFR β (A) und dem Fibroblastenspezifischen Antikörper ER-TR7 (B). (A) Untersucht wurden Hirnschnitte von infizierten Tamoxifen- (TAM) oder Maisöl (MÖ) – behandelten PDGFR β -iDTA Mäusen 42 Stunden nach intrazisternaler Applikation von *S. pneumoniae* (zwei repräsentative Beispiele pro Gruppe: #1 und #2). Gezeigt werden drei zufällig ausgewählte Schnitte pro Tier. Die Schnitte wurden mit einem anti-murinen PDGFR β -Antikörper gefärbt und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Bei den mit TAM-behandelten transgenen Mäusen wurde eine deutliche Verringerung der PDGFR β -Färbung im Vergleich zu den mit CO behandelten Tieren beobachtet, was auf eine erfolgreiche Depletion von PDGFR β -positiven Zellen, vermutlich Perizyten, hinweist. (B) Hirnschnitte von nicht-infizierten WT-Kontrollmäusen, infizierten PDGFR β -iDTA-Mäusen, die mit MÖ behandelt wurden, und infizierten PDGFR β -iDTA-Mäusen, die mit TAM behandelt wurden. Die Schnitte wurden mit anti-murinen ER-TR7 Antikörper gefärbt und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Es gab keine Reduktion oder Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Gruppen, was darauf hindeutet, dass die ZNS-Fibroblastenpopulation in diesem Modell der genetischen Zellablation erhalten bleibt. Der Maßstabsbalken zeigt 100 μ m Länge an.

Ergebnisse

Die genetische Depletion führte zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs: Tamoxifen-behandelte PDGFR β -iDTA Mäuse wiesen signifikant höhere klinische Scorewerte auf als die entsprechenden Kontrollgruppen, nämlich mit Maisöl-behandelte PDGFR β -iDTA Mäuse sowie mit Tamoxifen- oder Maisöl-behandelte Wildtyp (C57BL6)-Mäuse (**Abbildung 18A**). Überdies fanden sich im Vergleich zu den genannten Kontrollgruppen bei den Tamoxifen-behandelte PDGFR β -iDTA Mäusen eine ausgeprägte Reduktion der motorischen Aktivität und der Körpertemperatur (**Abbildung 18B, C**). Die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs war nicht mit Unterschieden in den Bakterientiter und dem Ausmaß von zerebralen Blutungen assoziiert (**Abbildung 18D, E**).

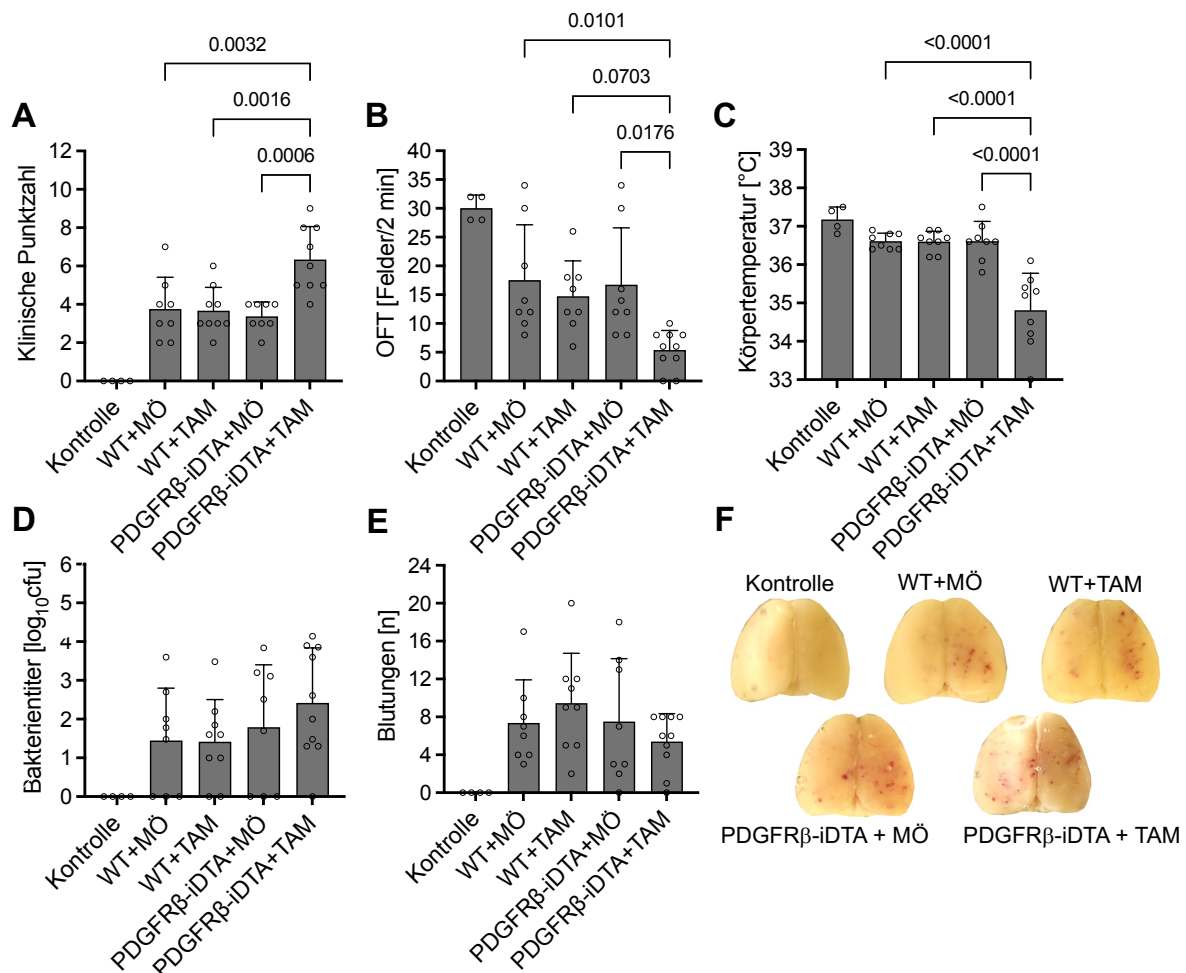


Abbildung 18: Klinische Punktzahl (A), Open-Field-Test (B), Körpertemperatur (C), Bakterientiter der homogenisierten Mauskleinhirne (D), Anzahl der zerebralen Blutungen (E) und beispielhafte Fotos von Mäusegehirnen (eines pro Versuchsgruppe), 42 Stunden nach der Infektion, von nicht infizierten Kontrollmäusen, infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die entweder mit Tamoxifen (TAM) oder Maisöl (MÖ) behandelt wurden, sowie Wildtyp (WT)-Mäusen, die entweder mit TAM oder MÖ behandelt wurden. Tam-behandelte PDGFR β -iDTA Mäuse zeigen einen schlechteren Krankheitsverlauf, verdeutlicht durch eine höhere klinische Punktzahl, ein

Ergebnisse

schlechteres Erkundungsverhalten, und niedrigere Körpertemperatur im Vergleich zu den Meningitis-Kontrollgruppen. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Bakterientiter und zerebralen Blutungen.

4.1.6 Die genetische Ablation von Perizyten im Mausmodell führt zu einer Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität

Zunächst bestimmten wir die Konzentrationen von Albumin, einen etablierten Marker für die Blut-Hirn-Schranken-Integrität (Kadry et al., 2020) in Maus-Hirnen der oben genannten Versuchsgruppen, die am Versuchsende, also 42 Stunden post infectionem, gewonnen worden waren. Bei diesen Analysen fand sich eine signifikante Erhöhung der Albumin-Werte in Hirnen von Tamoxifen-behandelten PDGFR β -iDTA-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden mit Maisöl-behandelten Mäusen. Zur Bestätigung und Bekräftigung dieser Beobachtung setzten wir in der Folge eine weitere Messmethode ein: wir bestimmten die Konzentrationen des als Permeabilitätsmarker bekannten Farbstoffs Evans Blau im Plasma (Blut) und Gehirn von gesunden Kontrollen und Tamoxifen- oder Maisöl-behandelten PDGFR β -iDTA Mäusen. (**Abbildung 19**). Auch hier konnten wir nachweisen, dass die Evans blau- Konzentration im Gehirn von Mäusen mit genetischer Ablation von Perizyten höher war als bei den Vergleichsgruppen, was auf eine ausgeprägtere Störung der Blut-Hirn-Schranke hindeutete.

Ergebnisse

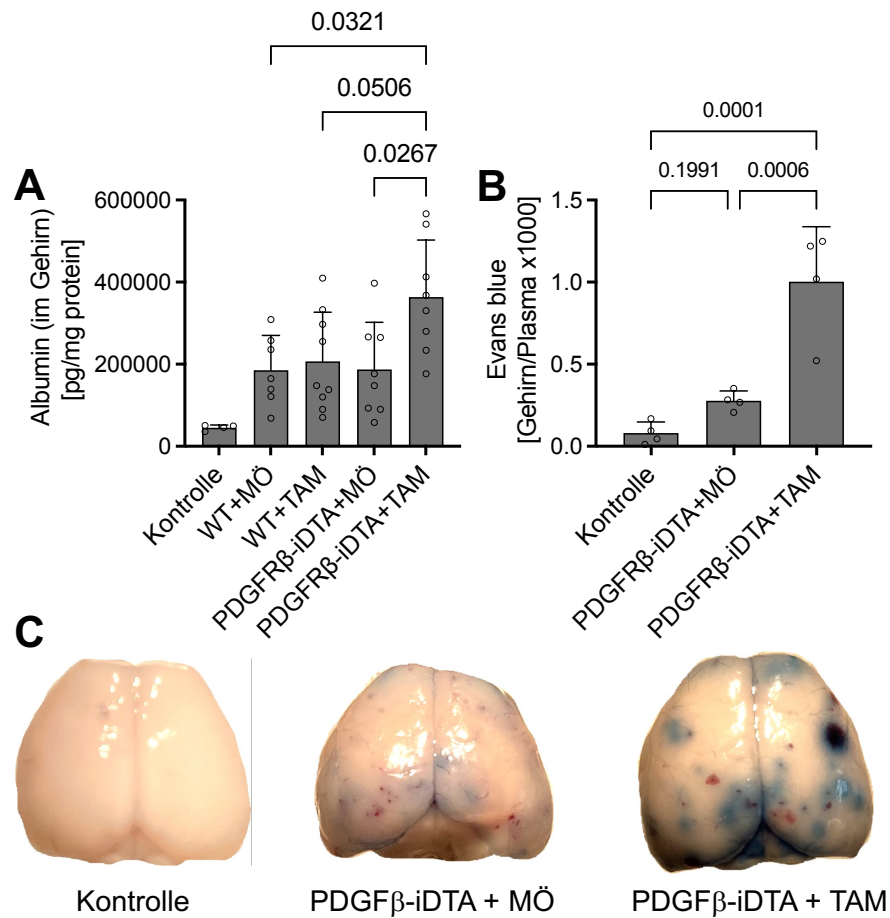


Abbildung 19: Albuminkonzentration im Gehirn (A) von nicht infizierten Kontrollmäusen, infizierten PDGFRβ-iDTA-Mäusen, die entweder mit Tamoxifen (TAM) oder Maisöl (MÖ) behandelt wurden, sowie Wildtyp (WT)Mäusen, die entweder mit TAM oder MÖ behandelt wurden. Evans-Blau-Konzentrationen (B) von nicht infizierten Kontrollmäusen und infizierten PDGFRβ-iDTA Mäusen, die entweder mit TAM oder MÖ behandelt wurden. (C) Bilder von repräsentativen Maushirnen der genannten Versuchsgruppen. Sowohl die Albuminkonzentration als auch die Evans-Blau-Konzentration sind im Gehirn von Mäusen nach einer genetischen Perizytendepletion während der Pneumokokken-Meningitis signifikant höher als in der relevanten Vergleichsgruppe (Maisöl-behandelten PDGFRβ-iDTA-Mäusen).

4.1.7 Die genetische Ablation von Perizyten im Mausmodell führt zur erhöhter Leukozyten-Rekrutierung

Mit Tamoxifen behandelte PDGFRβ-iDTA Mäuse zeigten sowohl 24 als auch 42 Stunden nach Infektion während der Pneumokokken-Meningitis eine signifikant höhere Leukozytenzahl im Liquor als die Kontrollgruppen (**Abbildung 20A**). Um mögliche Unterschiede in der Genexpression wichtiger Entzündungsfaktoren zwischen Mäusen mit induzierter Perizytendepletion und normaler Perizytenpopulation während der Infektion zu identifizieren, führten wir eine PrimeTM PCR Array- Analyse durch. Hierbei konnten wir zeigen, dass infizierte

Ergebnisse

Tamoxifen-behandelte PDGFR β -iDTA Mäuse im Vergleich mit infizierten, Maisöl-behandelten PDGFR β -iDTA Mäusen eine höhere Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CCL2 aufwiesen; diesen Chemokinen wird eine wichtige Funktion bei der Leukozyten-Rekrutierung bei der Pneumokokken-Meningitis zugeschrieben (Gil, Wall, et al., 2022; Klein, Paul, et al., 2006; Koedel et al., 2004) (**Abbildung 20B**). Diese Array-Befunde konnten durch anschließende RT-PCR-Untersuchungen bestätigt werden (**Abbildung 20C**). Darüber hinaus fanden wir bei diesen ergänzenden Analysen eine vermehrte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (nicht aber von VCAM-1) in den Hirnen der Perizyten-depletierten Mäuse. Erwähnenswert ist überdies, dass sich – wie es von unseren immunhistochemischen Ergebnissen zu erwarten war - eine verminderte Expression von PDGFR β in Hirnen von PDGFR β -iDTA Mäusen fand, die mit Tamoxifen behandelt wurden, im Vergleich zu Hirnen von Maisöl-behandelten PDGFR β -iDTA Mäusen.

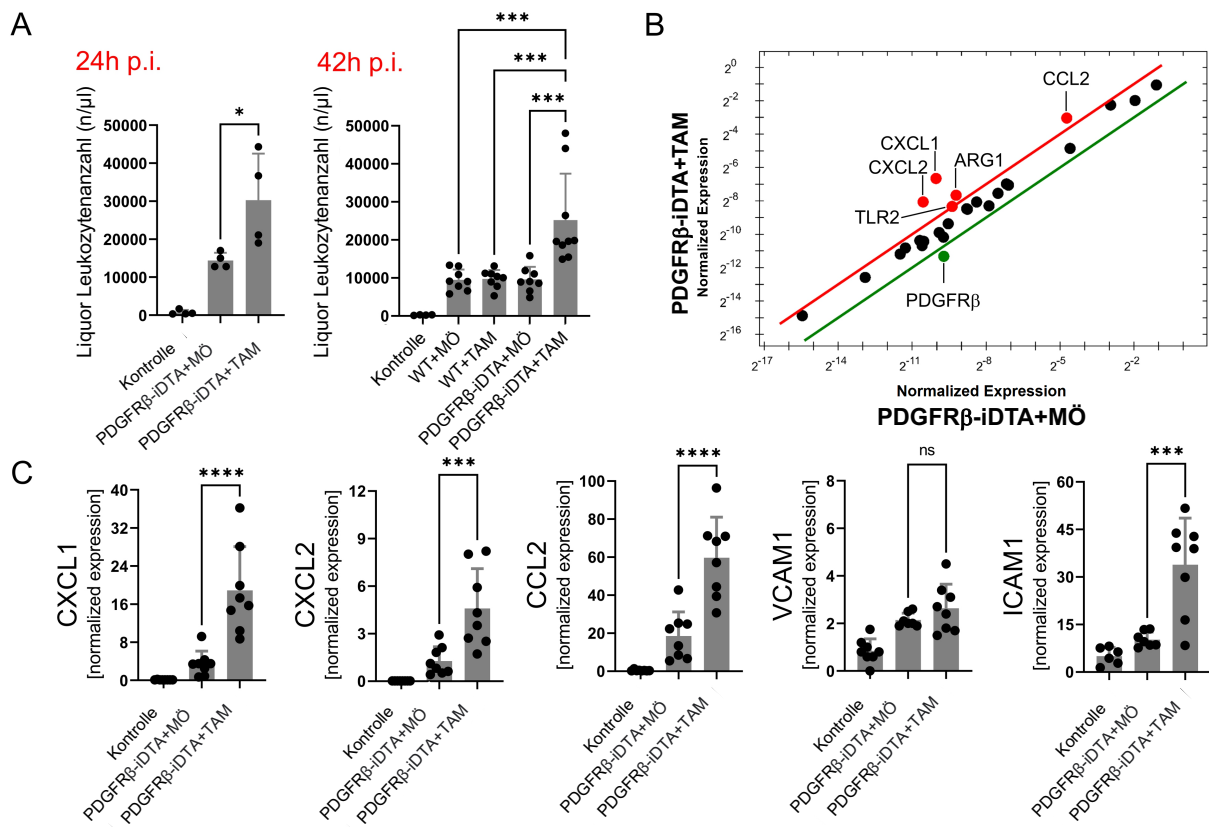


Abbildung 20: Liquor Leukozytenzahl (A) 24 und 42 Stunden nach Infektion (p.i., post infektionem) von nicht-infizierten Kontrollmäusen, infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die entweder mit Tamoxifen (TAM) oder Maisöl (MÖ) behandelt wurden, sowie WT Mäusen, die entweder mit TAM oder MÖ behandelt wurden. Vergleich der Expression ausgewählter Gene mittels Prime[™] PCR Array Analyse im Gehirn (B) von infizierten PDGFR β -iDTA-Mäusen, die mit TAM oder MÖ behandelt wurden. RT-PCR Untersuchungen (C) von nicht-infizierten Kontrollmäusen und infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die entweder mit Tamoxifen (TAM) oder Maisöl (MÖ) behandelt wurden. Infizierte PDGFR β -iDTA Mäuse, die mit TAM behandelt wurden, hatten signifikant höhere

Liquor-Leukozytenzahlen und zeigten eine höhere Gehirnexpression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CCL2 und des Adhäsionsmolekül ICAM-1 im Vergleich zu infizierten PDGFR β -iDTA Mäusen, die mit MÖ behandelt wurden.

