

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

OTITIS MEDIA UND BAKTERIELLE KOLONISATION DES NASOPHARYNX IN  
CCL3<sup>-/-</sup> MÄUSEN  
-OTITIS MEDIA AND NASOPHARYNGEAL COLONIZATION IN CCL3<sup>-/-</sup> MICE-

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dominik Deniffel

2018

|                             |                                    |
|-----------------------------|------------------------------------|
| Dekan:                      | Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  |
| 1. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Rainer Straub            |
| 2. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Dr. h. c. Joachim Grifka |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 18.06.2018                         |

**Deutsche Zusammenfassung und Erläuterungen zur  
Originalpublikation  
im Sinne des § 6 Abs. 7 PromO**

**Inhaltsverzeichnis**

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>0</b> | <b>Abstrakt.....</b>   | <b>1</b>  |
| 0.1      | Einleitung.....  | 1         |
| 0.2      | Material und Methoden.....   | 1         |
| 0.3      | Ergebnisse .....   | 1         |
| 0.4      | Schlussfolgerungen .....   | 2         |
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1      | Klassifikation .....   | 3         |
| 1.2      | Epidemiologie der akuten Otitis media .....  | 3         |
| 1.3      | Entzündungsreaktionen im Mittelohr .....   | 4         |
| 1.4      | Ätiologie der akuten Otitis media .....  | 4         |
| 1.4.1    | Mikrobiologie.....   | 4         |
| 1.4.2    | Multifaktorielle Genese.....   | 5         |
| 1.5      | Rolle des angeborenen Immunsystems in der Immunabwehr des<br>Mittelohres .....                 | 5         |
| 1.5.1    | Toll-Like-Rezeptoren.....  | 5         |
| 1.5.2    | TNF-System.....  | 6         |
| 1.6      | CC Chemokin Ligand 3 .....   | 7         |
| 1.6.1    | Allgemeine Biologische Funktionen .....  | 7         |
| 1.6.2    | Bedeutung von CCL3 in der Immunantwort des Mittelohres .....                                   | 7         |
| 1.7      | Experimentelle Otitis media am Mausmodell.....   | 8         |
| 1.8      | Ziele der Arbeit .....   | 8         |
| 1.8.1    | Evaluation des Einflusses einer CCL3-Gendeletion auf die<br>Immunantwort des Mittelohres ..... | 8         |
| 1.8.2    | Evaluation der Auswirkungen einer CCL3-Gendeletion auf die<br>nasopharyngeale Flora .....      | 9         |
| <b>2</b> | <b>Materialien und Methoden .....</b>  | <b>10</b> |
| 2.1      | Versuchstiere.....   | 10        |
| 2.2      | Vorbereitung der <i>NTHi</i> -Bakterienlösung .....  | 10        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.3      | Chirurgischer Eingriff .....  | 11        |
| 2.4      | CCL Genexpressionsstudien .....   | 11        |
| 2.4.1    | Microarrays .....   | 11        |
| 2.4.2    | Quantitative Echtzeit-PCR .....   | 13        |
| 2.5      | Histologie .....  | 14        |
| 2.6      | Mittelohrkulturen .....   | 15        |
| 2.7      | Nasopharynx-Kulturen .....  | 16        |
| 2.8      | Blutkulturen .....  | 17        |
| 2.9      | Phagozytose-Assay und Killing-Assay mit Peritonealmakrophagen .....   | 17        |
| 2.10     | Statistik .....   | 19        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1      | Regulation der CCL Gene bei akuter Otitis media .....   | 22        |
| 3.2      | Verstärkte Mukosahyperplasie in CCL3 <sup>-/-</sup> Mittelohren .....   | 22        |
| 3.3      | Verzögerter, jedoch langanhaltender Einstrom von Leukozyten in CCL3 <sup>-/-</sup> Mittelohren .....                          | 23        |
| 3.4      | Verzögerte bakterielle Klärung des Mittelohres in CCL3 <sup>-/-</sup> Mäusen .....  | 23        |
| 3.5      | CCL Genexpression in Abwesenheit von CCL3 .....   | 24        |
| 3.6      | Geschwächte bakterielle Phagozytose von CCL3 <sup>-/-</sup> Peritonealmakrophagen bei intakter intrazellulärer Abtötung ..... | 24        |
| 3.7      | Erhöhte bakterielle Dichte im Nasopharynx von CCL3 <sup>-/-</sup> Mäusen .....  | 24        |
| 3.8      | Zusammenfassung .....   | 24        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>26</b> |
| 4.1      | Expressionsprofil der CCL Gene .....  | 26        |
| 4.2      | Bedeutung von CCL3 für die Immunabwehr des Mittelohres .....  | 26        |
| 4.2.1    | Leukozytenrekrutierung bei CCL3-Gendeletion .....   | 26        |
| 4.2.1.1  | Verzögerter initialer Leukozyteneinstrom .....  | 26        |
| 4.2.1.2  | Zeitlicher Verlauf der Leukozytenrekrutierung in Einklang mit CCL3-Genexpression .....  | 27        |
| 4.2.1.3  | Intakte Leukozytenrekrutierung .....  | 27        |
| 4.2.2    | Funktionelle Redundanz von Chemokinen und anderen Botenstoffen ..   | 28        |
| 4.2.3    | Prolongierte Entzündungsreaktion in CCL3 <sup>-/-</sup> Mittelohren .....   | 28        |
| 4.2.4    | Funktionelle Beeinträchtigung der CCL3 <sup>-/-</sup> -Makrophagen .....  | 29        |
| 4.2.5    | Otitis media-Phänotyp in CCL3 <sup>-/-</sup> -Mäusen im Vergleich zu anderen Gendefekten .....                                | 30        |
| 4.3      | Bedeutung von CCL3 in der mikrobiellen Homöostase des Nasopharynx ..  | 30        |
| 4.3.1    | Erhöhte bakterielle Kolonisation des Nasopharynx in CCL3 <sup>-/-</sup> Mäusen ..   | 30        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3.2    | Keine <i>de novo</i> Mittelohrinfectionen in CCL3 <sup>-/-</sup> Mäusen .....           | 31        |
| 4.3.3    | Virale Koinfektion als möglicher prädisponierender Faktor für Atemwegsinfektionen ..... | 31        |
| 4.3.4    | Rolle des pharyngealen Mikrobioms in der Kanzerogenese .....                            | 32        |
| 4.4      | Ausblick .....  | 32        |
| <b>5</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>6</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>35</b> |

## Anlagen

### Anlage 1: Originalpublikation;

Deniffel D, Nuyen B, Pak K, Suzukawa K, Hung J, Kurabi A, Wasserman SI, Ryan AF. 2017. Otitis media and nasopharyngeal colonization in ccl3<sup>-/-</sup> mice. Infect Immun **85**:e00148-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00148-17>.