4.2 Die Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis

4.2.1 PAI-2 wird während der Pneumokokken-Meningitis in den Liquor und ins Blut freigesetzt

In einer früheren Studie beobachtete unsere Arbeitsgruppe eine deutliche Hochregulierung (um das 15-fache) der PAI-2 mRNA Expression im Hirn von Mäusen mit einer Pneumokokken-Meningitis, im Vergleich mit nicht-infizierten Mäusen (Paul et al., 2005). Im Einklang mit dieser Beobachtung fanden wir in dieser Untersuchung einen deutlichen Anstieg der PAI-2 Proteinkonzentrationen in Liquor- und Blutplasmaproben, die 24 Stunden nach Injektion entnommen wurden (**Abbildung 21A, B**). Achtundvierzig Stunden nach der Injektion unterschieden sich die PAI-2 Werte nicht mehr signifikant.

In der immunhistochemischen Analyse konnten wir PAI-2 positive Zellen vor allem in den Leukozyten-Infiltraten im leptomeningealen Raum und in den Ventrikeln nachweisen (**Abbildung 21C, D**). Insgesamt haben wir bei Mäusen mit einer Pneumokokken-Meningitis eine erhebliche Hochregulierung und Freisetzung von PAI-2 festgestellt.

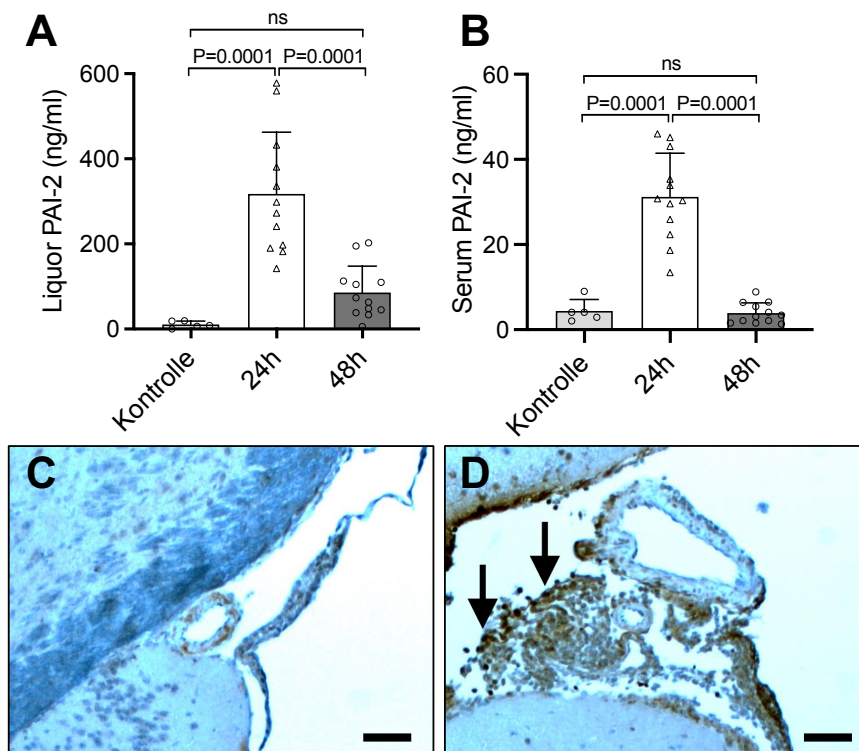


Abbildung 21: Liquor- (A) und Plasma- (B) PAI-2 Werte 24 und 48 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Immunhistochemische Analyse muriner Hirnschnitten von nicht-infizierten Kontrollen (C) und Mäusen mit einer Pneumokokken-Meningitis (D). Die Schnitte wurden mit einem anti-Maus PAI-2 Antikörper gefärbt und mit

Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. In der immunhistochemischen Untersuchung sieht man eine starke PAI-2 Färbung in den Entzündungsinfiltraten im leptomeningealen Raum (Siehe Pfeile). Der Maßstabsbalken zeigt 100 μm Länge an.

4.2.2 Die PAI-2 Defizienz ist mit einem schlechteren Outcome der murinen Pneumokokken-Meningitis assoziiert

Um einen besseren Einblick in die funktionelle Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis zu erhalten, verglichen wir den Krankheitsphänotyp von PAI-2-defizienten Mäusen (*Serpinb2*^{-/-}) mit dem von WT Mäusen. In einem ersten Versuchsansatz untersuchten wir Mäuse 24 Stunden nach intrazisternaler Inokulation mit *S. pneumoniae*. Zu diesem Zeitpunkt zeigten *Serpinb2*^{-/-} Mäuse dieselben Anzeichen der Erkrankung wie WT Mäuse. Es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich Leukozytenzahl im Liquor, zerebralen Blutungen sowie Bakterientiter im Gehirn und Blut. PAI-2 scheint somit keine Rolle in den initialen Phasen der Meningitis zu spielen.

In fortgeschrittenen Phasen der Erkrankung, 48 Stunden nach der intrazisternalen Infektion, ergaben sich jedoch unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung der Mäuse. In diesem Versuchsansatz bekamen Mäuse 24 Stunden nach Infektion Ceftriaxon intraperitoneal appliziert, um dem fulminanten Wachstum der Bakterien entgegenzuwirken und so das Überleben der Mäuse zu gewährleisten. Die PAI-2 Defizienz hatte keinen Einfluss auf die Abtötung der Pneumokokken durch Ceftriaxon, die Liquorzellzahl und die klinische Scorewerte der überlebenden Mäuse. Allerdings mussten 5 von 12 (41 %) PAI-2-defizienten Mäusen aufgrund des Eintretens von Abbruchkriterien vor dem geplanten Versuchsende aus dem Experiment genommen werden; im Gegensatz überlebten alle Mäuse in der WT Gruppe bis zum geplanten Versuchsende (Log-rank $P = 0.04$; **Abbildung 22A**). Nach Eröffnung des Schädels konnten wir intrazerebrale ($n = 1$), subarachnoidale ($n = 3$) und subdurale Blutungen ($n = 1$) in 4 von 12 (33 %) infizierten *Serpinb2*^{-/-} Mäusen nachweisen (**Abbildung 22B-E**). Im Vergleich dazu traten in der WT Gruppe keine größeren Blutungen auf. Die pathologische Begutachtung der Gehirne ergab eine höhere Anzahl an hämorrhagischen Stellen und eine größere Blutungsfläche in PAI-2-defizienten Mäusen im Vergleich mit infizierten WT Mäusen (**Abbildung 22F, G**). Zusätzlich zeigten infizierte *Serpinb2*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu infizierten WT Mäusen eine verstärkte Immunreaktivität gegen MRP-14, einem bekannten Marker für neutrophile Granulozyten (**Abbildung 23**). Somit könnte eine stärkere neutrophile Infiltration von Gefäßen im Parenchym zu einer Zunahme von Hirnblutungen bei PAI-2-defizienten Mäusen mit einer Pneumokokken-Meningitis beitragen.

Ergebnisse

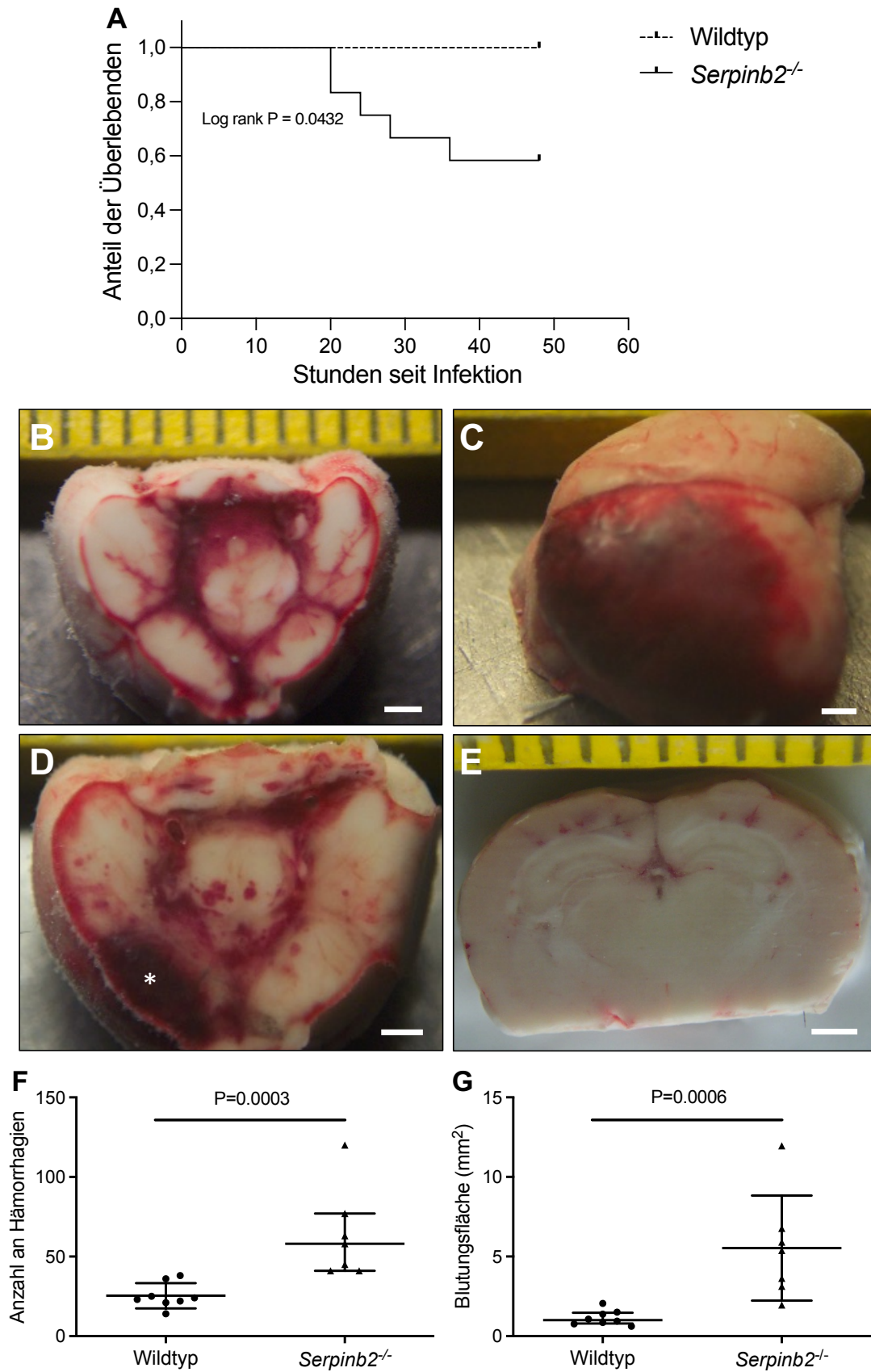


Abbildung 22: Die Kaplan Meier Kurve demonstriert eine erhöhte „Sterblichkeit“ bei PAI-2-defizienten *Serpinb2^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen (A). Makroskopische Bilder von Maushirnen von PAI-2-defizienten Mäusen (B-E). Basale Ansicht des Maushirns mit Schnitt durch das Mesencephalon mit

Ergebnisse

Subarachnoidalblutung (B). Linke Frontalansicht auf das Maushirn mit Subduralhämatom über der linken Hemisphäre (C). Basalansicht auf das Gehirn mit Subarachnoidalblutung und intrazerebralem Hämatom (Siehe Sternchen) (D). Multiple kleine kortikale Blutungen (E). Anzahl kortikaler Blutungen (F) und deren Gesamtfläche (G) 48 Stunden nach Infektion mit Pneumokokken in WT und PAI-2-defizienten Mäusen. Der Maßstabsbalken zeigt 1 mm Länge an.

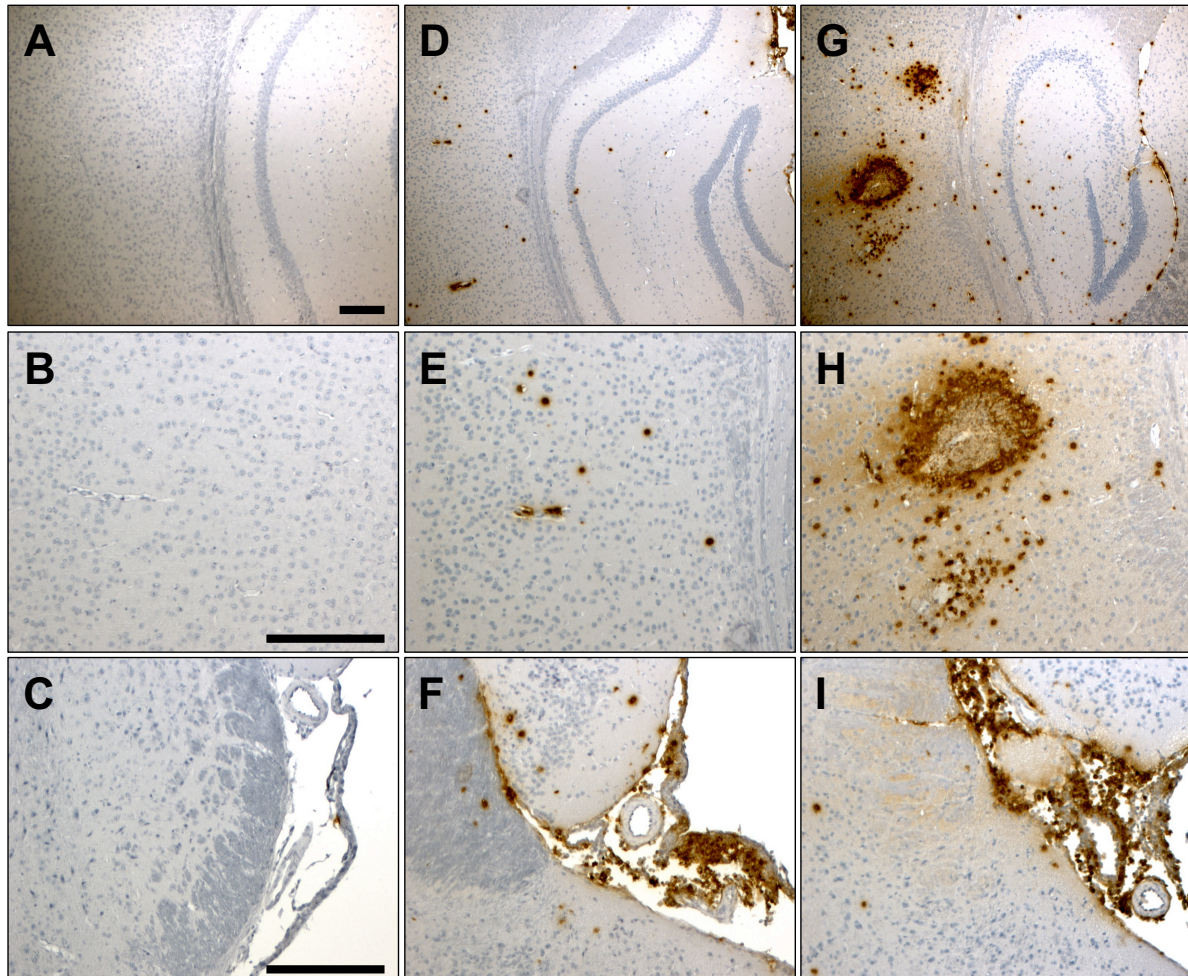


Abbildung 23: Immunhistochemische Analyse von Gehirnschnitten nicht-infizierter WT Mäuse (A-C), *S. pneumoniae*-infizierte WT Mäuse (D-F) und *S. pneumoniae*-infizierte *Serpinb2*^{-/-} Mäuse (G-I). Die Gehirnschnitte wurden 48 Stunden nach intrazisternaler Applikation von PBS oder *S. pneumoniae* (3 Mäuse pro Gruppe) entnommen. Die Schnitte wurden mit einem anti-Maus MRP-14 Antikörper gefärbt und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt. Infizierte PAI-2-defiziente Mäuse zeigten eine gesteigerte MRP-14 Färbung im Hirnparenchym (G, H) und im geringeren Ausmaß auch in den Infiltraten im leptomeningealen Raum (I), im Vergleich mit infizierten WT Mäusen (D-F). Der Maßstabsbalken zeigt 200 μ m Länge an.

4.2.3 *Serpinb2*^{-/-} Mäuse zeigen eine veränderte Zytokinfreisetzung während der Pneumokokken-Meningitis

In der Vergangenheit wurde bereits berichtet, dass PAI-2 die IL-1 β Produktion unterdrücken kann, in dem es der Aktivität der Caspase-1 entgegenwirkt (Chuang et al., 2013; Greten et al.,

Ergebnisse

2007). Zusätzlich kann eine PAI-2 Defizienz zu einer gesteigerten u-PA/ t-PA-abhängigen Plasminaktivität führen, die C5 in seine aktive Form C5a konvertieren und somit zu erhöhten C5a-Konzentrationen führen kann (Amara et al., 2010; Foley et al., 2016). Sowohl IL-1 β als auch C5a sind bekannte Mediatoren der Hyperinflammation und Gefäßschäden bei der murinen Pneumokokken-Meningitis (van de Beek, Brouwer, et al., 2016). Das hat uns dazu motiviert, die C5a- und IL-1 β -Konzentrationen in den Gehirnen von infizierten WT und PAI-2-defizienten Mäusen zu bestimmen. Überdies entschieden wir uns dazu, die Konzentration von IL-10 zu messen, einem anti-inflammatorischen Zytokin in der Pneumokokken-Meningitis (Koedel et al., 1996; Woehrl et al., 2011; Zwijnenburg et al., 2003). *Serpinb2*^{-/-} Mäuse mit einer Pneumokokken-Meningitis hatten höhere C5a- (**Abbildung 24A**) und niedrigere IL-10-Konzentrationen (**Abbildung 24B**) im Gehirn im Vergleich zu infizierten WT Mäusen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den IL-1 β Konzentrationen zwischen den Gruppen beobachtet (**Abbildung 24C**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine dysregulierte Inflammation ein möglicher Faktor ist, der zur deutlich schlechteren Hirnpathologie bei den PAI-2-defizienten Mäusen beitragen könnte.