## 0 Abstrakt

### 0.1 Einleitung

Die initiale angeborene Immunantwort des Mittelohres wird entscheidend über TNF-induzierte Entzündungsreaktionen gesteuert. In vorausgehenden Arbeiten der Forschungsgruppe Ryan et al. wurde CC Chemokin Ligand 3 (CCL3) als wichtiges nachgeschaltetes Effektormolekül dieser Signalkaskaden identifiziert. Durch die Gabe von exogenem CCL3 waren TNF-defiziente Mäuse im Stande, die durch den Knockout geschwächte Immunantwort im Rahmen einer Mittelohrentzündung zu kompensieren.

In einem etablierten Tiermodell wurde daher der Einfluss einer *CCL3* Gendeletion auf den Phänotyp der Mittelohrinfection untersucht.

### 0.2 Material und Methoden

Die Mittelohrentzündung wurde in *CCL3*<sup>-/-</sup> und Wildtyp (WT)-Kontrollmäusen durch Inokulation von nicht-typisierbarem *Haemophilus influenzae* (*NTHi*) induziert. Die Expression von CCL Chemokin-Genen wurde in Wildtyp-Mäusen über einen Zeitraum von 7 Tagen, der Verlauf der Mittelohrinfection und -entzündung wurde in beiden Genotypen über einen Zeitraum von 21 Tagen ausgewertet. Mit Hilfe eines *in vitro* Assays wurde die Funktion der *CCL3*<sup>-/-</sup> Peritonealmakrophagen beurteilt. Die bakterielle Besiedlung bzw. die Bakterienlast des Nasopharynx wurde ohne vorausgehende Infektion des Mittelohres in beiden Mausstämmen bestimmt.

### 0.3 Ergebnisse

Zahlreiche CCL Gene werden im Laufe einer akuten Otitis media (OM) vermehrt exprimiert, wobei mit dem 600-fachen des Basiswertes die Expression von CCL3 im größten Ausmaß ansteigt. *CCL3*<sup>-/-</sup> Mäuse demonstrieren sowohl eine verminderte Eliminierung der Bakterien als auch eine verlängerte Schleimhauthyperplasie im Mittelohr. Leukozyten werden zwar verzögert in das Mittelohr von *CCL3*<sup>-/-</sup> Mäusen rekrutiert, verbleiben dort jedoch anschließend deutlich länger als in WT-Mittelohren. Der Nasopharynx von *CCL3*<sup>-/-</sup> Mäusen, welcher ein mikrobiologisches Reservoir für Infektionen des Mittelohrs und des Atemtraktes darstellt, weist eine signifikant

erhöhte bakterielle Besiedlung auf. Diese Ergebnisse gehen einher mit einer verminderten Kapazität der *CCL3*-defizienten Makrophagen zur Phagozytose von *NTHi*.

#### **0.4 Schlussfolgerungen**

In diesem Mausmodell für akute OM konnte eine essentielle Bedeutung von *CCL3* für eine effektive Infektionsabwehr und Ausheilung der Entzündungsreaktion im Mittelohr belegt werden. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass *CCL3* von Bedeutung ist für die lokale Schleimhautabwehr in der nasopharyngealen Niche. Therapien basierend auf *CCL3* könnten sich daher vor allem zur Behandlung von schweren und chronischen Krankheitsverläufen als nützlich erweisen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Klassifikation

In Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs werden Infektionen oder entzündliche Erkrankungen des Mittelohres in mehrere Kategorien unterteilt:

### a) akute OM

Die akute OM ist gekennzeichnet durch einen Paukenerguss und Entzündung der Mittelohrschleimhaut. Die Erkrankung ist durch einen reduzierten Allgemeinzustand, Fieber, pulsierende stechende Otalgie und Hörminderung geprägt. Bei rupturiertem Trommelfell sind eitrige Otorrhöen möglich. Die akute OM ist meist selbstlimitierend, spricht jedoch gut auf Antibiotika an, welche die Erkrankungsdauer und -schwere mildern können.

### b) chronische mesotympanale OM

Die chronische mesotympanale OM beschreibt eine chronische Schleimhautentzündung des Mittelohres bei persistierendem zentralem Trommelfelldefekt und schubweisem Verlauf mit aktiven, eitrigen und trockenen Stadien. Die knöcherne Begrenzung des Mittelohres bleibt intakt. Knöcherne Destruktionen der Ossikelkette treten jedoch häufig auf.

### c) chronische epitympanale OM

Die chronische epitympanale OM beschreibt eine chronische Knocheneiterung, welche verursacht wird durch ein Cholesteatom. Charakteristisch für das Cholesteatom ist das Einwachsen von Plattenepithel in die mit einschichtig kubisch oder flachem Epithel ausgekleidete Paukenhöhle über einen typischerweise randständigen Trommelfelldefekt. Das Krankheitsbild ist durch eine Destruktion der knöchernen Begrenzung der Mittelohrräume und lange bestehende, fäulnisgeruchende Eiterung geprägt (1).

## 1.2 Epidemiologie der akuten Otitis media

Die akute OM zählt zu den häufigsten pädiatrischen Erkrankungen (2) und Ursachen für das Aufsuchen einer medizinischen Versorgungseinrichtung (3). Darüber hinaus sind in den Vereinigten Staaten jährlich mehr als 600.000 ambulante operative



Eingriffe (4) und die Mehrheit aller Antibiotika-Verschreibungen (5,6) diesem Krankheitsbild zuzuschreiben.

Die akute OM ist in der Regel eine selbstlimitierende Erkrankung mit einer Spontanremissionsrate von 84% (7). In Entwicklungsländern sind jedoch schwere Komplikationen wie Mastoiditis, Meningitis oder bleibender Hörverlust noch immer häufig (8) und wegen der zunehmenden Antibiotikaresistenzen, als Folge ihres unsachgemäßen und vermehrten Einsatzes, steigen auch die Inzidenzraten solcher schweren Verläufe in Industrienationen wieder an (9, 10).

### **1.3 Entzündungsreaktionen im Mittelohr**

OM ist typischerweise gekennzeichnet durch eine erhebliche Hyperplasie der Mittelohrmukosa. Im Verlauf einer Mittelohrentzündung expandiert das physiologisch einschichtig platte bis kubische Epithel der Mittelohrmukosa (11) zu einem pseudo-geschichteten Zylinderepithel mit zunehmender submuköser Stroma und Gefäßeinsprossung. Der Anteil an Flimmer- und schleimbildenden Becherzellen innerhalb des Epithels nimmt zu. Das Exsudat der letzteren ist verantwortlich für den eher zähen Paukenerguss bei chronischen Krankheitsverläufen. Leukozyten gelangen über Kapillaren durch die Mukosaschicht hindurch in die Paukenhöhle (11,12). Besonders bemerkenswert an diesen Veränderungen ist ihre Reversibilität, denn im Anschluss an eine akute OM kehrt die Mittelohrmukosa in kürzester Zeit wieder zu ihrem Ausgangszustand zurück und Zellen bzw. Zell-Debris werden beseitigt (12).

### **1.4 Ätiologie der akuten Otitis media**

#### **1.4.1 Mikrobiologie**

Mehrheitlich sind Bakterien, allein oder in Kombination mit Viren, Auslöser der Mittelohrinfektionen bei Kindern (13). Die häufigsten bakteriellen Erreger einer akuten OM bei Kindern sind *Streptococcus pneumoniae* (ca. 50%), nicht-typisierbarer *Haemophilus influenzae* (NTHi) und *Moraxella catarrhalis* (14). Bereits im Säuglingsalter werden diese potentiellen Otopathogene, zusammen mit einer großen Vielfalt an Mikroorganismen, als Teil der physiologischen nasopharyngealen Flora erworben. In den meisten Fällen verursacht diese bakterielle Besiedlung keine

klinischen Symptome (15). Unter bestimmten Bedingungen jedoch sind Pathogene in der Lage, aus dem Nasopharynx in die Paukenhöhle zu wandern. Sowohl eine erhöhte Bakterienlast des Nasopharynx (15), als auch die gleichzeitige Besiedlung mit multiplen Bakterienstämmen (16, 17) erhöhen die Wahrscheinlichkeit, eine OM zu entwickeln.

#### **1.4.2 Multifaktorielle Genese**

Zahlreiche weitere Faktoren erhöhen die Anfälligkeit für die Entwicklung und Persistenz einer Mittelohrentzündung. Dazu gehören vor allem Tubenfunktionsstörungen, Umweltfaktoren, ein unreifes oder geschwächtes Immunsystem, Allergie und genetische Prädisposition (18). Entscheidendes Element in der multifaktoriellen Genese von Mittelohrentzündungen bei Kindern sind darüber hinaus virale Infektionen des oberen Atemtrakts, welche die Immunabwehr- und Belüftungsfunktion der Eustachischen Röhre schwächen, zu einem Druckgefälle zwischen Nasopharynx und Paukenhöhle führen und schließlich den Aufstieg von Bakterien aus dem Nasopharynx in die Paukenhöhle via Eustachischer Röhre ermöglichen (19).

### **1.5 Rolle des angeborenen Immunsystems in der Immunabwehr des Mittelohres**

Die erste Instanz der Immunabwehr gegen eindringende Mikroorganismen ist das angeborene Immunsystem. Die Tatsache, dass im Regelfall eine akute Mittelohrentzündung innerhalb weniger Tage ausheilt, noch bevor eine erworbene Immunantwort initiiert wird, lässt vermuten, dass die angeborene oder unspezifische Immunabwehr die Schlüsselrolle in der Abwehr bzw. im Heilungsprozess einer OM bei Kindern spielt. Diese Ansicht wird weiter durch zahlreiche Studien gestützt, welche bei Kindern mit Immundefekten des angeborenen Immunsystems ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer OM belegen (20).

#### **1.5.1 Toll-Like-Rezeptoren**

Das angeborene Immunsystem des Wirts erkennt Eindringlinge mittels Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs), wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren, welche Pathogene anhand ihrer molekularen Signatur, auch genannt pathogen-assoziierte molekulare

Muster, erkennen (21). Die Aktivierung dieser Rezeptoren initiiert Signalkaskaden, welche letztlich die Produktion und Ausschüttung zahlreicher Effektormoleküle induzieren, darunter proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Interferone (21) und antimikrobielle Peptide, wie z.B. Defensine (22), Lysozyme, Stickstoffmonoxid (NO) und Cathelicidin (23).

TLRs werden im Mittelohr sowohl auf den Epithelzellen der Mittelohrmukosa, als auch auf verschiedensten Leukozytenpopulationen wie Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (24, 25).

Die primären Rezeptoren für das Erkennen der pathogen-assoziierten molekularen Muster von *NTHi* sind TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 und TLR9 (26). Sie können unter Beteiligung des Adaptermoleküls MyD88 eine Signalkaskade aktivieren, welche die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine induziert, darunter IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  und Chemokine, wie CXCL2 (macrophage inflammatory protein-2) und CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) (21, 27).

Genexpressionsstudien in Folge einer *NTHi*-Exposition demonstrierten eine erhebliche Expressionssteigerung von TLR-Signalmolekülen in der Mittelohrmukosa von Mäusen, im Besonderen während der initialen Phase der Entzündungsantwort (28, 29).