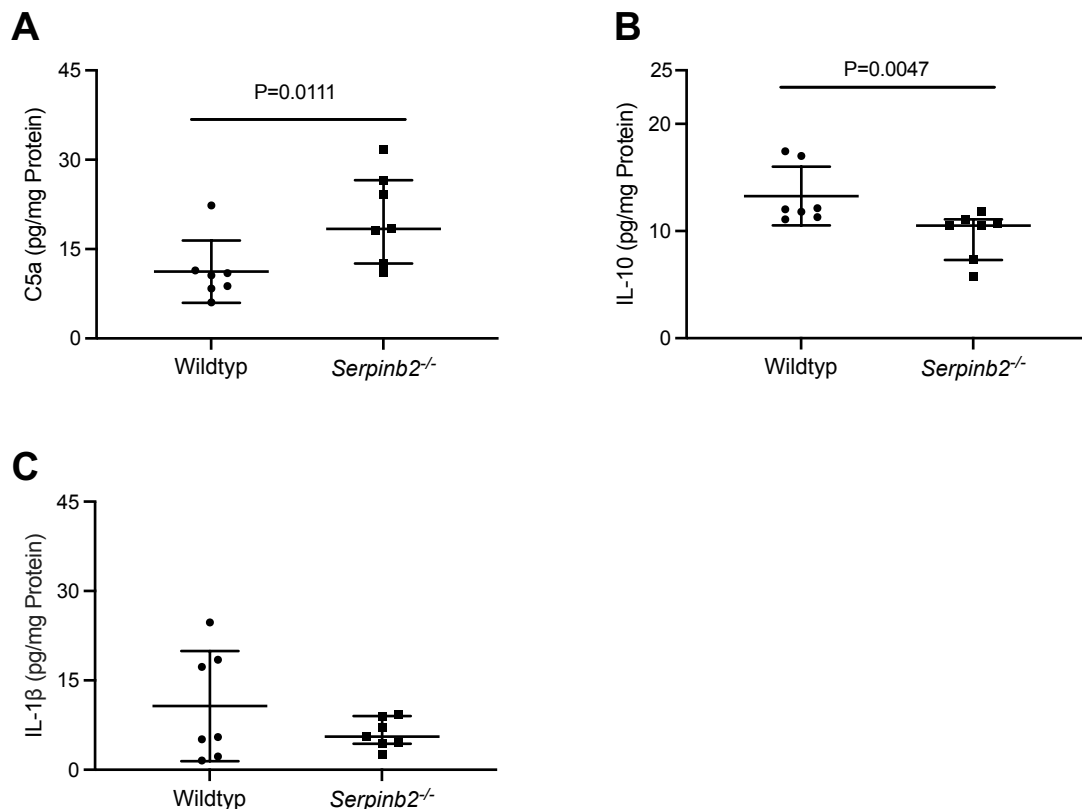


Abbildung 24: C5a- (**A**), IL-10- (**B**) und IL-1 β - (**C**) Konzentrationen, bestimmt in homogenisierten Gehirnen von infizierten Mäusen 48 Stunden nach der Induktion der Pneumokokken-Meningitis. Mäuse mit fehlendem *Serpinb2* hatten signifikant höhere C5a- und niedrigere IL-10- Konzentrationen im Vergleich zu WT Mäusen.

4.2.4 Die PAI-2 Defizienz führt bei einer Pneumokokken-Exposition zu einer veränderten Zytokinausschüttung von BMDM

Da Makrophagen bei einer Aktivierung von TLR hohe Mengen an PAI-2 exprimieren (Chuang et al., 2013; Greten et al., 2007) und als wichtige Regulatoren angeborener Immunreaktionen auf bakterielle Infektionen gelten, untersuchten wir als nächstes die Expression von PAI-2 sowie dessen funktionelle Bedeutung in murinen BMDM bei Stimulation mit Pneumokokken. Quantitative RT-qPCR Analysen zeigten eine Hochregulation von PAI-2 mRNA Expression in WT BMDM, jedoch nicht in PAI-2-defizienten Zellen (**Abbildung 25A**). WT BMDM setzten konzentrationsabhängig PAI-2 in die Zellkulturüberstände frei (**Abbildung 25B**). Die Freisetzung begann bereits bei einer nicht-zytolytischen Konzentration von 10^5 cfu/ml *S. pneumoniae* und steigerte sich rasant mit dem Beginn der Lyse der Makrophagen. PAI-2-defiziente BMDM reagierten auf die Stimulation mit *S. pneumoniae* mit einer signifikant niedrigeren IL-10 Freisetzung im Vergleich zu WT BMDM (**Abbildung 25C**).

Die vergleichende RT-qPCR-Analysen von WT BMDM und PAI-2-defizienten BMDM mit ausgewählten Oberflächenmarker und Aktivierungsmarker von Makrophagen, und zwar CX3CR1, CD11b (ITGAM), MRC1 (CD206), CD36, iNOS oder ARG, zeigte keine Unterschiede in der Expression (**Abbildung 26**). Außerdem gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in der Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β and IL-6.

Zusammengefasst zeigten unsere *in vitro* Experimente einen selektiven Einfluss der PAI-2 Defizienz auf die Pneumokokken-induzierte IL-10 Expression von BMDM. Diese *in vitro*-Ergebnisse stützten unsere Beobachtungen im Mausmodell.

Ergebnisse

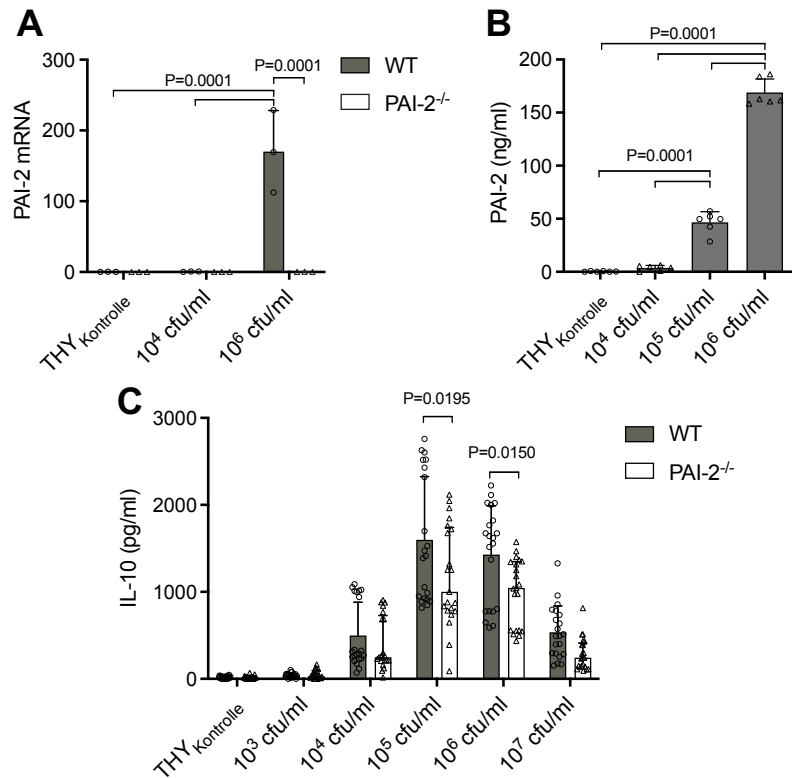
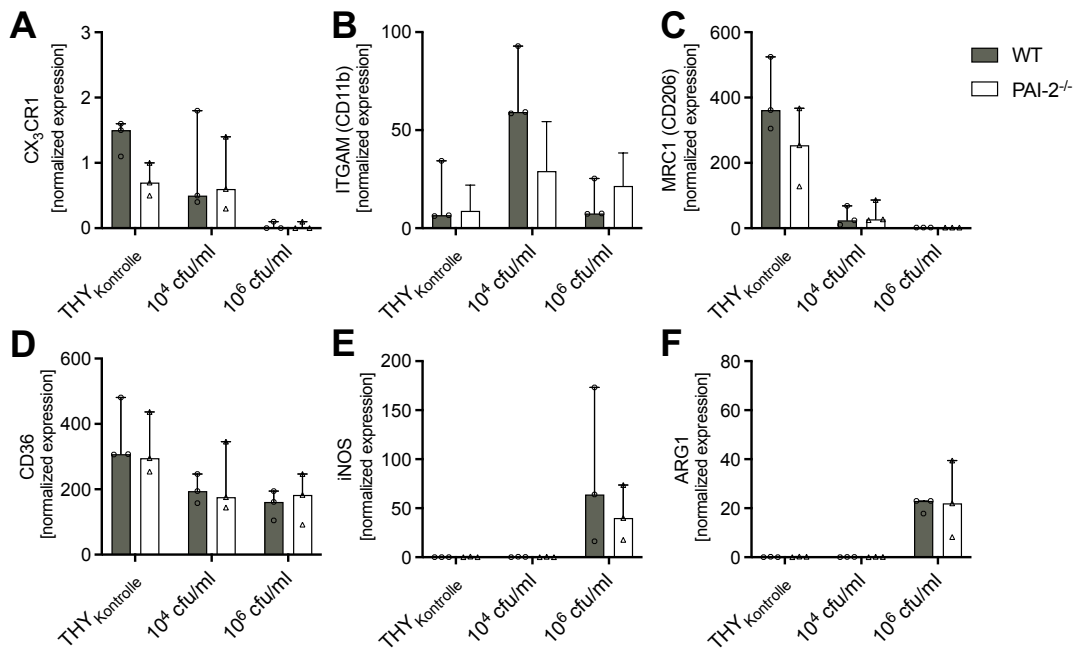


Abbildung 25: PAI-2 mRNA Expression (A) sowie PAI-2- (B) und IL-10- (C) Freisetzung in den Zellkulturüberstand von WT und PAI-2-defizienten BMDM nach Stimulation mit *S. pneumoniae*. Die Exponierung mit Pneumokokken führte zur einer starken Hochregulation der PAI-2 mRNA Expression (A) und einer gesteigerten Freisetzung von PAI-2 (B) aus WT BMDM. PAI-2-defiziente BMDM reagierten auf die Stimulation mit *S. pneumoniae* mit einer verringerten IL-10 Freisetzung im Vergleich mit WT BMDM (C). THY, das Kulturmedium von *S. pneumoniae*, wurde als Kontrolle benutzt.



Ergebnisse

Abbildung 26: CX₃CR1 mRNA (A), ITGAM (CD11b) mRNA (B), MRC1 (CD206) mRNA (C), CD36 mRNA, (D) iNOS mRNA (E) und ARG1 mRNA (F) Expression von WT und PAI-2-defizienten BMDM nach Stimulation mit *S. pneumoniae*. Es gab keine Unterschiede in der Expression zwischen WT und PAI-2-defizienten BMDM. THY, das Kulturmedium von *S. pneumoniae*, wurde als Kontrolle benutzt.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Perizyten *in vitro* in der Lage sind, Pneumokokken zu erkennen und auf deren Gegenwart mit einer erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-6 zu reagieren. Dabei scheinen, zumindest in der Maus, TLR-2 und endosomale TLR als wichtige Erkennungsrezeptoren zu agieren. Die gleiche Reaktion konnte durch unterschiedliche Pneumokokken-Serotypen ausgelöst werden. Pneumolysin scheint als Pathogenitätsfaktor maßgeblich für die Reaktion verantwortlich zu sein. Eine pharmakologische Perizytendepletion im Zebrafisch Embryo-Modell führte zu höherer Mortalität, die mit einer verstärkten Hirnödementwicklung vergesellschaftet war. Im Einklang damit zeigten Mäuse nach einer Perizytenablation einen ungünstigeren Krankheitsverlauf und eine ausgeprägtere Störung der Blut-Hirn-Schranke. Der ungünstigere Krankheitsverlauf scheint durch eine erhöhte Chemokinexpression und eine konsekutiv vermehrte Leukozyten-Infiltration, kurz einer verstärkten Inflammation, bedingt sein. Die Erhaltung der Integrität der Perizytenpopulation könnte somit eine neue therapeutische Strategie im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis darstellen.

5.1.1 Perizyten und die Leukozyten Rekrutierung im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis

Die Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, in den Liquor und das Gehirn ist eines der Hauptmerkmale der Pneumokokken-Meningitis (Engelen-Lee et al., 2016; Koedel et al., 2009). Es gibt mehrere *in-vitro* Studien, die gezeigt haben, dass Perizyten durch direkte Interaktionen, die durch Zytokine, Chemokine und/oder das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (Eng.: intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) vermittelt werden, die Migration von neutrophilen Granulozyten fördern können (Gil, Venturini, et al., 2022; Kim & Luster, 2015; Kovac et al., 2011; Pieper et al., 2013; Stark et al., 2013). Auch in *in-vivo* Untersuchungen in peripheren Organen zeigte sich, dass Perizyten über ICAM-1 die Migration von neutrophilen Granulozyten fördern (Proebstl et al., 2012; Stark et al., 2013). Während Perizyten die Rekrutierung von Leukozyten in peripheren Organen fördern, scheint ihre Rolle im ZNS eine andere zu sein. Überraschenderweise scheint das Fehlen von Perizyten im ZNS das Einwandern von Blut-Leukozyten zu erleichtern. Török et al. (Torok et al., 2021) konnten zeigen, dass Perizyten das Eindringen von Leukozyten, insbesondere von Monzyten, T-Zellen und DC, in das ZNS unter physiologischen und pathologischen

Bedingungen, nämlich im Tiermodell der EAE, inhibieren. Sie fanden heraus, dass Perizyten die Expression von vaskulärem Zelladhäsionsmolekül-1 (Eng.: vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) und ICAM-1 auf Endothelzellen unterdrücken und so die Adhäsion von Leukozyten begrenzen. Eine weitere Studie an der Netzhaut von Mäusen bestätigte diese Theorie und zeigte, dass die Depletion von Perizyten zu einer verstärkten Infiltration von Leukozyten führte, die mit einer endothelialen Hochregulierung von ICAM-1 einherging (Ogura et al., 2017). In Übereinstimmung mit diesen Studien zeigen wir hier, dass das Fehlen von Perizyten während einer akuten bakteriellen Infektion eine signifikant erhöhte Leukozytenmigration in das ZNS bedingt, die mit einer erhöhten Expression der neutrophilen Chemokine CXCL1 und CXCL2 sowie des Monozyten-Chemokin CCL2 im Gehirn einhergeht. Perizyten scheinen also im ZNS eine andere Funktion zu haben als in peripheren Organen: sie begrenzen vermutlich die Rekrutierung von Leukozyten, indem sie der Produktion von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen und Chemokinen entgegenwirken. Dies könnte auch in der Pneumokokken-Meningitis der Fall sein, da wir bei Mäusen mit Perizytendepletion eine Zunahme der Leukozyten und eine höhere Expression von Leukozyten-Rekrutierungs-Chemokinen nachgewiesen haben. Zudem konnten wir zeigen, dass der Verlust der Perizyten mit einer erhöhten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 verbunden ist, jedoch nicht von VCAM-1.

5.1.2 Bedeutung von Perizyten für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke während der Pneumokokken-Meningitis

Die besondere Bedeutung der Perizyten für die Aufrechterhaltung und Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Unter anderem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Perizytendefizienz mit einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für Wasser und bestimmte Tracer einhergeht (Armulik et al., 2010). Die erhöhte Durchlässigkeit beruhte hier auf endotheliale Endozytose. In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass Perizyten Vitronectin, ein extrazelluläres Matrixprotein freisetzen, welches über den Integrin-Rezeptor $\alpha 5$ auf Endothelzellen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke regulieren kann (Ayloo et al., 2022). Perizyten scheinen eine wesentliche Rolle bei der Bildung der Blut-Hirn-Schranke während der Embryogenese zu spielen. Dabei regulieren Perizyten unter anderem die Bildung von Tight Junctions (Daneman et al., 2010). Nach Depletion von Perizyten mittels Diphtherietoxin zeigten Mäuse einen akuten Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Nikolakopoulou et al., 2019). Zudem wurde bereits die Funktion von Perizyten im Rahmen von anderen neurologischen Erkrankungen

beschrieben. Eine Studie konnte feststellen, dass traumatische Hirnverletzungen zu einer Beeinträchtigung der Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen führt, was zu einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke und somit einer erhöhten Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen führt (Bhowmick et al., 2019). Im Rahmen der Alzheimer-Krankheit scheint die Anzahl der Perizyten in der weißen Substanz im Vergleich zu Kontrollen reduziert zu sein (Ding et al., 2020). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine chronische zerebrale Hypoperfusion zu einem Ablösen von Perizyten führt und damit die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht (Liu et al., 2019). Auch bei der amyotrophen Lateralsklerose wurde festgestellt, dass es zu einer reduzierten Anzahl von Perizyten und damit einhergehend zur Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke kommt (Winkler et al., 2013). In einem LPS-induzierten Modell der septischen Enzephalopathie in Mäusen wurde ein Ablösen von Perizyten von der Basalmembran im Hippocampus und damit einhergehend eine erhöhte zerebrovaskuläre Permeabilität beobachtet (Nishioku et al., 2009). Passend zur diesen Ergebnissen zeigten unsere Untersuchungen in zwei Tiermodellen ebenfalls eine Reduktion der Perizytenpopulation im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis. Sowohl die pharmakologische als auch die genetische Depletion von Perizyten führten zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und zu Hirnödemen. Obwohl es zu einer homogenen Abnahme der Perizytenzellzahl im gesamten Gehirn kam, konnten wir nur punktuelle undichte Stellen der Blut-Hirn-Schranke mittels Evans-Blau-Methode feststellen. Somit scheint der Perizyten Verlust nicht allein für die erhöhte Durchlässigkeit verantwortlich zu sein.