Im Mausmodell sind Gendefekte der TLR-Signalkaskade assoziiert mit einer geschwächten Immunantwort auf *NTHi*-induzierte Mittelohrinfektionen (30, 31, 32, 33, 34). Beim Menschen erhöhen TLR-assoziierte Defekte Inzidenz und Schwere von Mittelohrinfektionen, darunter Polymorphismen von TLR2- und TLR4 (35, 36), des TLR4-Korezeptors CD14 (37) und der nachgeschalteten proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 (38).

### **1.5.2 TNF-System**

Eine besondere Rolle im Signalweg der TLRs und der unspezifischen Immunantwort des Mittelohres kommt dem Effektormolekül TNF zu. Die Deaktivierung von TLR2- oder TLR4-Rezeptoren im Knockout-Mausmodell führt zu verminderter TNF-Expression (34). In Abwesenheit von TNF wiederum sind Mäuse weder in der Lage jene beiden TLRs, noch nachgeschaltete Entzündungsmediatoren, wie z.B. CCL3, nach oben zu regulieren, was sich schließlich in deutlich verzögerter und geschwächter Infektionsabwehr des Mittelohres äußert (30).

## 1.6 CC Chemokin Ligand 3

### 1.6.1 Allgemeine Biologische Funktionen

CC Chemokin Ligand 3, alternativ auch Macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$  genannt, gehört zur C-C-Motiv-Subfamilie der Chemokine. Namensgebende biologische Eigenschaft der Chemokine ist die Chemoattraktion und Aktivierung von Leukozyten (39). Mittels Bindung an den Rezeptoren CCR1 und CCR5 reguliert CCL3 die Migration und Aktivierung zahlreicher Effektorzellen des Immunsystems, darunter Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, sowie natürliche Killer-Zellen (40, 41, 42).

Neben der Rekrutierung von Entzündungszellen lassen aktuelle *in vitro* Studien eine direkte antimikrobielle Aktivität von bestimmten Chemokinen vermuten. Inwiefern diese Ergebnisse jedoch auf *in vivo*-Bedingungen zu übertragen sind, bleibt abzuwarten (43, 44).

CCL3 ist an der Pathogenese zahlreicher chronisch-entzündlicher Krankheitsbilder beteiligt, darunter Rheumatoide Arthritis (45), allergisches Asthma (46), Lungenfibrose (47), Atherosklerose (48) und Leukämie (49, 50).

### 1.6.2 Bedeutung von CCL3 in der Immunantwort des Mittelohres

Zu den zentralen Mechanismen einer funktionierenden Immunantwort des Mittelohres auf eindringende Pathogene zählt die Fähigkeit der sogenannten professionellen Phagozyten, wie den Makrophagen, Mikroorganismen effizient zu phagozytieren und abzutöten. Makrophagen aus TNF<sup>-/-</sup> und TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen *in vitro* eine verminderte Kapazität zur Phagozytose und intrazellulärem Abtöten von *NTHi*. Darüber hinaus exprimieren sie weniger CCL3 (30). Die direkte *in vitro*-Stimulierung mit rekombinantem CCL3 konnte in weiteren Studien die vorherigen Funktionseinschränkungen von Makrophagen aus TLR2<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>, TNF<sup>-/-</sup> (51) und CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen (52) ausgleichen. Ferner konnte durch die Einwirkung von CCL3 auf CCL3<sup>+/+</sup> Makrophagen eine Funktionssteigerung hinsichtlich der Phagozytose und intrazellulären Degradation von Mikroorganismen erreicht werden (30, 52).

Neben diesen vielversprechenden *in vitro*-Effekten zeigte auch die *in vivo* Verabreichung von rCCL3 in TNF-Knockout-Tieren vor Infektion mit *NTHi* bemerkenswerte Auswirkungen. Während die alleinige Gabe von rTNF das

Immundefizit dieser Tiere nur teilweise kompensieren konnte, wurde ihre geschwächte Immunantwort nach Anwendung von rCCL3, allein oder in Kombination mit TNF, wieder vollständig auf das Niveau der Wildtyp-Kontrollmäuse hergestellt (30). Der gegenteilige Effekt, nämlich eine verzögerte Ausheilung der *NTHi*-induzierten Mittelohrentzündung, konnte demonstriert werden durch *in vivo*-Blockade der CCL3-Aktivität mittels CCL3-Antikörpern in Wildtyp-Tieren (30).

## **1.7 Experimentelle Otitis media am Mausmodell**

Aufgrund funktionaler und anatomischer Ähnlichkeit zum menschlichen Ohr (53) und der vielseitigen Möglichkeiten der genetischen Manipulationen (54) hat sich besonders das Mausmodell in der OM-Forschung etabliert. Mittels fehlender (Null)-Expression, Überexpression oder Misexpression von fraglichen Genen wurden in zahlreichen Studien genetische Prädispositionen aufgedeckt, welche einer erhöhten Anfälligkeit für OM zugrunde liegen (55). Studien im Mausmodell konzentrieren sich vorwiegend auf die beiden häufigsten humanpathogenen Erreger der OM, nämlich *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*, um die Ergebnisse besser auf den Menschen übertragen zu können.

## **1.8 Ziele der Arbeit**

### **1.8.1 Evaluation des Einflusses einer CCL3-Gendeletion auf die Immunantwort des Mittelohres**

Basierend auf diesen vorhergehenden Ergebnissen erschienen CCL Chemokine im Allgemeinen und CCL3 im Besonderen vielversprechend für weiterreichende Studien. In einem bereits etablierten experimentellen Mausmodell wurde eine *NTHi*-Infektion des Mittelohrs in CCL3-Knockout-Mäusen und ihren Wildtyp-Pendants induziert, um den Einfluss dieser Gendeletion auf den Phänotyp der OM zu untersuchen. Kernfrage dabei war, ob sich die in den Vorstudien gezeigte maßgebliche Bedeutung von CCL3 für die Immunantwort des Mittelohres weiter bestätigen würde und in einer prolongierten/verstärkten Entzündungsreaktion und geschwächten Ausheilung der Infektion in CCL3-defizienten Mäusen niederschlagen würde.