Da unsere Untersuchungen sowohl eine Reduktion/Veränderung der Perizytenpopulation bei der PM als auch einen schlechteren Krankheitsverlauf nach Perizytendepletion demonstrierten, könnten therapeutische Maßnahmen, die sich protektiv auf Perizyten auswirken (können), einen möglichen neuen therapeutischen Ansatz bei der PM darstellen. Ein Ansatz, der bereits im Rahmen des Morbus Parkinson oder des Status epilepticus positive Ergebnisse erzielt hat, ist die lokale oder systemische Verabreichung des Wachstumsfaktors PDGFB, der für die Aufrechterhaltung der Perizytenpopulation und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke entscheidend ist (Cheng et al., 2018; Vazquez-Liebanas et al., 2022). Ob dies auch für die Pneumokokken-Meningitis gilt, muss in Zukunft noch untersucht werden.

5.1.3 Schwachpunkte unserer Perizyten-Studie

Unsere Arbeit hat einige Einschränkungen. Erstens, wie in der Einleitung erwähnt, sind Perizyten eine sehr heterogene Zellpopulation und, obwohl PDGFR β ein anerkannter Perizyten-Marker ist, wird er nicht ausschließlich von Perizyten, sondern auch von anderen

Diskussion

perivaskulären Zellen im ZNS exprimiert, wie z.B. von ZNS-Fibroblasten (Dorrier et al., 2022). In unserer Studie konnten wir mit Hilfe von IHC-Untersuchungen zeigen, dass die Perizytenablation im Mausmodell zu keinen erkennbaren Veränderungen in der Immunreaktivität für den spezifischen Fibroblasten-Marker ER-TR7 führte. In unserem Zebrafischmodell stützten wir uns auf die Kombination des Perizyten-Markers PDGFR β sowie auf die Morphologie und Lokalisation der Perizyten (insbesondere ihre Lage am Gefäß; siehe Bilder unserer CLSM-Analysen auf Seite). Dennoch können wir nicht eindeutig sagen, dass unsere Zellen zweifelslos Perizyten sind. Da aber bis heute keine spezifischen Perizyten Marker vorhanden sind, ist die Kombination aus Marker, Morphologie und Lage und der Ausschluss anderer perivaskulärer Zellen die einzige Möglichkeit, Perizyten zu differenzieren.

Darüber hinaus konnten wir zwar demonstrieren, dass Perizyten-depletierte Mäuse eine höhere Leukozytenzahl und ausgeprägtere Blut-Hirn-Schranke-Störung während der PM aufwiesen. Wir stellten überdies fest, dass die verstärkte Leukozytenakkumulation mit einer erhöhten Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen einherging, konnten aber den zugrunde liegenden Mechanismus der Zunahme der BBB-Störung nicht klären. Hier wären weitere Experimente insbesondere zur Bedeutung der verstärkten Leukozytenimmigration für dieses Phänomen aufschlussreich (z.B. Untersuchungen an Granulozyten-depletierten oder mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen CXCL1/CXCL2-behandelten Mäusen). Außerdem wurden in den Tierversuchen nur Tiere, die die vollen 42 Stunden überlebten, auf klinische Scores, Temperatur, Anzahl der weißen Blutkörperchen im Liquor, Blut- und bakterielle Kleinhirntiter, Albuminkonzentrationen und zerebrale Blutungen untersucht. Da davon ausgegangen werden kann, dass verstorbene (d.h. euthanasierte) Mäuse bei den meisten (oder gar allen) dieser Parameter stärker beeinträchtigt sind, wurden relevante klinische Merkmale der Meningitis bei Mäusen mit einer Perizytenablation möglicherweise übersehen, zumal die Anzahl der untersuchten Tiere zu gering war, um für alle Untersuchungsparameter statistisch signifikante Unterschiede aufzuzeigen. Die Fallzahlplanung wurde mit einer repräsentativen Hauptzielgröße durchgeführt, nämlich der Liquor-Zellzahl, weil (1) die Liquorpleozytose ein essentielles diagnostisches Kriterium bei der Pneumokokken-Meningitis ist, (2) die Liquor-Leukozyten entscheidend zur Kontrolle von Infektionen beitragen (sollten), (3) die Zahl der Leukozyten im Liquor einen Hinweis auf das Ausmaß der Immunreaktion liefert, und (4) frühere Untersuchungen im Ratten- und Mausmodell gezeigt haben, dass die Liquor-Zellzahl weder besonders empfindlich noch besonders inert auf therapeutisch induzierte bzw. genetisch bedingte Veränderungen bei der bakteriellen Meningitis reagiert.

5.2 Die Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis

Unsere Ergebnisse zeigten eine PAI-2 Expression in den Entzündungsinfiltraten und eine PAI-2 Freisetzung in den Liquor von Mäusen mit einer Pneumokokken-Meningitis. Die PAI-2 Defizienz war im Mausmodell mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Die höhere Sterblichkeit ging mit einer Zunahme der Anzahl und Größe intrazerebraler Blutungen einher. Diese könnten möglicherweise durch eine vermehrte neutrophile Inflammation, besonders im Bereich parenchymaler Gefäße, verursacht werden. Die vermehrte neutrophile Infiltration wurde von erhöhten C5a- und reduzierten IL-10-Konzentrationen im Gehirn infizierter PAI-2-defizienter Mäuse begleitet, was auf eine immunregulatorische Funktion von PAI-2 bei der Pneumokokken-Meningitis hinweisen könnte. Im Einklang damit zeigten murine BMDM eine erhöhte PAI-2 Produktion sowie eine reduzierte IL-10 Freisetzung in Abwesenheit von PAI-2 während der Stimulation mit Pneumokokken.

5.2.1 PAI-2 im Rahmen der zellulären Immunantwort – Unterschiede im Phänotyp

PAI-2 ist eines der Moleküle, das hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen bei einer Aktivierung von TLR2 und/oder TLR4 hochreguliert wird (Chuang et al., 2013). Dementsprechend wurde in Zellkulturen dieser Zelltypen eine erhöhte PAI-2 Expression und/oder Freisetzung nach Exposition mit *Borrelia burgdorferi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, bakterieller DNA und LPS-enthaltenden Vesikel der äußeren Membran von *Neisseria meningitidis* festgestellt (Berk et al., 2001; Haile et al., 2006; Semeraro et al., 1996; Stacey et al., 1996). Wie wir in unseren Experimenten zeigen konnten, führte auch eine Infektion mit *S. pneumoniae* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer erhöhten Expression und Freisetzung von PAI-2. Diese Beobachtungen deuten auf eine Funktion von PAI-2 im Rahmen der angeborenen Immunität hin. Es gibt nur wenige Veröffentlichungen, die diese Hypothese bisher adressierten, unter anderem in Patienten mit Sepsis (Paramo et al., 1990; Robbie et al., 2000), obwohl schon seit über 20 Jahren PAI-2-defiziente Mäuse zur Untersuchung dieser Frage bereit stehen (Dougherty et al., 1999). In dieser initialen Arbeit zeigten die Autoren, dass *Serpina2*^{-/-} Mäuse eine normale Entwicklung, Überlebensdauer und Fruchtbarkeit aufweisen. Es wurde ferner berichtet, dass *Serpina2*^{-/-} Mäuse keine Unterschiede zu WT Mäusen in der Rekrutierung von Monozyten ins Peritoneum nach einer Thioglykolat-Injektion, im Grad der arteriellen und venösen Thrombosen nach einer LPS-Injektion in den Fußballen sowie in der Überlebenszeit nach einer Stimulation mit LPS oder zökaler Ligation und Punktion zeigen. Im Gegensatz zu dieser negativen initialen Phänotyp-Analyse wurde seitdem berichtet, dass sich PAI-2-defiziente Mäuse von normalen Mäusen durch ihren Krankheitsphänotyp bei

Schistosomen-, Lentiviren- und Darmnematoden-Infektionen aufgrund einer veränderten Th1/Th2-Immunität unterscheiden (Major et al., 2013; Schroder, Gardner, et al., 2010; Zhao et al., 2013). In Mausmodellen der akuten Neurodegeneration konnte man überdies nachweisen, dass eine PAI-2 Defizienz die Entwicklung von Hirnödemen nach traumatischer Hirnverletzung reduziert, jedoch nicht die Größe der Läsion nach zerebralem Trauma oder Infarkt beeinflusst (Griemert, Hedrich, et al., 2019; Griemert, Recarte Pelz, et al., 2019).

5.2.2 PAI-2 beeinflusst den Krankheitsphänotyp der Pneumokokken-Meningitis

In unserem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis konnten wir nun einen eindeutigen Krankheitsphänotyp beobachten: die PAI-2 Defizienz war mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert, die wiederum mit einem erheblichen Zuwachs an intrazerebralen Blutungen einherging. Dieser Krankheitsphänotyp ist ähnlich zu dem Phänotyp, den wir bereits in PAI-1-defizienten (*Serpine1*^{-/-}) Mäusen beobachten konnten (Brouwer et al., 2014). Wie PAI-1 gilt auch PAI-2 als physiologischer Inhibitor von u-PA und t-PA im extrazellulären Milieu (Al-Horani, 2014; Mukhopadhyay et al., 2018). Folglich könnte ein Mangel an PAI-2 zu einer verstärkten Bildung von Plasmin aus Plasminogen und damit zu einem Ungleichgewicht zwischen dem Gerinnungs- und Fibrinolyse-System mit einem erhöhten Blutungsrisiko führen. Dies wird durch unsere Beobachtungen gestützt, dass ein Mangel an PAI-2 mit vermehrten Hirnblutungen bei der experimenteller Pneumokokken-Meningitis einherging. Die histopathologischen Untersuchungen der Maushirne zeigten jedoch einen wesentlichen Unterschied zwischen *Serpine1*^{-/-} und *Serpinb2*^{-/-} Mäusen. In *Serpinb2*^{-/-} Mäusen war der Zuwachs an zerebralen Blutungen mit ausgeprägten neutrophilen Infiltraten assoziiert, während in *Serpine1*^{-/-} Mäusen die Zunahme an Blutungen nicht von vermehrten Entzündungen im Bereich parenchymaler Gefäße begleitet wurde. Bei *Serpine1*^{-/-} Mäusen traten Hirnblutungen auch bei fehlenden perivaskulären Infiltraten auf. Dieser Befund deutet auf Unterschiede im Entstehungsmechanismus der Hirnblutungen zwischen den beiden Genotypen hin.

5.2.3 PAI-2 ist an der Entzündungsregulation beteiligt

Im Gegensatz zu PAI-1 scheint PAI-2 an der Regulation von Entzündungen beteiligt zu sein. Diese Hypothese wird durch unsere Beobachtung gestützt, dass *Serpinb2*^{-/-} Mäuse 24 Stunden nach Beginn der Antibiotikatherapie höhere C5a-Spiegel, aber niedrigere IL-10 Konzentrationen im Gehirn als WT Mäuse aufwiesen. Frühere Arbeiten unserer und anderer Gruppen haben gezeigt, dass C5a ein entscheidender „Motor“ der Entzündungsreaktion in der

Diskussion

Pneumokokken-Meningitis ist, während IL-10 ein wichtiger Antagonist zu sein scheint (Koedel et al., 1996; Woehrl et al., 2011). Die veränderte Expression von C5a und IL-10 führt wahrscheinlich zu einem Ungleichgewicht des Immunsystems zugunsten eines anhaltenden proinflammatorischen Zustands. Welchen Anteil die verstärkte Entzündungsreaktion und welchen Anteil die verstärkte Fibrinolyse aufgrund des PAI-2 Mangels an der Entwicklung von Hirnblutungen haben, ist jedoch unklar.

Ebensowenig ist bekannt, wie PAI-2 die C5a- und IL-10-Expression im Hirn beeinflusst. In myeloischen Zellen wird die IL-10 Produktion durch verschiedene Signale, die den Mustererkennungsrezeptoren nachgeschaltet sind, sowie durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , ausgelöst (Manzanillo et al., 2015; Ouyang & O'Garra, 2019). Während der Pneumokokken-Meningitis werden große Mengen an IL-1 β produziert und freigesetzt (Grandgirard et al., 2013). Eine Beeinträchtigung und damit reduzierte IL-1 β Produktion führt zu einer mildereren Immunantwort und einem besseren Outcome (Hoegen et al., 2011). In letzter Zeit konnte gezeigt werden, dass die PAI-2 Expression in Makrophagen die IL-1 β Produktion unterdrücken kann, vermutlich durch eine verstärkte Autophagie mit vermehrtem NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3)-Abbau, was zu einer geringeren Aktivierung von Caspase-1 führt (Manzanillo et al., 2015; Ouyang & O'Garra, 2019). In unseren *in vivo* und *in vitro* Experimenten, jedoch, hatte die PAI-2 Defizienz keinen Einfluss auf die IL-1 β -Produktion/Sekretion. Die geringere IL-10-Produktion in Abwesenheit von PAI-2 scheint also nicht mit einer geringeren IL-1 β -Produktion zusammenzuhängen. Folglich scheint die Reduktion von IL-10 auf einem IL-1 β unabhängigen Mechanismus zu beruhen, der noch aufgeklärt werden muss.

Die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin wird durch die Verfügbarkeit von Plasminogenaktivatoren und deren Inhibitoren wie PAI-2 streng kontrolliert. Plasmin ist das einzige Enzym, das in der Lage ist, C5 mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie die C5 Konvertase zu spalten (Leung & Morser, 2016) und dabei das biologisch aktive C5a zu generieren (Amara et al., 2010; Foley et al., 2016). Dementsprechend könnte ein PAI-2 Mangel während der Pneumokokken-Meningitis zu einer erhöhten Plasminaktivität und damit zu einer erhöhten C5a-Produktion führen. Dieser Mechanismus könnte zu einem anhaltenden proinflammatorischen Zustand beitragen, der eine verstärkte perivaskuläre Entzündung, vermehrte Hirnblutungen und eine geringere Überlebensrate verursacht.

5.2.4 Einschränkungen dieser Arbeit im Rahmen der Untersuchungen zu PAI-2

Wir konnten zeigen, dass *Serpinb2*^{-/-} Mäuse einen eindeutigen Krankheitsphänotyp in der Pneumokokken-Meningitis aufweisen, der mit einer erhöhten perivaskulären, neutrophilen Infiltration und stärkeren Blutungen einhergeht. Diese Beobachtungen passen zu den zuvor diskutierten Konzepten einer immunregulatorischen Rolle von PAI-2 im Rahmen von pathophysiologischen Zuständen. Diese Arbeit weist ein paar Einschränkungen auf.

Erstens konnten wir zwar die pathologischen Veränderungen mit Veränderungen der C5a- und IL-10-Konzentrationen im Gehirn in Verbindung bringen, waren aber nicht in der Lage, den zugrunde liegenden Mechanismus dieser Veränderungen zu erklären. Darüber hinaus wurden in den Tierversuchen nur Tiere, die die vollen 48 Stunden überlebten, auf klinische Punktzahl, Gewichtsverlust, Temperatur, Erkundungsverhalten, Anzahl der weißen Blutkörperchen im Liquor, bakterielle Kleinhirntiter und Konzentrationen von Zytokinen untersucht. Da davon ausgegangen werden kann, dass verstorbene Mäuse bei den meisten (oder allen) dieser Parameter stärker beeinträchtigt sind, könnten relevante klinische Merkmale der Meningitis bei PAI-2-defizienten Mäusen übersehen worden sein, da die Anzahl zu gering war, um statistisch signifikante Unterschiede aufzuzeigen (siehe hierzu auch Punkt 5.1.3). Schließlich haben wir die Fibrinolyse durch Messung der u-PA-, t-PA- und Plasmin-Aktivität nicht quantifiziert, da uns dafür keine ausreichenden Probenmengen (weder Blut noch Hirngewebe noch Liquor) zur Verfügung standen.

6 Zusammenfassung

Die Pneumokokken-Meningitis ist eine der schwerwiegendsten Erkrankung des ZNS und geht immer noch mit einer hohen Letalität sowie neurologischen Folgeschäden einher (Buchholz et al., 2016; Lucas et al., 2016; van de Beek, Brouwer, et al., 2016). Um an neuen adjuvanten Therapieansätzen forschen zu können, muss die genaue Pathophysiologie der Pneumokokken-Meningitis bekannt sein. Das Ziel dieser Arbeit war es folglich pathophysiologische Vorgänge während der Pneumokokken-Meningitis zu untersuchen und somit zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden beizutragen. Dafür wurde die Bedeutung der Perizyten und die Rolle von PAI-2 im Rahmen der experimentellen Pneumokokken-Meningitis untersucht.