Da in vorherigen Studien mit Knockout-Mäusen eine geschwächte Immunantwort des Mittelohres mit verminderter Funktion der Makrophagen assoziiert war (31, 51), war auch in CCL3<sup>-/-</sup>-Makrophagen eine solche Funktionseinschränkung zu vermuten.

### **1.8.2 Evaluation der Auswirkungen einer CCL3-Gendeletion auf die nasopharyngeale Flora**

Bei der Pathogenese von OM im Menschen stammen die Erreger der Mittelohrinfection überwiegend aus dem nasopharyngealen Bakterienreservoir (15). Einen genetischen Einfluss auf nasopharyngeale Pathogen-Besiedlung und damit letztlich die Anfälligkeit für Mittelohrinfectionen ließ bereits eine Studie erahnen, die eine signifikant erhöhte nasopharyngeale Bakterienbesiedlung bei australischen Aborigine-Kindern belegt (20). Diese Population weist bekanntermaßen eine erhöhte Prävalenz von OM auf (56). Aktuellere Studien zeigten erste konkrete genetische Variationen, nämlich im Beta Defensin Gen, welche die mikrobielle Besiedlung im Nasopharynx beeinflussen (57). Es stellte sich daher die Frage, ob CCL3 neben der Immunabwehr auf der Ebene der Mittelohrmukosa auch einen Einfluss auf die nasopharyngeale Bakterienflora hat und damit auf mehreren Ebenen einen attraktiven therapeutischen Ansatz für die Behandlung chronischer und schwerer Krankheitsverläufe darstellen könnte.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Alle Tierstudien wurden genehmigt durch das Animal Care und Use Committee des Veterans Affairs Medical Centers in San Diego, California, und streng nach den Empfehlungen des National Institutes of Health durchgeführt.

Bei den CCL-Genexpressionsstudien wurden Wildtyp (WT) C57/WB F1 Hybrid-Mäuse für Genarrays und C57BL/6 Mäuse für die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet. Bei den Experimenten zur Evaluation der OM und nasopharyngealen Besiedlung wurden sowohl Mäuse mit homozygotem CCL3-Gen-Knockout (B6.129P2-Ccl3<sup>tm1Unc/J</sup>), als auch gleichaltrige Wildtyp C57BL/6-Mäuse benutzt. Alle Versuchstiere wurden aus dem Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, USA, erworben, in unserer Einrichtung gezüchtet und unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

### 2.2 Vorbereitung der *NTHi*-Bakterienlösung

Für die experimentellen Mittelohrinfektionen wurde *Haemophilus influenzae* Stamm 3655 (nicht-typisierbar, *NTHi*/Biotyp II) verwendet, welcher ursprünglich aus einer klinischen Probe von einem OM-Patienten gewonnen wurde (58). Die Zuordnung zu Biotyp II basiert auf der Produktion von Indol, der Urease-Aktivität und der Ornithin-Decarboxylase-Reaktion. Die Biotypen I, II und III sind die häufigsten Formen von *NTHi* im oberen Atemtrakt, wobei II und III als non-invasiv gelten (59).

Eine *NTHi*-Stammlösung wurde bei -80°C in Brain Heart Infusion Medium (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI) mit 20% Glycerol aufbewahrt. Zur Gewinnung der Bakterienlösungen für die Versuche wurden aus der gefrorenen *NTHi*-Stammlösung mit einer sterilen Abstrichöse ca. 1 µl gewonnen, auf einer Schokoladenagar-Platte ausgestrichen und diese 24 h bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden zwei Kolonien in einer Nährlösung bestehend aus 25 ml BHI Medium mit 1 ml Fildes Enrichment (BD Diagnostic Systems) bei 37°C in einer Inkubations-Schüttelmaschine bei 30 g für 18h bebrütet. Die so entstandene Bakterienlösung, mit *NTHi* in der frühen stationären Wachstumsphase, wurde bei 1400g für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Bakterien resuspendiert in BHI und verdünnt auf Konzentrationen von ca. 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Bakterien/ml. Diese

Bakteriensuspensionen wurden auf Eis aufbewahrt und ausschließlich am gleichen Tag verwendet (31, 60).

## **2.3 Chirurgischer Eingriff**

Zur Narkose der Tiere wurde ein Gemisch aus folgenden Inhaltsstoffen intraperitoneal appliziert: 13,3 mg Ketamin-HCl/mL, 1,3 mg Xylazin/mL, 0,25 mg Acepromazin-Maleat/mL. Das Versuchstier wurde vorher gewogen, um die individuell geeignete Dosierung von 7,5 ml/kg Körpergewicht zu verabreichen. Der Eingriff fand unter sterilen Bedingungen statt. Die Inzision erfolgte in der Medianlinie des Halses. Anschließend wurde stumpf präpariert bis zur Exposition der knöchernen Bulla des rechten Mittelohrs. Mit der Spitze einer 21-Gauge Kanüle wurde vorsichtig ein Loch in den Knochen gebohrt. Mittels einer 23-Gauge Kanüle wurden anschließend 5 µl der vorbereiteten *NTHi*- bzw. Phosphate buffered Saline (PBS)-Lösung in die Paukenhöhle injiziert. Überlaufende Flüssigkeit wurde sofort mittels eines sterilen Wattetupfers aus dem Operationssitus entfernt. Das Loch wurde anschließend wieder durch die stumpf zur Seite geschobenen Faszien- und Muskelschichten verschlossen. Analog wurde daraufhin die Mittelohr-Bulla der linken Seite freipräpariert und *NTHi*- bzw. PBS-Lösung in die Paukenhöhle injiziert. Die Hautinzision wurde mittels Klammern verschlossen. Nach dem Eingriff wurden beide Trommelfelle unter dem Mikroskop visuell kontrolliert um eine Perforation auszuschließen. Postoperativ erhielten die Versuchstiere bedarfsadaptiert Ringer-Lösung und Buprenorphin und wurden bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose auf Wärmematten gelegt um die Körpertemperatur konstant zu halten (58, 61).

## **2.4 CCL Genexpressionsstudien**

Die folgenden Experimente zur CCL Genexpression sowie deren Analysen wurden von Prof. Dr. Allen Ryan und Dr. Arwa Kurabi durchgeführt.

### **2.4.1 Microarrays**

Zu den folgenden Zeitpunkten nach *NTHi*-Inokulation wurde aus 40 tief narkotisierten WT-Mäusen Mittelohrschleimhaut gewonnen: nach 0, 3 und 6 Stunden sowie 1, 2, 3, 5 und 7 Tagen. Das Gewebe wurde gesammelt, um daraus zwei Proben pro



Untersuchungszeitpunkt zu erhalten. In der Vergleichsgruppe wurde den Mäusen nur sterile PBS-Lösung injiziert. Mit Hilfe von TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) wurde das Gewebe homogenisiert und die enthaltene Gesamt-RNA extrahiert. Die Integrität der gewonnenen Gesamt-RNA-Probe wurde automatisiert bestimmt mittels RNA 6000 Labchip Kit und dem Agilent 2100 Bioanalyzer. Mittels Kapillarelektrophorese wurden die einzelnen Fraktionen der ribosomalen RNA (rRNA), messenger RNA (mRNA) oder fragmentierten RNAs aufgetrennt und visualisiert. Die verwendete Software analysiert nicht nur das 28S/18S-rRNA-Verhältnis, welches bei RNA-Degradierung typischerweise sinkt, sondern auch die Expression der anderen RNA-Fraktionen. Ein fertiger Software-Algorithmus bestimmt verlässlich durch Musteranalyse des Expressionsprofils die Probenqualität (62). Mit einem T7-oligo(dT) Primer wurde die mRNA der Probe revers transkribiert und anschließend *in vitro* transkribiert mittels T7 RNA-Polymerase, um Biotin-gelabelte cRNA-Stränge zu erzeugen. Pro Analysezeitpunkt wurden zwei verschiedene cRNA-Proben auf Affymetrix MU430 2.0 Microarrays hybridisiert, welche jeweils aus einem Pool von 20 unterschiedlichen WT-Mäusen gewonnen wurden, um unabhängige biologische Replikate zu erzeugen. Die Normalisierung der Rohdaten der Expressionsintensitäten erfolgte mittels Median-Normalisierung, das heißt, jeder Intensitätswert wurde durch den Median dividiert und so die Skalierung angepasst. Statistische Unterschiede der Expressionslevels der Gentranskripte zwischen den Vergleichsgruppen wurden mit dem Software-Package VAMPIRE (variance-modeled posterior interference) analysiert, welches ein bayessches Verfahren anwendet. Dazu sind grundsätzlich zwei Schritte notwendig: a) stochastische Modellierung der Fehlerstruktur der Probengruppen und b) Signifikanztestung mit *a priori* festgelegten Signifikanz-Schwellenwerten. VAMPIRE modelliert die vorliegende Fehlerstruktur, um das Signalrauschen abzugrenzen und die expressions-abhängigen und -unabhängigen Variationskoeffizienten zu bestimmen. Diese Methode erlaubt die Verwendung einer geringen Anzahl an Replikaten zur Evaluierung der Genexpression in einer ganzen Reihe von biologischen Versuchsbedingungen, mit zwei oder sogar nur einem Mikroarray pro Versuchsbedingung, wenn - wie in dieser Studie - viele Proben für jeden einzelnen Array gepooled werden. Dabei erzeugt jeder Array in sich selbst einen Mittelwert der verwendeten Replikate. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt wurden *NTHi*-infizierte mit nicht-infizierten Kontrollmäusen verglichen um jene Gene herauszufiltern, deren Expression sich nach *NTHi*-

Inokulation signifikant über die Zeit ändert. Fehler durch multiple Vergleiche wurden nach der Bonferroni-Methode korrigiert und Expressionsänderungen ab einem Wert  $\alpha_{\text{Bonf}} < 0,05$  als signifikant betrachtet. Alle CCL Gene, welche auf dem Microarray enthalten sind, wurden analysiert.

#### **2.4.2 Quantitative Echtzeit-PCR**

Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde die Expression von CCL2, CCL7 und CCL12 mRNA im Verlauf einer *NTHi*-induzierten OM in WT und CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen bestimmt. Die Versuchstiere wurden in separate Gruppen von jeweils drei Mäusen pro Zeitpunkt und Genotyp unterteilt. Zur Gewinnung der Gesamt-RNA aus dem Mittelohrgewebe wurde das RNeasy kit (Qiagen, Maryland, USA) verwendet. Die RNA wurde revers transkribiert mittels 25 µl SuperScrip III (Invitrogen, California, USA). 100 ng der gewonnenen cDNA wurden für die quantitativen Echtzeit-PCR Bestimmungen mittels StepOnePlus PCR-System (Applied biosystems, Foster City, USA) verwendet. Zur Vervielfältigung der cDNA-Templates wurden jeweils für CCL2, CCL3, CCL7 und CCL12 spezifische QuantiTect Primer (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Für jede Probe wurden in Duplikaten 12,5 µl 2<sup>x</sup>Sybr Green PCR Master Mix (Applied biosystems, Foster City, USA), einem fluoreszierendem DNA-Farbstoff, 2,5 µl Primer (10 µM), 5 µl cDNA und 5 µl RNA/DNA-freies Wasser (Molecular Biograde Water) zur Reaktion gebracht. Die PCR-Zyklen erfolgten für 10 Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen (insgesamt 30 Sekunden) bei 94°C, anschließend 30 Sekunden bei 60°C und schließlich 40 Sekunden bei 72°C. Die Menge der ursprünglich vorliegenden cDNA-Templates wird als cycle of threshold-Wert (C<sub>t</sub>) ausgedrückt. Der C<sub>t</sub>-Wert drückt den Zeitpunkt bzw. den Zyklus der PCR aus, an dem erstmals das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrundwert liegt. Je mehr Kopien des Zielgens in der ursprünglichen Probe vorhanden waren, desto früher übersteigt die Fluoreszenz diesen Schwellenwert und desto niedriger ist folglich der C<sub>t</sub>-Wert. Normiert wird die Transkriptmenge der Zielgene, ausgedrückt als C<sub>t</sub>-Werte, durch Subtraktion des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) C<sub>t</sub>-Wertes als Referenz-Gen. Dabei erhält man den  $\Delta C_t$ -Wert. Die relative Expression der Zytokine wird schließlich als Differenz zwischen den  $\Delta C_t$ -Werten der CCL3<sup>-/-</sup>- und WT-Gruppe als  $\Delta \Delta C_t$ -Wert angegeben. Zur qualitativen Untersuchung des PCR-Produktes, das heißt zur Reinheitskontrolle der erzeugten Amplifikate, erfolgte nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird unter

kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur im PCR-Gefäß schrittweise erhöht. Bei einer für das jeweilige Amplifikat spezifischen Temperatur wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgetrennt und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, wodurch die gemessene Fluoreszenz abnimmt. PCR-Produkte mit großem Anteil unspezifischer Amplifikate haben dabei typischerweise einen niedrigeren Schmelzpunkt, wodurch eine Unterscheidung möglich ist. Die Ergebnisse (siehe Anlage 1, Figure 5) werden als n=2 Replikate mit Fehlerbalken dargestellt, welche das 95% Konfidenzintervall abbilden.

## 2.5 Histologie

Die folgenden Experimente zur histologischen Evaluation der Mittelohrinflammation wurden von Dominik Deniffel, Brian Nuyen und Jun Hung, die Datenanalyse/statistische Auswertung wurde von Dominik Deniffel ausgeführt. Der Beitrag von Dominik Deniffel an den Experimenten beläuft sich auf die Mittelohrhistologie an den Tagen 1 bis 10 nach *NTHi*-Inokulation (chirurgische Eingriffe, histologische Präparation, Ausmessen der Mittelohrschleimhaut, Evaluation der Leukozyteninfiltration, Auszählung der Zellpopulationen). CCL3<sup>-/-</sup> und WT-Mäuse wurden in Gruppen von mindestens 3 Mäusen unterteilt, für jeden der Beobachtungszeitpunkte des Experimentes. Die Versuchstiere erhielten zunächst eine Narkose, analog zum chirurgischen Eingriff. Zur Tötung der Maus wurde PBS, gefolgt von 4%igem Paraformaldehyd (PFA) intrakardial appliziert. Die intakten, unter dem Mikroskop freipräparierten Mittelohren wurden von unbehandelten Tieren (0) sowie 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 und 21 Tage nach *NTHi*-Inokulation gewonnen. Anschließend wurde das Gewebe für 14 Tage in 8%iger Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 4%iger PFA-Lösung entkalkt. Danach wurden die Mittelohren in Paraffin-Blöcke eingebettet und in 9µm-Schichten geschnitten. Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der standardisierten Region des Mittelohres mit dem größten Durchmesser der Paukenhöhle wurden digital aufgenommen und mit der Analyse-Software NIH Image-Pro (61) ausgewertet. An sechs ebenfalls standardisierten Stellen eines Schnittbildes wurden die Dicke des Epithels und des subepithelialen Stromas ausgemessen. Die Messungen erfolgten in einem Areal von ca. 500 µm, in der Schnittebene der Eustachischen Röhre, jedoch nicht direkt benachbart zu dessen Mündungsstelle (61). Die Mittelwerte der

jeweiligen Messungen wurden addiert, um die Gesamtdicke der Mittelohr-Mukosa zu bestimmen.

Die Standardisierung der Messregion ist wichtig zur Reduzierung der Varianz der Messwerte. Unterschiedliche Regionen des Mittelohrs zeigen unterschiedliche Ausprägungen von Schleimhauthyperplasie. Eine Messung der Mukosa in direkter Nachbarschaft zur Eustachischen Röhre beispielsweise würde eine deutlich geringere Mukosa-Hyperplasie zeigen. Außerdem können Regionen, welche aufgrund ihrer Oberflächenspannung eher zu Akkumulation von Zellen und Flüssigkeit neigen, wie z.B. die Rundfenstermembran-Nische, eine gesteigerte Immunantwort und eine verzögerte Ausheilung der Mittelohrinfection vortäuschen (58).

Zur relativen und indirekten Messung der Entzündungszell-Zahlen im Mittelohr wurden diejenigen Schnittebenen digital aufgezeichnet, welche die maximale Menge an Zellen in der Paukenhöhle aufzeigen. Auf jenen Schnittbildern wurde die Fläche ausgemessen, welche durch Entzündungszellen bedeckt wird. Das Gesamt-Lumen des Mittelohrs wurde in denselben standardisierten Schnittebenen ausgemessen, welche auch für die Mukosa-Messungen verwendet wurden. Mithilfe der Bildanalyse-Software NIH Image-Pro wurde schließlich der prozentuale Anteil berechnet, den die Entzündungszellen in der standardisierten Mittelohr-Fläche einnehmen (61).

Darüber hinaus wurden die Dichte der zellulären Mittelohr-Infiltrate und die jeweiligen Proportionen an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bestimmt. Dazu wurden für jedes Mittelohr die beiden größten Zellcluster bei 400x Vergrößerung fotografiert und die jeweiligen Zelltypen manuell gezählt von zwei unabhängigen Untersuchern, welche für den Genotyp verblindet waren. Die Ergebnisse aller histologischen Messungen wurden als Mittelwerte angegeben.

## **2.6 Mittelohrkulturen**

Die Experimente zur bakteriellen Besiedlung und Klärung der Mittelohren wurden von Dominik Deniffel, Brian Nuyen, Kwang Pak und Dr. Keigo Suzukawa, die Datenanalyse/statistische Auswertung wurde von Dominik Deniffel ausgeführt. Der Beitrag von Dominik Deniffel an den Experimenten beläuft sich auf Mittelohren von Wildtyp und CCL3-Knockout-Mäusen an den Tagen 1 bis 10 nach *NTHi*-Inokulation (chirurgische Eingriffe, bakteriologische Untersuchungen).