6.1 Die Rolle von Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis

Die Pneumokokken-Meningitis löst eine massive Entzündungsreaktion im ZNS aus, die letztendlich zu meningitisassoziierten Gewebeschädigungen im Gehirn beiträgt (Koedel et al., 2009; Pfister et al., 1999). Es besteht weiterhin Unklarheit über die zellulären Auslöser dieser Entzündungsreaktion. Postkapilläre Venolen im Subarachnoidalraum sind die primäre Eintrittsstelle für Pneumokokken und Leukozyten in das ZNS (Coureuil et al., 2017; Gradstedt et al., 2013; Hyun & Hong, 2017; Iovino et al., 2017; Lorenzl et al., 1993; Wilson et al., 2010). Sie bestehen aus spezialisierten Endothelzellen und Perizyten, die in der Basalmembran eingebettet und von einem flüssigkeitsgefüllten Raum umgeben sind, der wiederum von Immunzellen wie Makrophagen und Mastzellen besiedelt ist (Brendecke & Prinz, 2015; Harrison-Brown et al., 2016; Liebner et al., 2018; Owens et al., 2008). Bisherige Studien zeigten keine oder nur geringe Effekte einer Mastzelldefizienz oder Makrophagendepletion in Tiermodellen der Pneumokokken-Meningitis (Fritscher et al., 2018; Polfliet et al., 2001; Trostdorf et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Zellen innerhalb des perivaskulären Raums zur Immunaktivierung beitragen könnten.

Für die Untersuchungen wurden folgende Methoden verwendet: (i) *In vitro* Zellkulturversuche mit primären, murinen und humanen Perizyten, (ii) ein Zebrafischmodell der Pneumokokken-Meningitis (Jim et al., 2016) sowie (iii) ein etabliertes Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis (Hoegen et al., 2011).

Die Experimente führten zu folgenden zentralen Befunden:

Zusammenfassung

- 1) Perizyten können *in vitro* bei einer Stimulation mit *S. pneumoniae* ausgewählte Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-6 freisetzen. Hohe *S.pneumoniae*-Konzentrationen wirken auf die isolierten Perizyten zytotoxisch. Dabei scheinen, zumindest in der Maus, TLR-2 und endosomale TLR als Mustererkennungsrezeptoren zu fungieren. Die Reaktion der Perizyten scheint überdies unabhängig vom Serotyp, aber abhängig vom bakteriellen Toxin Pneumolysin zu sein.
- 2) Eine pharmakologische Perizytendepletion im Zebrafisch Embryo-Modell ging mit einer erhöhten Mortalität der PM einher. Pathophysiologisch könnte dies auf einer verstärkten Hirnödementwicklung beruhen.
- 3) Im Mausmodell der PM zeigten Mäuse nach einer pharmakologisch-genetischen Perizytendepletion einen ungünstigeren Krankheitsverlauf und eine ausgeprägtere Blut-Hirn-Schranke-Störung (im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen). Diese Veränderungen gingen mit einer verstärkten Entzündungsreaktion einher, die sich in einer vermehrten Leukozyteninfiltration und Chemokin-Expression manifestierte.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass unsere Daten auf eine bedeutende Rolle der Perizyten in der Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis hinweisen, insbesondere bei der Regulierung der Leukozyten-Rekrutierung und der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke-Integrität (**Abbildung 27**).

Zusammenfassung

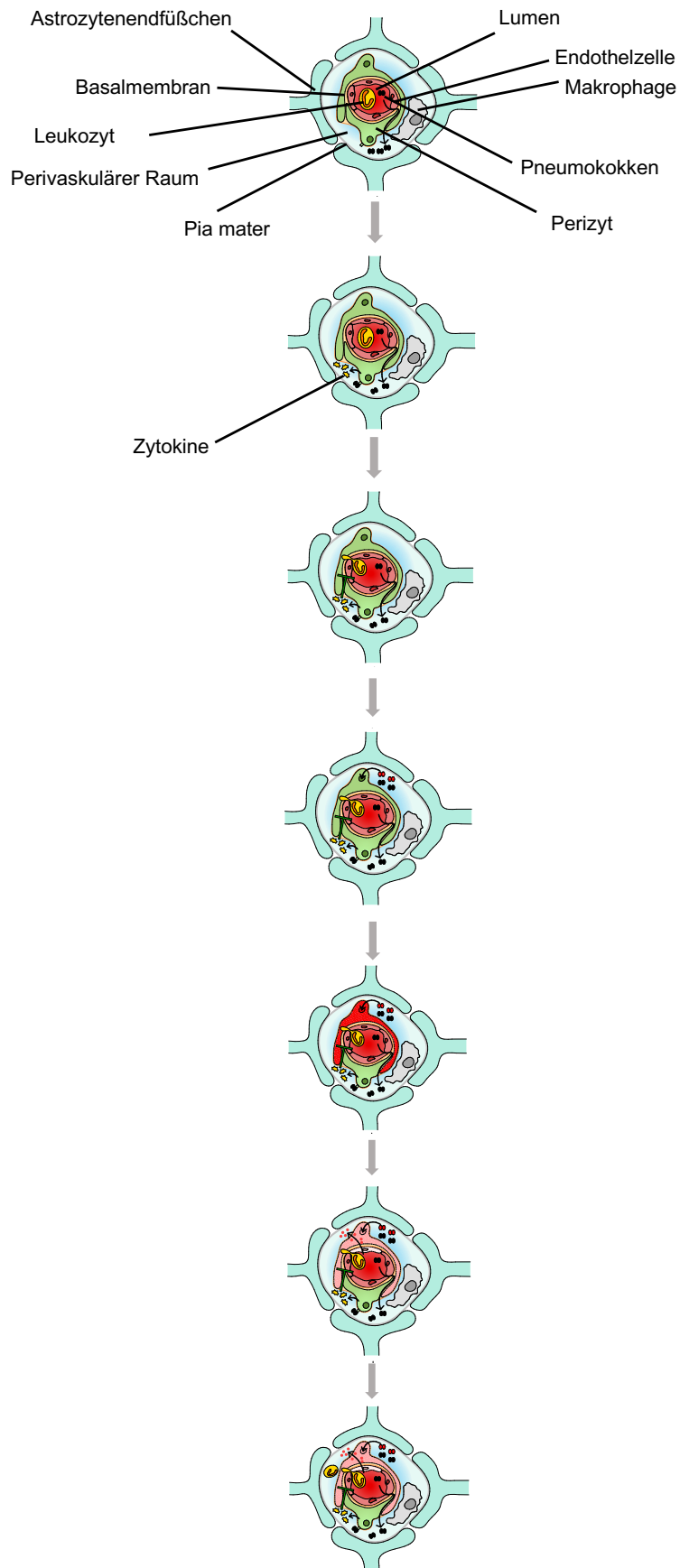


Abbildung 27: Hypothese zur Rolle der Perizyten in der Pneumokokken-Meningitis. Pneumokokken infizieren den perivaskulären Raum und werden von Perizyten über Mustererkennungsrezeptoren erkannt. Diese setzen Faktoren

Zusammenfassung

frei, welche normalerweise die Leukozytenrekrutierung in den perivaskulären Raum verhindern. Hohe *S.pneumoniae*-Konzentrationen wirken jedoch auf Perizyten zytotoxisch. Es kommt zum Absterben von Perizyten und Untergang der Blut-Hirn-Schranke. Dadurch werden vermehrt Leukozyten in den perivaskulären Raum rekrutiert und es kommt zu verstärkter Entzündungsreaktion und damit einhergehend zu Meningitis-assoziierten Gewebeschädigung. (Eigene Darstellung in Anlehnung an Rustenhoven et al., 2017 und Cao et al., 2021; erstellt von R. Hees).

6.2 Die Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis

Die Pneumokokken-Meningitis geht mit einer Dysregulation der Gerinnungskaskade und Fibrinolyse einher, was zu Thromboembolien, Blutungen und disseminierter intravasaler Koagulation führen und somit bestimmend für den Krankheitsverlauf sein kann (Pfister et al., 1992; Schut et al., 2012). In der Vergangenheit konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine dramatische Erhöhung der zerebralen PAI-2-Expression während einer murinen Pneumokokken-Meningitis beschreiben (Paul et al., 2005). PAI-2 wird eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben, die von einem klassischen Serpin bis hin zu einem Regulator des Inflammasoms oder der Komplementaktivierung reichen; seine genaue funktionelle Rolle gilt bis heute als weitgehend ungelöst (Medcalf & Stasinopoulos, 2005).

Für die Untersuchungen wurden folgende Methoden verwendet: (i) *in vitro* Zellkulturversuche mit PAI-2 defizienten BMDM und (ii) Untersuchungen an PAI-2-defizienten Mäusen.

Die Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1) PAI-2 wird während einer murinen Pneumokokken-Meningitis in den Liquor und ins Blut freigesetzt. Bei immunhistochemischen Analysen fanden sich PAI-2-positive Zellen vor allem in den Leukozyten-Infiltraten im leptomeningealen Raum und in den Ventrikeln.
- 2) PAI-2-defiziente Mäuse wiesen eine höhere Mortalität und eine höhere Anzahl an zerebralen Blutungen auf. Außerdem zeigten PAI-2-defiziente Mäuse eine stärkere Immunreaktivität gegen MRP-14, einen Marker für neutrophile Granulozyten.
- 3) In Hirnhomogenaten von PAI-2-defizienten Mäusen fanden sich bei der PM höhere C5a- und niedrigere IL-10-Konzentrationen als bei entsprechenden WT-Mäusen.
- 4) In WT BMDM wurde eine erhöhte Expression von PAI-2 bei einer Stimulation mit *S. pneumoniae* beobachtet. Diese ging mit einer vermehrten Freisetzung von PAI-2 in den Zellkulturüberstand einher. In Übereinstimmung mit den *in vivo*-Befunden zeigten

PAI-2-defiziente BMDM eine niedrigere IL-10 Freisetzung bei einer Stimulation mit *S. pneumoniae* als WT-Zellen.

Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass PAI-2 eine entzündungshemmende Rolle bei der Pneumokokken-Meningitis spielt. Diese Aussage basiert auf unseren Beobachtungen von gesteigerten C5a- und verminderten IL-10-Konzentrationen in PAI-2-defizienten Mäusen. Diese Veränderungen sind mit einer verstärkten Neutrophileninfiltration, vermehrten Hirnblutungen und einer erhöhten Sterblichkeitsrate assoziiert (**Abbildung 28**).

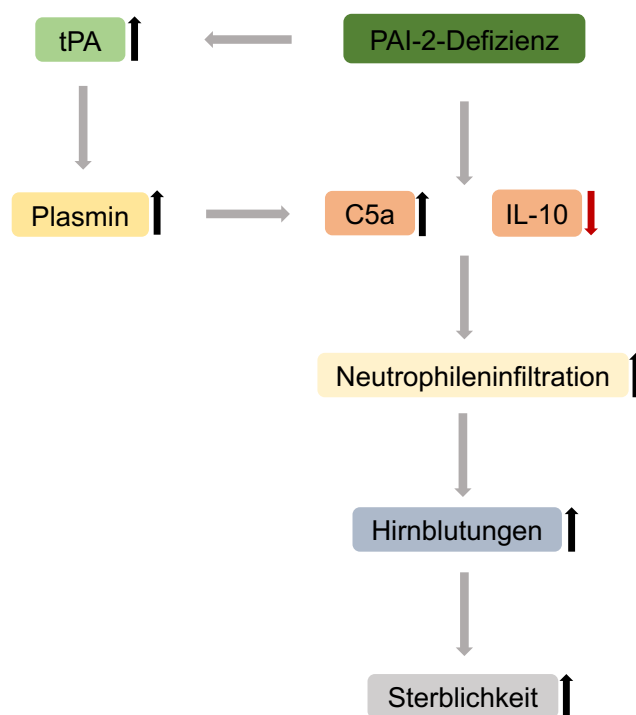


Abbildung 28: Hypothese zur Rolle von PAI-2 in der Pneumokokken-Meningitis. PAI-2-Defizienz geht mit erhöhter C5a- und verminderter IL-10 Freisetzung einher. Die vermehrte C5a Konzentration beruht auf eine vermehrte Plasmin Bildung. Daraufhin kommt es zu einer verstärkten Neutrophileninfiltration, vermehrten Hirnblutungen und letztendlich eine erhöhten Sterblichkeit. (Eigene Darstellung).

7 Ausblick

7.1 Perizyten – Zukünftige Projekte

In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass Perizyten eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis spielen und an der Regulierung der Leukozyten-Rekrutierung sowie an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke-Integrität beteiligt sind. Zukünftige Experimente könnten die Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen im Rahmen der Meningitis-assoziierten Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität im Detail analysieren. Im Jahr 2022 konnten Ayloo et al. zeigen, dass Perizyten über Vitronectin, einem extrazellulären Protein und dessen Interaktion mit dem Integrin- α 5-Rezeptor auf den Endothelzellen, in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranken Durchlässigkeit zu regulieren (Ayloo et al., 2022). Ob dieser Mechanismus auch in der Pneumokokken-Meningitis eine Rolle spielt, ist bisher nicht bekannt. Des Weiteren sollten die Auswirkungen einer lokalen oder systemischen Verabreichung des Wachstumsfaktors PDGFB in experimentellen Pneumokokken-Meningitis-Modellen untersucht werden. Dieser Ansatz zeigte in anderen Modellen einen protektiven Effekt auf die Perizytenpopulation. Es ist vorstellbar, dass dieser Behandlungsansatz auch die Perizytenpopulation während einer PM schützen und folglich zu einem besseren klinischen Verlauf dieser Krankheit führen kann (Vazquez-Liebanas et al., 2022). In dieser Arbeit haben wir die Perizytenpopulation bei der PM im Zebrafisch Embryo-Modell mit Hilfe der CLSM nur zu einem bestimmten Zeitpunkt untersucht. Es wäre aufschlussreich *in vivo* Echtzeit- Bilder von *TgBAC(pdgfrb:EGFP/Tg(flila:Myr-mCherry)* Zebrafisch Embryos im Verlauf einer PM zu erhalten und somit herauszufinden, ob es in diesem Modell vornehmlich zu einem Untergang der Zellen oder zu einer Veränderung ihrer Lokalisation und/oder Morphologie kommt. Dabei könnte man das von Jim et al. beschriebene und auch in dieser Arbeit verwendete Modellsystem nutzen (Jim et al., 2016).

7.2 PAI-2 – Eine potenzielle Behandlung in der Pneumokokken-Meningitis?

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass PAI-2 eine entzündungshemmende Funktion in der Pneumokokken-Meningitis einnimmt und bei PAI-2 Mangel eine inflammatorische Imbalance mit erhöhter Mortalität durch Hirnblutungen resultiert. SerpinB2 konnte bereits als potenzielle Behandlung in einem murinen Schlaganfall-Modell getestet werden (Buchthal et al., 2018). Dabei konnte gezeigt werden, dass durch intranasale Verabreichung von SerpinB2 das Infarktvolume reduziert werden konnte. Es gibt jedoch

Ausblick

bisher keine Daten zur Gabe von PAI-2 im Rahmen von ZNS Infektionen. Ein Behandlungsversuch mit PAI-2 könnte im murinen Pneumokokken-Meningitis-Modell zu einer Reduktion zerebrovaskulärer Komplikationen und folglich einem besseren klinischen Verlauf führen. Diese Hypothese sollte in zukünftigen Versuchsreihen überprüft werden.

8 Literaturverzeichnis

- Al-Horani, R. A. (2014). Serpin regulation of fibrinolytic system: implications for therapeutic applications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 12(2), 91-125. <https://doi.org/10.2174/1871525712666141106095927>
- Alarcon-Martinez, L., Yemisci, M., & Dalkara, T. (2021). Pericyte morphology and function. *Histol Histopathol*, 36(6), 633-643. <https://doi.org/10.14670/HH-18-314>
- Alcendor, D. J. (2019). Human Vascular Pericytes and Cytomegalovirus Pathobiology. *Int J Mol Sci*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061456>
- Amara, U., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Bruckner, U. B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J. D., & Huber-Lang, M. (2010). Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol*, 185(9), 5628-5636. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903678>
- Ando, K., Fukuhara, S., Izumi, N., Nakajima, H., Fukui, H., Kelsh, R. N., & Mochizuki, N. (2016). Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development*, 143(8), 1328-1339. <https://doi.org/10.1242/dev.132654>
- Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97(6), 512-523. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>
- Armulik, A., Genove, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21(2), 193-215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
- Armulik, A., Genove, G., Mae, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468(7323), 557-561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Artiaga, A., Herman, F., Arquizan, C., Thouvenot, E., Loubet, P., Le Moing, V., Picot, M. C., & Makinson, A. (2023). Cerebral vasculitis as a complication of pneumococcal meningitis: A cohort study. *Infect Dis Now*, 53(8), 104772. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2023.104772>
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(2), 451-455. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>
- Ayloo, S., Lazo, C. G., Sun, S., Zhang, W., Cui, B., & Gu, C. (2022). Pericyte-to-endothelial cell signaling via vitronectin-integrin regulates blood-CNS barrier. *Neuron*, 110(10), 1641-1655 e1646. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.02.017>
- Bachman, J. (2013). Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol*, 530, 67-74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Barichello, T., Generoso, J. S., Simoes, L. R., Goularte, J. A., Petronilho, F., Saigal, P., Badawy, M., & Quevedo, J. (2016). Role of Microglial Activation in the Pathophysiology of Bacterial Meningitis. *Mol Neurobiol*, 53(3), 1770-1781. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9107-4>
- Barkaway, A., Attwell, D., & Korte, N. (2022). Immune-vascular mural cell interactions: consequences for immune cell trafficking, cerebral blood flow, and the blood-brain barrier. *Neurophotonics*, 9(3), 031914. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.9.3.031914>
- Beckham, J. D., Tyler, K. L., & Idsa. (2006). Initial management of acute bacterial meningitis in adults: summary of IDSA guidelines. *Rev Neurol Dis*, 3(2), 57-60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819421>

- Benard, E. L., van der Sar, A. M., Ellett, F., Lieschke, G. J., Spaink, H. P., & Meijer, A. H. (2012). Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J Vis Exp*(61). <https://doi.org/10.3791/3781>
- Berg, S., Trollfors, B., Claesson, B. A., Alestig, K., Gothefors, L., Hugosson, S., Lindquist, L., Olcen, P., Romanus, V., & Strangert, K. (1996). Incidence and prognosis of meningitis due to *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 28(3), 247-252. <https://doi.org/10.3109/00365549609027166>
- Berk, R. S., Katar, M., Dong, Z., & Day, D. E. (2001). Plasminogen Activators and Inhibitors in the Corneas of Mice Infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(7), 1561-1567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381061>
- Bhowmick, S., D'Mello, V., Caruso, D., Wallerstein, A., & Abdul-Muneer, P. M. (2019). Impairment of pericyte-endothelium crosstalk leads to blood-brain barrier dysfunction following traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 317, 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.03.014>
- Bijlsma, M. W., Brouwer, M. C., Kasanmoentalib, E. S., Kloek, A. T., Lucas, M. J., Tanck, M. W., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2016). Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*, 16(3), 339-347. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00430-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00430-2)
- Brandtzaeg, P., Joo, G. B., Brusletto, B., & Kierulf, P. (1990). Plasminogen activator inhibitor 1 and 2, alpha-2-antiplasmin, plasminogen, and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *Thromb Res*, 57(2), 271-278. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90326-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90326-8)
- Braun, J. S., Sublett, J. E., Freyer, D., Mitchell, T. J., Cleveland, J. L., Tuomanen, E. I., & Weber, J. R. (2002). Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest*, 109(1), 19-27. <https://doi.org/10.1172/JCI12035>
- Brendecke, S. M., & Prinz, M. (2015). Do not judge a cell by its cover--diversity of CNS resident, adjoining and infiltrating myeloid cells in inflammation. *Semin Immunopathol*, 37(6), 591-605. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0520-6>
- Brouwer, M. C., Meijers, J. C., Baas, F., van der Ende, A., Pfister, H. W., Giese, A., van de Beek, D., & Koedel, U. (2014). Plasminogen activator inhibitor-1 influences cerebrovascular complications and death in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol*, 127(4), 553-564. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1216-4>
- Brouwer, M. C., Tunkel, A. R., & van de Beek, D. (2010). Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*, 23(3), 467-492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00070-09>
- Buchholz, G., Koedel, U., Pfister, H. W., Kastenbauer, S., & Klein, M. (2016). Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis. *Crit Care*, 20(1), 312. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1498-8>
- Buchthal, B., Weiss, U., & Bading, H. (2018). Post-injury Nose-to-Brain Delivery of Activin A and SerpinB2 Reduces Brain Damage in a Mouse Stroke Model. *Mol Ther*, 26(10), 2357-2365. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.018>
- Caporarello, N., Olivieri, M., Cristaldi, M., Scalia, M., Toscano, M. A., Genovese, C., Addamo, A., Salmeri, M., Lupo, G., & Anfusio, C. D. (2018). Blood-Brain Barrier in a *Haemophilus influenzae* Type a In Vitro Infection: Role of Adenosine Receptors A2A and A2B. *Mol Neurobiol*, 55(6), 5321-5336. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0769-y>
- Carpenter, R. R., & Petersdorf, R. G. (1962). The clinical spectrum of bacterial meningitis. *Am J Med*, 33, 262-275. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(62\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(62)90024-4)

- Carter, R. J., Morton, J., & Dunnett, S. B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 8*, Unit 8 12. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>
- Chang, C. Y., Li, J. R., Ou, Y. C., Lin, S. Y., Wang, Y. Y., Chen, W. Y., Hu, Y. H., Lai, C. Y., Chang, C. J., & Chen, C. J. (2017). Interplay of inflammatory gene expression in pericytes following Japanese encephalitis virus infection. *Brain Behav Immun, 66*, 230-243. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.003>
- Chekrouni, N., Koelman, D. L. H., Brouwer, M. C., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2021). Community-acquired Haemophilus influenzae meningitis in adults. *J Infect, 82*(5), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.03.016>
- Chen, C. J., Ou, Y. C., Li, J. R., Chang, C. Y., Pan, H. C., Lai, C. Y., Liao, S. L., Raung, S. L., & Chang, C. J. (2014). Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. *J Virol, 88*(2), 1150-1161. <https://doi.org/10.1128/JVI.02738-13>
- Cheng, J., Korte, N., Nortley, R., Sethi, H., Tang, Y., & Attwell, D. (2018). Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. *Acta Neuropathol, 136*(4), 507-523. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1893-0>
- Chi, N. C., Shaw, R. M., De Val, S., Kang, G., Jan, L. Y., Black, B. L., & Stainier, D. Y. (2008). Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation. *Genes Dev, 22*(6), 734-739. <https://doi.org/10.1101/gad.1629408>
- Chuang, S. Y., Yang, C. H., Chou, C. C., Chiang, Y. P., Chuang, T. H., & Hsu, L. C. (2013). TLR-induced PAI-2 expression suppresses IL-1beta processing via increasing autophagy and NLRP3 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(40), 16079-16084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306556110>
- Coureuil, M., Lecuyer, H., Bourdoulous, S., & Nassif, X. (2017). A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers. *Nat Rev Microbiol, 15*(3), 149-159. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.178>
- Coxon, A., Tang, T., & Mayadas, T. N. (1999). Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med, 190*(7), 923-934. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510082>
- Croucher, D. R., Saunders, D. N., Lobov, S., & Ranson, M. (2008). Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer, 8*(7), 535-545. <https://doi.org/10.1038/nrc2400>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature, 468*(7323), 562-566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- de Gans, J., van de Beek, D., & European Dexamethasone in Adulthood Bacterial Meningitis Study, I. (2002). Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med, 347*(20), 1549-1556. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021334>
- Deliran, S. S., Engelen-Lee, J. Y., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. (2021). Cerebral venous thrombosis in pneumococcal meningitis: An autopsy study. *Clin Neuropathol, 40*(3), 126-133. <https://doi.org/10.5414/NP301337>
- Deutzmann, R., Netzker, R., & Rassow, J. (2012). *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag.
- Ding, R., Hase, Y., Ameen-Ali, K. E., Ndung'u, M., Stevenson, W., Barsby, J., Gourlay, R., Akinyemi, T., Akinyemi, R., Uemura, M. T., Polvikoski, T., Mukaetova-Ladinska, E., Ihara, M., & Kalara, R. N. (2020). Loss of capillary pericytes and the blood-brain barrier in white matter in poststroke and vascular dementias and Alzheimer's disease. *Brain Pathol, 30*(6), 1087-1101. <https://doi.org/10.1111/bpa.12888>

- Dorrier, C. E., Jones, H. E., Pintaric, L., Siegenthaler, J. A., & Daneman, R. (2022). Emerging roles for CNS fibroblasts in health, injury and disease. *Nat Rev Neurosci*, 23(1), 23-34. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00525-w>
- Dougherty, K. M., Pearson, J. M., Yang, A. Y., Westrick, R. J., Baker, M. S., & Ginsburg, D. (1999). The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(2), 686-691. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.686>
- Dujardin, B. C., Driedijk, P. C., Roijers, A. F., & Out, T. A. (1985). The determination of the complement components C1q, C4 and C3 in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay. *J Immunol Methods*, 80(2), 227-237. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90024-9)
- Dyckhoff-Shen, S., Masouris, I., Islam, H., Hammerschmidt, S., Angele, B., Marathe, V., Buer, J., Volk, S., Pfister, H. W., Klein, M., Koedel, U., & Kirschning, C. J. (2024). Combining antibiotic with anti-TLR2/TLR13 therapy prevents brain pathology in pneumococcal meningitis. *JCI Insight*, 9(6). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.165737>
- Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A., & Lieschke, G. J. (2011). mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood*, 117(4), e49-56. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314120>
- Engelen-Lee, J. Y., Brouwer, M. C., Aronica, E., & van de Beek, D. (2016). Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path). *Acta Neuropathol Commun*, 4, 26. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0297-4>
- Engelen-Lee, J. Y., Brouwer, M. C., Aronica, E., & van de Beek, D. (2018). Delayed cerebral thrombosis complicating pneumococcal meningitis: an autopsy study. *Ann Intensive Care*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13613-018-0368-8>
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*, 31(4), 497-511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>
- Faraco, G., Park, L., Anrather, J., & Iadecola, C. (2017). Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 95(11), 1143-1152. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1573-x>
- Feil, S., Valtcheva, N., & Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol*, 530, 343-363. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_18
- Fernandez-Klett, F., Offenhauser, N., Dirnagl, U., Priller, J., & Lindauer, U. (2010). Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(51), 22290-22295. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011321108>
- Fernandez-Klett, F., Potas, J. R., Hilpert, D., Blazej, K., Radke, J., Huck, J., Engel, O., Stenzel, W., Genove, G., & Priller, J. (2013). Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(3), 428-439. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.187>
- Fischer, H., & Tomasz, A. (1984). Production and release of peptidoglycan and wall teichoic acid polymers in pneumococci treated with beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol*, 157(2), 507-513. <https://doi.org/10.1128/JB.157.2.507-513.1984>
- Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Brunner, N., Janicke, F., Meijer-van Gelder, M. E., Henzen-Logmans, S. C., van Putten, W. L., & Klijn, J. G. (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res*, 60(3), 636-643. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676647>
- Foley, J. H., Walton, B. L., Aleman, M. M., O'Byrne, A. M., Lei, V., Harrasser, M., Foley, K. A., Wolberg, A. S., & Conway, E. M. (2016). Complement Activation in Arterial and

- Venous Thrombosis is Mediated by Plasmin. *EBioMedicine*, 5, 175-182.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.011>
- Fritscher, J., Amberger, D., Dyckhoff, S., Bewersdorf, J. P., Masouris, I., Voelk, S., Hammerschmidt, S., Schmetzer, H. M., Klein, M., Pfister, H. W., & Koedel, U. (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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00550>
- Gerber, J., & Nau, R. (2010). Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*, 23(3), 312-318. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32833950dd>
- Gerl, K., Miquerol, L., Todorov, V. T., Hugo, C. P., Adams, R. H., Kurtz, A., & Kurt, B. (2015). Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney. *Kidney Int*, 88(6), 1345-1355. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.274>
- Ghosh, M., Balbi, M., Hellal, F., Dichgans, M., Lindauer, U., & Plesnila, N. (2015). Pericytes are involved in the pathogenesis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Ann Neurol*, 78(6), 887-900. <https://doi.org/10.1002/ana.24512>
- Giannoni, P., Badaut, J., Dargazanli, C., De Maudave, A. F., Klement, W., Costalat, V., & Marchi, N. (2018). The pericyte-glia interface at the blood-brain barrier. *Clin Sci (Lond)*, 132(3), 361-374. <https://doi.org/10.1042/CS20171634>
- Gil, E., Venturini, C., Stirling, D., Turner, C., Tezera, L. B., Ercoli, G., Baker, T., Best, K., Brown, J. S., & Noursadeghi, M. (2022). Pericyte derived chemokines amplify neutrophil recruitment across the cerebrovascular endothelial barrier. *Front Immunol*, 13, 935798. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.935798>
- Gil, E., Wall, E., Noursadeghi, M., & Brown, J. S. (2022). *Streptococcus pneumoniae* meningitis and the CNS barriers. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 1106596. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1106596>
- Giorgi Rossi, P., Mantovani, J., Ferroni, E., Forcina, A., Stanghellini, E., Curtale, F., & Borgia, P. (2009). Incidence of bacterial meningitis (2001-2005) in Lazio, Italy: the results of an integrated surveillance system. *BMC Infect Dis*, 9, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-13>
- Girbl, T., Lenn, T., Perez, L., Rolas, L., Barkaway, A., Thiriot, A., Del Fresno, C., Lynam, E., Hub, E., Thelen, M., Graham, G., Alon, R., Sancho, D., von Andrian, U. H., Voisin, M. B., Rot, A., & Nourshargh, S. (2018). Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis. *Immunity*, 49(6), 1062-1076 e1066. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.018>
- Gisch, N., Kohler, T., Ulmer, A. J., Muthing, J., Pribyl, T., Fischer, K., Lindner, B., Hammerschmidt, S., & Zahringer, U. (2013). Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J Biol Chem*, 288(22), 15654-15667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446963>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests*, 1-20.
- Gradstedt, H., Iovino, F., & Bijlsma, J. J. (2013). *Streptococcus pneumoniae* invades endothelial host cells via multiple pathways and is killed in a lysosome dependent manner. *PLoS One*, 8(6), e65626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065626>
- Grandgirard, D., Gaumann, R., Coulibaly, B., Dangy, J. P., Sie, A., Junghans, T., Schudel, H., Pluschke, G., & Leib, S. L. (2013). The causative pathogen determines the inflammatory profile in cerebrospinal fluid and outcome in patients with bacterial meningitis. *Mediators Inflamm*, 2013, 312476. <https://doi.org/10.1155/2013/312476>
- Grant, R. I., Hartmann, D. A., Underly, R. G., Berthiaume, A. A., Bhat, N. R., & Shih, A. Y. (2019). Organizational hierarchy and structural diversity of microvascular pericytes in

- adult mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 39(3), 411-425.
<https://doi.org/10.1177/0271678X17732229>
- Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L. C., Goode, J., Miething, C., Goktuna, S. I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., Van Rooijen, N., Xu, Y., O'Cain, T., Jaffee, B. B., Busch, D. H., Duyster, J., Schmid, R. M., Eckmann, L., & Karin, M. (2007). NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*, 130(5), 918-931.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.009>
- Griemert, E. V., Hedrich, J., Hirnet, T., & Thal, S. C. (2019). Deficiency of Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 Limits Brain Edema Formation after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 36(14), 2272-2278. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6126>
- Griemert, E. V., Recarte Pelz, K., Engelhard, K., Schafer, M. K., & Thal, S. C. (2019). PAI-1 but Not PAI-2 Gene Deficiency Attenuates Ischemic Brain Injury After Experimental Stroke. *Transl Stroke Res*, 10(4), 372-380. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0644-9>
- Guijarro-Munoz, I., Compte, M., Alvarez-Cienfuegos, A., Alvarez-Vallina, L., & Sanz, L. (2014). Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-kappaB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J Biol Chem*, 289(4), 2457-2468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521161>
- Haile, W. B., Coleman, J. L., & Benach, J. L. (2006). Reciprocal upregulation of urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-2, by *Borrelia burgdorferi* affects bacterial penetration and host-inflammatory response. *Cell Microbiol*, 8(8), 1349-1360. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00717.x>
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55-60.
<https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Harrison-Brown, M., Liu, G. J., & Banati, R. (2016). Checkpoints to the Brain: Directing Myeloid Cell Migration to the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, 17(12).
<https://doi.org/10.3390/ijms17122030>
- Hartmann, D. A., Underly, R. G., Grant, R. I., Watson, A. N., Lindner, V., & Shih, A. Y. (2015). Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics*, 2(4), 041402.
<https://doi.org/10.1117/1.NPh.2.4.041402>
- Hirst, R. A., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C. J., Nicotera, P., Andrew, P. W., & O'Callaghan, C. (2008). *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J Infect Dis*, 197(5), 744-751.
<https://doi.org/10.1086/527322>
- Hoegen, T., Tremel, N., Klein, M., Angele, B., Wagner, H., Kirschning, C., Pfister, H. W., Fontana, A., Hammerschmidt, S., & Koedel, U. (2011). The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol*, 187(10), 5440-5451.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100790>
- Hoffmann, O., Priller, J., Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Baeva, N., Lunemann, J. D., Aktas, O., Mahrhofer, C., Stricker, S., Zipp, F., & Weber, J. R. (2007). TRAIL limits excessive host immune responses in bacterial meningitis. *J Clin Invest*, 117(7), 2004-2013. <https://doi.org/10.1172/JCI30356>
- Hsu, H. E., Shutt, K. A., Moore, M. R., Beall, B. W., Bennett, N. M., Craig, A. S., Farley, M. M., Jorgensen, J. H., Lexau, C. A., Petit, S., Reingold, A., Schaffner, W., Thomas, A., Whitney, C. G., & Harrison, L. H. (2009). Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med*, 360(3), 244-256.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0800836>

- Hyun, Y. M., & Hong, C. W. (2017). Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J Leukoc Biol*, *102*(3), 617-629. <https://doi.org/10.1189/jlb.1RU1216-521R>
- Imohl, M., Moller, J., Reinert, R. R., Perniciaro, S., van der Linden, M., & Aktas, O. (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. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0787-1>
- Impfkommission, S. (2023). Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert Koch-Institut 2023. *Epidemiologisches Bulletin*(4), 3--68.
- Iovino, F., Engelen-Lee, J. Y., Brouwer, M., van de Beek, D., van der Ende, A., Valls Seron, M., Mellroth, P., Muschiol, S., Bergstrand, J., Widengren, J., & Henriques-Normark, B. (2017). pIgR and PECAM-1 bind to pneumococcal adhesins RrgA and PspC mediating bacterial brain invasion. *J Exp Med*, *214*(6), 1619-1630. <https://doi.org/10.1084/jem.20161668>
- Irigoyen, J. P., Munoz-Canoves, P., Montero, L., Koziczak, M., & Nagamine, Y. (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci*, *56*(1-2), 104-132. <https://doi.org/10.1007/pl00000615>
- Ismail, A. A., Shaker, B. T., & Bajou, K. (2021). The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. *Int J Mol Sci*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010337>
- Ivanova, A., Signore, M., Caro, N., Greene, N. D., Copp, A. J., & Martinez-Barbera, J. P. (2005). In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A. *Genesis*, *43*(3), 129-135. <https://doi.org/10.1002/gene.20162>
- Iwaki, T., Urano, T., & Umemura, K. (2012). PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol*, *157*(3), 291-298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09074.x>
- Jaiswal, R. K., Varshney, A. K., & Yadava, P. K. (2018). Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomed Pharmacother*, *98*, 886-898. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.029>
- Jansson, D., Rustenhoven, J., Feng, S., Hurley, D., Oldfield, R. L., Bergin, P. S., Mee, E. W., Faull, R. L., & Dragunow, M. (2014). A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, *11*, 104. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-104>
- Jim, K. K., Engelen-Lee, J., van der Sar, A. M., Bitter, W., Brouwer, M. C., van der Ende, A., Veening, J. W., van de Beek, D., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2016). Infection of zebrafish embryos with live fluorescent *Streptococcus pneumoniae* as a real-time pneumococcal meningitis model. *J Neuroinflammation*, *13*(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0655-y>
- Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*, *17*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kalin, R. E., Cai, L., Li, Y., Zhao, D., Zhang, H., Cheng, J., Zhang, W., Wu, Y., Eisenhut, K., Janssen, P., Schmitt, L., Enard, W., Michels, F., Fluh, C., Hou, M., Kirchleitner, S. V., Siller, S., Schiemann, M., Andra, I., . . . Glass, R. (2021). TAMEP are brain tumor parenchymal cells controlling neoplastic angiogenesis and progression. *Cell Syst*, *12*(3), 248-262 e247. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2021.01.002>
- Kastenbauer, S., & Pfister, H. W. (2003). Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain*, *126*(Pt 5), 1015-1025. <https://doi.org/10.1093/brain/awg113>
- Kim, J. A., Tran, N. D., Li, Z., Yang, F., Zhou, W., & Fisher, M. J. (2006). Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, *26*(2), 209-217. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600181>

- Kim, N. D., & Luster, A. D. (2015). The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol*, 36(9), 547-555. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.07.007>
- Klein, M., Koedel, U., & Pfister, H. W. (2006). Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol*, 80(6), 269-280. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.008>
- Klein, M., Koedel, U., Pfister, H. W., & Kastenbauer, S. (2003). Morphological correlates of acute and permanent hearing loss during experimental pneumococcal meningitis. *Brain Pathol*, 13(2), 123-132. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00012.x>
- Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H.-W., Wagner, H., Koedel, U., & Kirschning, C. J. (2008). Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of infectious diseases*, 198(7), 1028-1036.
- Klein, M., Paul, R., Angele, B., Popp, B., Pfister, H. W., & Koedel, U. (2006). Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis. *Microbes Infect*, 8(4), 974-983. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.013>
- Koedel, U., Bernatowicz, A., Frei, K., Fontana, A., & Pfister, H. W. (1996). Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol*, 157(11), 5185-5191. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943431>
- Koedel, U., Frankenberg, T., Kirschnek, S., Obermaier, B., Hacker, H., Paul, R., & Hacker, G. (2009). Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog*, 5(5), e1000461. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000461>
- Koedel, U., Klein, M., & Pfister, H. W. (2010). New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*, 23(3), 217-223. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328337f49e>
- Koedel, U., Paul, R., Winkler, F., Kastenbauer, S., Huang, P. L., & Pfister, H. W. (2001). Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(11), 1041-1050. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.11.1041>
- Koedel, U., Rupprecht, T., Angele, B., Heesemann, J., Wagner, H., Pfister, H. W., & Kirschning, C. J. (2004). MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain*, 127(Pt 6), 1437-1445. <https://doi.org/10.1093/brain/awh171>
- Koedel, U., Scheld, W. M., & Pfister, H. W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis*, 2(12), 721-736. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00450-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00450-4)
- Koedel, U., Winkler, F., Angele, B., Fontana, A., Flavell, R. A., & Pfister, H. W. (2002). Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. *Ann Neurol*, 51(3), 319-329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891827>
- Koelman, D. L. H., Brouwer, M. C., Ter Horst, L., Bijlsma, M. W., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2022). Pneumococcal Meningitis in Adults: A Prospective Nationwide Cohort Study Over a 20-year Period. *Clin Infect Dis*, 74(4), 657-667. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab477>
- Koelman, D. L. H., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. (2020). Resurgence of pneumococcal meningitis in Europe and Northern America. *Clin Microbiol Infect*, 26(2), 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.032>
- Kohler, S., Voss, F., Gomez Mejia, A., Brown, J. S., & Hammerschmidt, S. (2016). Pneumococcal lipoproteins involved in bacterial fitness, virulence, and immune evasion. *FEBS Lett*, 590(21), 3820-3839. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12352>

- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, *13*(3), 159-175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kovac, A., Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2011). Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*, *8*, 139. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-139>
- Kristensson, K., & Olsson, Y. (1973). Accumulation of protein tracers in pericytes of the central nervous system following systemic injection in immature mice. *Acta Neurol Scand*, *49*(2), 189-194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4124019>
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., & Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*, *11*(3), e1004651. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
- Kruithof, E. K., Vassalli, J. D., Schleuning, W. D., Mattaliano, R. J., & Bachmann, F. (1986). Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem*, *261*(24), 11207-11213. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3090045>
- Kurz, C., Walker, L., Rauchmann, B. S., & Perneczky, R. (2022). Dysfunction of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease: Evidence from human studies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *48*(3), e12782. <https://doi.org/10.1111/nan.12782>
- Leib, S. L., Leppert, D., Clements, J., & Tauber, M. G. (2000). Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun*, *68*(2), 615-620. <https://doi.org/10.1128/iai.68.2.615-620.2000>
- Letiembre, M., Hao, W., Liu, Y., Walter, S., Mihaljevic, I., Rivest, S., Hartmann, T., & Fassbender, K. (2007). Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience*, *146*(1), 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.004>
- Leung, L. L., & Morser, J. (2016). Plasmin as a complement C5 convertase. *EBioMedicine*, *5*, 20-21. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.015>
- Li, S., Wei, X., He, J., Tian, X., Yuan, S., & Sun, L. (2018). Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomed Pharmacother*, *105*, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.119>
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & Constantin, G. (2018). Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*, *135*(3), 311-336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Lindberg, P., Baker, M. S., & Kinnby, B. (2001). The localization of the relaxed form of plasminogen activator inhibitor type 2 in human gingival tissues. *Histochem Cell Biol*, *116*(5), 447-452. <https://doi.org/10.1007/s00418-001-0341-7>
- Liu, Q., Radwanski, R., Babadjouni, R., Patel, A., Hodis, D. M., Baumbacher, P., Zhao, Z., Zlokovic, B., & Mack, W. J. (2019). Experimental chronic cerebral hypoperfusion results in decreased pericyte coverage and increased blood-brain barrier permeability in the corpus callosum. *J Cereb Blood Flow Metab*, *39*(2), 240-250. <https://doi.org/10.1177/0271678X17743670>
- Lobov, S., Croucher, D. R., Saunders, D. N., & Ranson, M. (2008). Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits cell surface associated tissue plasminogen activator in vitro: potential receptor interactions. *Thromb Haemost*, *100*(2), 319-329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690354>
- Lopez-Atalaya, J. P., Askew, K. E., Sierra, A., & Gomez-Nicola, D. (2018). Development and maintenance of the brain's immune toolkit: Microglia and non-parenchymal brain macrophages. *Dev Neurobiol*, *78*(6), 561-579. <https://doi.org/10.1002/dneu.22545>
- Lorenzl, S., Koedel, U., Dirnagl, U., Ruckdeschel, G., & Pfister, H. W. (1993). Imaging of leukocyte-endothelium interaction using in vivo confocal laser scanning microscopy

- during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*, 168(4), 927-933. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690826>
- Lucas, M. J., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. (2016). Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect*, 73(1), 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.009>
- Madoiwa, S., Nunomiya, S., Ono, T., Shintani, Y., Ohmori, T., Mimuro, J., & Sakata, Y. (2006). Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol*, 84(5), 398-405. <https://doi.org/10.1532/IJH97.05190>
- Mae, M. A., He, L., Nordling, S., Vazquez-Liebanas, E., Nahar, K., Jung, B., Li, X., Tan, B. C., Chin Foo, J., Cazenave-Gassiot, A., Wenk, M. R., Zarb, Y., Lavina, B., Quaggin, S. E., Jeansson, M., Gu, C., Silver, D. L., Vanlandewijck, M., Butcher, E. C., . . . Betsholtz, C. (2021). Single-Cell Analysis of Blood-Brain Barrier Response to Pericyte Loss. *Circ Res*, 128(4), e46-e62. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317473>
- Major, L. D., Partridge, T. S., Gardner, J., Kent, S. J., de Rose, R., Suhrbier, A., & Schroder, W. A. (2013). Induction of SerpinB2 and Th1/Th2 modulation by SerpinB2 during lentiviral infections in vivo. *PLoS One*, 8(2), e57343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057343>
- Manaenko, A., Chen, H., Kammer, J., Zhang, J. H., & Tang, J. (2011). Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*, 195(2), 206-210. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.013>
- Manzanillo, P., Eidenschenk, C., & Ouyang, W. (2015). Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10 family cytokines in intestinal immunity. *Trends Immunol*, 36(8), 471-478. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.003>
- Matsumoto, J., Takata, F., Machida, T., Takahashi, H., Soejima, Y., Funakoshi, M., Futagami, K., Yamauchi, A., Dohgu, S., & Kataoka, Y. (2014). Tumor necrosis factor-alpha-stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett*, 578, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.06.052>
- Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 9, 181-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
- McGreal, E. P., Miller, J. L., & Gordon, S. (2005). Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*, 17(1), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.12.001>
- Medcalf, R. L., & Stasinopoulos, S. J. (2005). The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *FEBS J*, 272(19), 4858-4867. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04879.x>
- Medina-Flores, F., Hurtado-Alvarado, G., Deli, M. A., & Gomez-Gonzalez, B. (2023). The Active Role of Pericytes During Neuroinflammation in the Adult Brain. *Cell Mol Neurobiol*, 43(2), 525-541. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01208-5>
- Meli, D. N., Loeffler, J. M., Baumann, P., Neumann, U., Buhl, T., Leppert, D., & Leib, S. L. (2004). In pneumococcal meningitis a novel water-soluble inhibitor of matrix metalloproteinases and TNF-alpha converting enzyme attenuates seizures and injury of the cerebral cortex. *J Neuroimmunol*, 151(1-2), 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.01.026>
- Mildner, A., Djukic, M., Garbe, D., Wellmer, A., Kuziel, W. A., Mack, M., Nau, R., & Prinz, M. (2008). Ly-6G+CCR2- myeloid cells rather than Ly-6ChighCCR2+ monocytes are required for the control of bacterial infection in the central nervous system. *J Immunol*, 181(4), 2713-2722. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684962>

- Mirlashari, M. R., Hoiby, E. A., Holst, J., & Lyberg, T. (2001). Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*: effects on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production in human monocytes. *Thromb Res*, *102*(4), 375-380. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(01\)00256-0](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(01)00256-0)
- Mitchell, T. J. (2000). Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol*, *151*(6), 413-419. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00175-3](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00175-3)
- Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T., & van de Beek, D. (2011). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev*, *24*(3), 557-591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-11>
- Moscato, M., & Claverys, J. P. (2004). Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol*, *54*(3), 783-794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04305.x>
- Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2004). The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology*, *209*(1-2), 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.02.004>
- Mukhopadhyay, S., Johnson, T. A., Sarkar, R., & Antalis, T. M. (2018). Serpins in Venous Thrombosis and Venous Thrombus Resolution. *Methods Mol Biol*, *1826*, 197-211. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8645-3_13
- Murfee, W. L., Skalak, T. C., & Peirce, S. M. (2005). Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation*, *12*(2), 151-160. <https://doi.org/10.1080/10739680590904955>
- Nakagawa, S., Castro, V., & Toborek, M. (2012). Infection of human pericytes by HIV-1 disrupts the integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Mol Med*, *16*(12), 2950-2957. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01622.x>
- Navarro, R., Delgado-Wicke, P., Nunez-Prado, N., Compte, M., Blanco-Toribio, A., Nunez, G., Alvarez-Vallina, L., & Sanz, L. (2016). Role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in pericyte-mediated vascular inflammation. *J Cell Mol Med*, *20*(5), 980-986. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12804>
- Niederhorn, J. Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol*, *7*(4), 354-359. <https://doi.org/10.1038/ni1328>
- Nikolakopoulou, A. M., Montagne, A., Kisler, K., Dai, Z., Wang, Y., Huuskonen, M. T., Sagare, A. P., Lazic, D., Sweeney, M. D., Kong, P., Wang, M., Owens, N. C., Lawson, E. J., Xie, X., Zhao, Z., & Zlokovic, B. V. (2019). Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nat Neurosci*, *22*(7), 1089-1098. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0434-z>
- Nishioku, T., Dohgu, S., Takata, F., Eto, T., Ishikawa, N., Kodama, K. B., Nakagawa, S., Yamauchi, A., & Kataoka, Y. (2009). Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol*, *29*(3), 309-316. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9322-x>
- Nyul-Toth, A., Kozma, M., Nagyoszi, P., Nagy, K., Fazakas, C., Hasko, J., Molnar, K., Farkas, A. E., Vegh, A. G., Varo, G., Galajda, P., Wilhelm, I., & Krizbai, I. A. (2017). Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes. *Brain Behav Immun*, *64*, 220-231. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.010>
- Ogura, S., Kurata, K., Hattori, Y., Takase, H., Ishiguro-Oonuma, T., Hwang, Y., Ahn, S., Park, I., Ikeda, W., Kusuhara, S., Fukushima, Y., Nara, H., Sakai, H., Fujiwara, T., Matsushita, J., Ema, M., Hirashima, M., Minami, T., Shibuya, M., . . . Uemura, A. (2017). Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-

- retina barrier breakdown. *JCI Insight*, 2(3), e90905.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.90905>
- Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4), 871-891.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
- Owens, T., Bechmann, I., & Engelhardt, B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(12), 1113-1121.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818f9ca8>
- Paramo, J. A., Perez, J. L., Serrano, M., & Rocha, E. (1990). Types 1 and 2 plasminogen activator inhibitor and tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis. *Thromb Haemost*, 64(1), 3-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2274926>
- Park, J. M., Greten, F. R., Wong, A., Westrick, R. J., Arthur, J. S., Otsu, K., Hoffmann, A., Montminy, M., & Karin, M. (2005). Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*, 23(3), 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.010>
- Paul, R., Winkler, F., Bayerlein, I., Popp, B., Pfister, H. W., & Koedel, U. (2005). Urokinase-type plasminogen activator receptor regulates leukocyte recruitment during experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*, 191(5), 776-782.
<https://doi.org/10.1086/427829>
- Persidsky, Y., Hill, J., Zhang, M., Dykstra, H., Winfield, M., Reichenbach, N. L., Potula, R., Mukherjee, A., Ramirez, S. H., & Rom, S. (2016). Dysfunction of brain pericytes in chronic neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(4), 794-807.
<https://doi.org/10.1177/0271678X15606149>
- Pfister, H. W., Borasio, G. D., Dirnagl, U., Bauer, M., & Einhaupl, K. M. (1992). Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology*, 42(8), 1497-1504. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.8.1497>
- Pfister, H. W., Feiden, W., & Einhaupl, K. M. (1993). Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol*, 50(6), 575-581. <https://doi.org/10.1001/archneur.1993.00540060015010>
- Pfister, H. W., & Klein, M. (2023). S2k-Leitlinie: Ambulant erworbene bakterielle Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. *DGNeurologie*, 6(5), 402-420.
<https://doi.org/10.1007/s42451-023-00588-2>
- Pfister, H. W., Koedel, U., & Paul, R. (1999). Acute Meningitis. *Curr Infect Dis Rep*, 1(2), 153-159. <https://doi.org/10.1007/s11908-996-0023-7>
- Pieper, C., Marek, J. J., Unterberg, M., Schwerdtle, T., & Galla, H. J. (2014). Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro. *Brain Res*, 1550, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.004>
- Pieper, C., Pieloch, P., & Galla, H. J. (2013). Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res*, 1524, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.05.047>
- Polfliet, M. M., Zwijnenburg, P. J., van Furth, A. M., van der Poll, T., Dopp, E. A., Renardel de Lavalette, C., van Kesteren-Hendriks, E. M., van Rooijen, N., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2001). Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol*, 167(8), 4644-4650. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591794>
- Proebstl, D., Voisin, M. B., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G. E., Rowe, D., & Nourshargh, S. (2012). Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med*, 209(6), 1219-1234.
<https://doi.org/10.1084/jem.20111622>

- Ramnefjell, M., Aamelfot, C., Helgeland, L., & Akslen, L. A. (2017). Low expression of SerpinB2 is associated with reduced survival in lung adenocarcinomas. *Oncotarget*, 8(53), 90706-90718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21456>
- Renckens, R., Roelofs, J. J., de Waard, V., Florquin, S., Lijnen, H. R., Carmeliet, P., & van der Poll, T. (2005). The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. *J Thromb Haemost*, 3(5), 1018-1025. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01311.x>
- Renshaw, S. A., Loynes, C. A., Trushell, D. M., Elworthy, S., Ingham, P. W., & Whyte, M. K. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 108(13), 3976-3978. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024075>
- Rittirsch, D., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 8(10), 776-787. <https://doi.org/10.1038/nri2402>
- Robbie, L. A., Dummer, S., Booth, N. A., Adey, G. D., & Bennett, B. (2000). Plasminogen activator inhibitor 2 and urokinase-type plasminogen activator in plasma and leucocytes in patients with severe sepsis. *Br J Haematol*, 109(2), 342-348. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02057.x>
- Rouget, C. (1873). Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaries senguins et lymphatiques. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*, 5, 603-663.
- Rustenhoven, J., Jansson, D., Smyth, L. C., & Dragunow, M. (2017). Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 38(3), 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.12.001>
- Rustenhoven, J., & Kipnis, J. (2022). Brain borders at the central stage of neuroimmunology. *Nature*, 612(7940), 417-429. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05474-7>
- Sagare, A. P., Bell, R. D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E. A., Ramanathan, A., & Zlokovic, B. V. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun*, 4, 2932. <https://doi.org/10.1038/ncomms3932>
- Salmeri, M., Motta, C., Anfuso, C. D., Amodio, A., Scalia, M., Toscano, M. A., Alberghina, M., & Lupo, G. (2013). VEGF receptor-1 involvement in pericyte loss induced by Escherichia coli in an in vitro model of blood brain barrier. *Cell Microbiol*, 15(8), 1367-1384. <https://doi.org/10.1111/cmi.12121>
- Sandgren, A., Sjostrom, K., Olsson-Liljequist, B., Christensson, B., Samuelsson, A., Kronvall, G., & Henriques Normark, B. (2004). Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of Streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis*, 189(5), 785-796. <https://doi.org/10.1086/381686>
- Schlech, W. F., 3rd, Ward, J. I., Band, J. D., Hightower, A., Fraser, D. W., & Broome, C. V. (1985). Bacterial meningitis in the United States, 1978 through 1981. The National Bacterial Meningitis Surveillance Study. *JAMA*, 253(12), 1749-1754. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3871869>
- Schroder, W. A., Gardner, J., Le, T. T., Duke, M., Burke, M. L., Jones, M. K., McManus, D. P., & Suhrbier, A. (2010). SerpinB2 deficiency modulates Th1Th2 responses after schistosome infection. *Parasite Immunol*, 32(11-12), 764-768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01241.x>
- Schroder, W. A., Le, T. T., Major, L., Street, S., Gardner, J., Lambley, E., Markey, K., MacDonald, K. P., Fish, R. J., Thomas, R., & Suhrbier, A. (2010). A physiological function of inflammation-associated SerpinB2 is regulation of adaptive immunity. *J Immunol*, 184(5), 2663-2670. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902187>
- Schroder, W. A., Major, L., & Suhrbier, A. (2011). The role of SerpinB2 in immunity. *Crit Rev Immunol*, 31(1), 15-30. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i1.20>
- Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A. L., Lefkowitz, L., & Perkins, B. A. (1997). Bacterial meningitis in the United States in

1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med*, 337(14), 970-976.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199710023371404>
- Schut, E. S., Lucas, M. J., Brouwer, M. C., Vergouwen, M. D., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2012). Cerebral infarction in adults with bacterial meningitis. *Neurocrit Care*, 16(3), 421-427. <https://doi.org/10.1007/s12028-011-9634-4>
- Semeraro, N., Montemurro, P., Piccoli, C., Muolo, V., Colucci, M., Giuliani, G., Fumarola, D., Pece, S., & Moran, A. P. (1996). Effect of Helicobacter pylori lipopolysaccharide (LPS) and LPS derivatives on the production of tissue factor and plasminogen activator inhibitor type 2 by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis*, 174(6), 1255-1260. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1255>
- Serna-Rodriguez, M. F., Bernal-Vega, S., de la Barquera, J. A. O., Camacho-Morales, A., & Perez-Maya, A. A. (2022). The role of damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) and permeability of the blood-brain barrier in depression and neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 371, 577951.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2022.577951>
- Shepro, D., & Morel, N. M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J*, 7(11), 1031-1038.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370472>
- Sigurdardottir, B., Bjornsson, O. M., Jonsdottir, K. E., Erlendsdottir, H., & Gudmundsson, S. (1997). Acute bacterial meningitis in adults. A 20-year overview. *Arch Intern Med*, 157(4), 425-430. <https://doi.org/10.1001/archinte.1997.00440250077009>
- Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol*, 1392, 161-176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15
- Small, P. M., Tauber, M. G., Hackbarth, C. J., & Sande, M. A. (1986). Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun*, 52(2), 484-487.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3699893>
- Stacey, K. J., Sweet, M. J., & Hume, D. A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*, 157(5), 2116-2122.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757335>
- Stahel, P. F., Nadal, D., Pfister, H. W., Paradisi, P. M., & Barnum, S. R. (1997). Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet*, 349(9069), 1886-1887. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)63877-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63877-9)
- Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M. L., Gartner, F., Khandoga, A. G., Legate, K. R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B., & Massberg, S. (2013). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol*, 14(1), 41-51. <https://doi.org/10.1038/ni.2477>
- Su, C. Y., Liu, Y. P., Yang, C. J., Lin, Y. F., Chiou, J., Chi, L. H., Lee, J. J., Wu, A. T., Lu, P. J., Huang, M. S., & Hsiao, M. (2015). Plasminogen Activator Inhibitor-2 Plays a Leading Prognostic Role among Protease Families in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*, 10(7), e0133411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133411>
- Swartz, J. M., Bystrom, J., Dyer, K. D., Nitto, T., Wynn, T. A., & Rosenberg, H. F. (2004). Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes. *J Leukoc Biol*, 76(4), 812-819. <https://doi.org/10.1189/jlb.0304182>
- Sweeney, M. D., Ayyadurai, S., & Zlokovic, B. V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*, 19(6), 771-783.
<https://doi.org/10.1038/nn.4288>
- Takemura, M., Yamaguchi, M., Kobayashi, M., Sumitomo, T., Hirose, Y., Okuzaki, D., Ono, M., Motooka, D., Goto, K., Nakata, M., Uzawa, N., & Kawabata, S. (2022). Pneumococcal BgaA Promotes Host Organ Bleeding and Coagulation in a Mouse

- Sepsis Model. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 844000.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.844000>
- Tan, S. Y., Roediger, B., & Weninger, W. (2015). The role of chemokines in cutaneous immunosurveillance. *Immunol Cell Biol*, 93(4), 337-346.
<https://doi.org/10.1038/icb.2015.16>
- Theodoridou, M. N., Vasilopoulou, V. A., Atsali, E. E., Pangalis, A. M., Mostrou, G. J., Syriopoulou, V. P., & Hadjichristodoulou, C. S. (2007). Meningitis registry of hospitalized cases in children: epidemiological patterns of acute bacterial meningitis throughout a 32-year period. *BMC Infect Dis*, 7, 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-101>
- Thigpen, M. C., Whitney, C. G., Messonnier, N. E., Zell, E. R., Lynfield, R., Hadler, J. L., Harrison, L. H., Farley, M. M., Reingold, A., Bennett, N. M., Craig, A. S., Schaffner, W., Thomas, A., Lewis, M. M., Scallan, E., Schuchat, A., & Emerging Infections Programs, N. (2011). Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med*, 364(21), 2016-2025. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005384>
- Tigges, U., Welser-Alves, J. V., Boroujerdi, A., & Milner, R. (2012). A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc Res*, 84(1), 74-80.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.03.008>
- Torok, O., Schreiner, B., Schaffenrath, J., Tsai, H. C., Maheshwari, U., Stifter, S. A., Welsh, C., Amorim, A., Sridhar, S., Utz, S. G., Mildenerger, W., Nassiri, S., Delorenzi, M., Aguzzi, A., Han, M. H., Greter, M., Becher, B., & Keller, A. (2021). Pericytes regulate vascular immune homeostasis in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2016587118>
- Trostdorf, F., Bruck, W., Schmitz-Salue, M., Stuert, K., Hopkins, S. J., van Rooijen, N., Huitinga, I., & Nau, R. (1999). Reduction of meningeal macrophages does not decrease migration of granulocytes into the CSF and brain parenchyma in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*, 99(2), 205-210.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505976>
- Tuomanen, E. I., Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., & Wright, S. D. (1989). Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med*, 170(3), 959-969. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570120>
- Underly, R. G., Levy, M., Hartmann, D. A., Grant, R. I., Watson, A. N., & Shih, A. Y. (2017). Pericytes as Inducers of Rapid, Matrix Metalloproteinase-9-Dependent Capillary Damage during Ischemia. *J Neurosci*, 37(1), 129-140.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2891-16.2016>
- Uyama, O., Okamura, N., Yanase, M., Narita, M., Kawabata, K., & Sugita, M. (1988). Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8(2), 282-284.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1988.59>
- van de Beek, D., Brouwer, M., Hasbun, R., Koedel, U., Whitney, C. G., & Wijdicks, E. (2016). Community-acquired bacterial meningitis. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16074.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.74>
- van de Beek, D., Brouwer, M. C., Koedel, U., & Wall, E. C. (2021). Community-acquired bacterial meningitis. *Lancet*, 398(10306), 1171-1183. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00883-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00883-7)
- van de Beek, D., Cabellos, C., Dzupova, O., Esposito, S., Klein, M., Kloek, A. T., Leib, S. L., Mourvillier, B., Ostergaard, C., Pagliano, P., Pfister, H. W., Read, R. C., Sipahi, O. R., Brouwer, M. C., & Brain, E. S. G. f. I. o. t. (2016). ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect*, 22 Suppl 3, S37-62.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.007>

- van de Beek, D., de Gans, J., Spanjaard, L., Weisfelt, M., Reitsma, J. B., & Vermeulen, M. (2004). Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*, *351*(18), 1849-1859. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040845>
- Vazquez-Liebanas, E., Nahar, K., Bertuzzi, G., Keller, A., Betsholtz, C., & Mae, M. A. (2022). Adult-induced genetic ablation distinguishes PDGFB roles in blood-brain barrier maintenance and development. *J Cereb Blood Flow Metab*, *42*(2), 264-279. <https://doi.org/10.1177/0271678X211056395>
- Vidal, P. P., Degallaix, L., Josset, P., Gasc, J. P., & Cullen, K. E. (2004). Postural and locomotor control in normal and vestibularly deficient mice. *J Physiol*, *559*(Pt 2), 625-638. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063883>
- Villasenor, R., Kuennecke, B., Ozmen, L., Ammann, M., Kugler, C., Gruninger, F., Loetscher, H., Freskgard, P. O., & Collin, L. (2017). Region-specific permeability of the blood-brain barrier upon pericyte loss. *J Cereb Blood Flow Metab*, *37*(12), 3683-3694. <https://doi.org/10.1177/0271678X17697340>
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*, *16*(6), 355-367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- Weisfelt, M., Determann, R. M., de Gans, J., van der Ende, A., Levi, M., van de Beek, D., & Schultz, M. J. (2007). Procoagulant and fibrinolytic activity in cerebrospinal fluid from adults with bacterial meningitis. *J Infect*, *54*(6), 545-550. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.11.016>
- Weisfelt, M., van de Beek, D., Spanjaard, L., Reitsma, J. B., & de Gans, J. (2006). Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol*, *5*(2), 123-129. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70288-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70288-X)
- Wellmer, A., Zysk, G., Gerber, J., Kunst, T., Von Mering, M., Bunkowski, S., Eiffert, H., & Nau, R. (2002). Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of Streptococcus pneumoniae in murine meningitis. *Infect Immun*, *70*(11), 6504-6508. <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6504-6508.2002>
- Wenger, J. D., Hightower, A. W., Facklam, R. R., Gaventa, S., & Broome, C. V. (1990). Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. *J Infect Dis*, *162*(6), 1316-1323. <https://doi.org/10.1093/infdis/162.6.1316>
- Whitehead, B., Corbin, D., Albowaidey, A., Zhang, N., Karelina, K., & Weil, Z. M. (2024). Mild traumatic brain injury induces pericyte detachment independent of stroke vulnerability. *Neurosci Lett*, *818*, 137552. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137552>
- Whitehead, B., Karelina, K., & Weil, Z. M. (2023). Pericyte dysfunction is a key mediator of the risk of cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, *101*(12), 1840-1848. <https://doi.org/10.1002/jnr.25245>
- Whittaker, R., Dias, J. G., Ramliden, M., Kodmon, C., Economopoulou, A., Beer, N., Pastore Celentano, L., & disease, E. n. m. f. i. m. (2017). The epidemiology of invasive meningococcal disease in EU/EEA countries, 2004-2014. *Vaccine*, *35*(16), 2034-2041. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.007>
- Wilson, E. H., Wengler, W., & Hunter, C. A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*, *120*(5), 1368-1379. <https://doi.org/10.1172/JCI41911>
- Winkler, E. A., Sengillo, J. D., Sullivan, J. S., Henkel, J. S., Appel, S. H., & Zlokovic, B. V. (2013). Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, *125*(1), 111-120. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1039-8>

- Winkler, F., Kastenbauer, S., Koedel, U., & Pfister, H. W. (2002). Role of the urokinase plasminogen activator system in patients with bacterial meningitis. *Neurology*, *59*(9), 1350-1355. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000031427.81898.96>
- Winkler, F., Koedel, U., Kastenbauer, S., & Pfister, H. W. (2001). Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis*, *183*(12), 1749-1759. <https://doi.org/10.1086/320730>
- Woehrl, B., Brouwer, M. C., Murr, C., Heckenberg, S. G., Baas, F., Pfister, H. W., Zwinderman, A. H., Morgan, B. P., Barnum, S. R., van der Ende, A., Koedel, U., & van de Beek, D. (2011). Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Clin Invest*, *121*(10), 3943-3953. <https://doi.org/10.1172/JCI57522>
- Worsoe, L., Caye-Thomasen, P., Brandt, C. T., Thomsen, J., & Ostergaard, C. (2010). Factors associated with the occurrence of hearing loss after pneumococcal meningitis. *Clin Infect Dis*, *51*(8), 917-924. <https://doi.org/10.1086/656409>
- Yu, H., Maurer, F., & Medcalf, R. L. (2002). Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. *Blood*, *99*(8), 2810-2818. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.8.2810>
- Zehendner, C. M., Sebastiani, A., Hugonnet, A., Bischoff, F., Luhmann, H. J., & Thal, S. C. (2015). Traumatic brain injury results in rapid pericyte loss followed by reactive pericytosis in the cerebral cortex. *Sci Rep*, *5*, 13497. <https://doi.org/10.1038/srep13497>
- Zhang, X. M., Wang, T., Hu, P., Li, B., Liu, H., & Cheng, Y. F. (2019). SERPINB2 overexpression inhibited cell proliferation, invasion and migration, led to G2/M arrest, and increased radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Radiat Res*, *60*(3), 318-327. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz003>
- Zhao, A., Yang, Z., Sun, R., Grinchuk, V., Netzel-Arnett, S., Anglin, I. E., Driesbaugh, K. H., Notari, L., Bohl, J. A., Madden, K. B., Urban, J. F., Jr., Antalis, T. M., & Shea-Donohue, T. (2013). SerpinB2 is critical to Th2 immunity against enteric nematode infection. *J Immunol*, *190*(11), 5779-5787. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200293>
- Zimmermann, K. W. (1923). Der feinere bau der blutcapillaren. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, *68*(1), 29-109.
- Zwijnenburg, P. J., van der Poll, T., Florquin, S., Roord, J. J., & Van Furth, A. M. (2003). IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol*, *170*(9), 4724-4730. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707352>
- Zysk, G., Bruck, W., Huitinga, I., Fischer, F. R., Flachsbarth, F., van Rooijen, N., & Nau, R. (1997). Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*, *73*(1-2), 77-80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058762>
- Zysk, G., Schneider-Wald, B. K., Hwang, J. H., Bejo, L., Kim, K. S., Mitchell, T. J., Hakenbeck, R., & Heinz, H. P. (2001). Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun*, *69*(2), 845-852. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.845-852.2001>

9 Veröffentlichungen

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

Teske, N. C., Engelen-Lee, J. Y., Dyckhoff-Shen, S., Pfister, H. W., Klein, M., van de Beek, D., Kirschning, C. K., Koedel, U., & Brouwer, M. C. (2022). The role of plasminogen activator inhibitor-2 in pneumococcal meningitis. *Acta neuropathologica communications*, 10(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01461-1>

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

10 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uwe Ködel für die herausragende Betreuung und ausgezeichnete Unterstützung in der gesamten Zeit auch während meines Forschungsaufenthaltes im Amsterdam. Ich fühlte mich dank seiner geduldigen Art stets wohl, meine Fragen ohne Zögern zu stellen. Ein besonderer Dank gebührt auch Frau Barbara Angele, die sich immer Zeit nahm, um mir wichtige labortechnische Methoden beizubringen. Sie war stets zur Stelle, um mir bei Problemen im Laboralltag zu helfen. Ich erinnere mich gerne an die vielen bereichernden und wertvollen Gespräche zurück, die ich mit Prof. Dr. Uwe Ködel und Barbara Angele führen durfte. Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister danken, dass ich Teil seiner Arbeitsgruppe sein durfte. Ein herzlicher Dank geht selbstverständlich auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe für die vielen wertvollen Anregungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Meinen Mitdoktoranden, mit denen die Arbeit im Labor immer eine große Freude war, möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen. Herrn Dr. Jan Bewersdorf danke ich für die hervorragende Einarbeitung und großen Hilfestellungen während des Projekts. Ein großer Dank gilt Prof. Diederik van de Beek und Prof. Matthijs Brouwer für die herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und tatkräftige Unterstützung während meines gesamten Forschungsaufenthaltes in Amsterdam. Außerhalb des Labors erhielt ich dankenswerterweise Unterstützung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, Prof. Dr. Rainer Glaß, PD Dr. sc. nat. Roland Kälin, Prof. Dr. Carsten Kirschning sowie von Naoki Mochizuki und Shigetomo Fukuhara. Sie standen mir mit Beratung zur Seite und stellten Materialien zur Verfügung.

Abschließend möchte ich meinen Freunden, meiner Familie und meinem Partner Willi meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Ihre kontinuierliche Unterstützung, sowohl inhaltlich als auch emotional schätze ich von Herzen.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Teske, Nina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Experimentelle Untersuchungen zur Rolle zerebraler Perizyten und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Proteins 2
in der Immunpathogenese der Pneumokokken-Meningitis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkennt-
nisse, 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, 01.11.2024

Ort, Datum

Nina Teske

Unterschrift Nina Teske