Die *in vivo*-Eliminierung von *NTHi* aus dem Mittelohr wurde in insgesamt 36 CCL3<sup>-/-</sup> und 38 WT Mäusen ermittelt. Dazu wurde mittels einer sterilen Abstrichöse eine ca. 1 µl-Probe aus der eröffneten Paukenhöhle gewonnen. Dies geschah jeweils bei nicht inokulierten Kontrolltieren (0) bzw. 1, 2, 3, 5, 10, 14 und 21 Tage nach Inokulation der *NTHi*-Bakterienlösung. Die Abstrichöse wurde dabei sukzessive über alle 4 Quadranten einer Schokoladenagar-Kulturplatte ausgestrichen. An jedem der Beobachtungszeitpunkte wurden so Proben von mindestens 6 Mittelohren pro Mäuse-Gruppe gewonnen. Die Kulturplatten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert, bevor die Bakterienkolonien analysiert wurden. Der Nachweis von  $\geq 1$  *NTHi*-Kolonie auf der Platte wurde als positiv bezüglich *NTHi*-Besiedlung gewertet. Die Rate der bakteriellen Besiedlung in % errechnet sich als der Anteil *NTHi*-positiver Mittelohrkulturen unter allen am jeweiligen Beobachtungszeitpunkt gewonnenen Kulturen des jeweiligen Mäusestammes.

Zur Veranschaulichung des Ausmaßes der bakteriellen Besiedlung wurde zusätzlich ein semiquantitatives Bewertungs-System verwendet, welches bereits in vorherigen Arbeiten Anwendung fand (32): 0 signalisiert keine Colony-forming units (CFUs), 1 steht für CFUs in einem Quadranten, 2 für CFUs in zwei Quadranten, 3 für CFUs in drei Quadranten und 4 für CFUs in allen vier Quadranten.

Falls eine Kontamination einer Schokoladenagar-Platte mit anderen Bakterienspezies vermutet wurde, z.B. wenn Bakterienkolonien mit abweichender Morphologie zu sehen waren, wurden diese auf Blutagar-Platten und Bacitracin-haltigen Schokolagenagar-Platten ausgestrichen und bebrütet. *Haemophilus spp.* wachsen typischerweise nicht auf Blutagar-Platten, da die essenziellen Wachstumsfaktoren Faktor V und X fehlen. Gegen das Antibiotikum Bacitracin hingegen sind *Haemophilus spp.* weitgehend resistent und zeigen daher ungehindertes Wachstum auf Bacitracin-haltigen Kulturmedien, welche das Wachstum anderer Vertreter der respiratorischen oder Hautflora, beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, hemmen (63).

## 2.7 Nasopharynx-Kulturen

Die folgenden Experimente wurden von Dominik Deniffel und Brian Nuyen, die Datenanalyse/statistische Auswertung wurde von Dominik Deniffel durchgeführt.

Zur Bestimmung der Bakterienlast in der nasopharyngealen Nische von WT- und CCL3-Gen-Knockout-Mäusen wurden Abstriche der nasopharyngealen Schleimhaut von tief narkotisierten Tieren gewonnen. Zunächst wurden etwa 7 µl steriles PBS in eines der chirurgisch freigelegten Mittelohren injiziert, wobei ein kleiner Anteil der Flüssigkeit über die Eustachische Röhre in den Nasopharynx abfloss. Anschließend wurde mittels einer sterilen Abstrichöse eine ca. 1 µl-Probe aus dem Nasopharynx gewonnen, welche mit Hilfe dieser Methode Bakterien des Tubenostiums enthält, dessen Schleimhaut durch die umgebenden Schleimhautvorwölbungen, den Torus tubarius und den Torus levatorius, sonst nur schwer zugänglich ist.

Proben von jeweils 6 WT- und 8 Knockout-Tieren wurden direkt auf Schokoladen-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C bebrütet. Alle CFUs auf den Kulturplatten, ungeachtet der bakteriellen Spezies, wurden anschließend manuell gezählt. Zur Sicherstellung von akkuraten Ergebnissen wurden alle Zählungen dreifach durchgeführt.

## **2.8 Blutkulturen**

Die folgenden Experimente und Datenanalysen wurden von Dominik Deniffel und Brian Nuyen durchgeführt.

Zum Ausschluss einer Bakteriämie der Versuchstiere wurden Blutproben der gleichen 14 Mäuse (6-8 pro Mäusespezies) gewonnen, welche auch für die Nasopharynx-Kulturen verwendet wurden. 24 h nach PBS-Inokulation in das Mittelohr wurden die tief narkotisierten Tiere intrakardial punktiert und ca. 1 µl der so gewonnenen Blutprobe mittels steriler Abstrichöse auf einer Schokoladenagar-Platte ausgestrichen, welche bei 37°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ausgelesen wurde.

## **2.9 Phagozytose-Assay und Killing-Assay mit Peritonealmakrophagen**

Die folgenden Experimente wurden von Brian Nuyen und Kwang Pak, die Datenanalyse/statistische Auswertung wurde von Dominik Deniffel durchgeführt.

Um die *in vitro*-Kapazität der Makrophagen für Phagozytose und Abtötung von *NTHi* zu bewerten, wurden Peritonealmakrophagen mit überlebensfähigen Bakterien inkubiert, um eine Internalisierung dieser zu ermöglichen (30, 32).

Peritonealmakrophagen wurden aus jeweils sechs CCL3<sup>-/-</sup> und sechs WT Kontroll-

Mäusen gewonnen. Zunächst wurden die ortsständigen Makrophagen durch intraperitoneale Injektion von 3 ml Thioglykolat-Medium aktiviert, welches eine aseptische Peritonitis auslöst und die Makrophagen mobilisiert. Drei Tage später wurden die Zellen durch Peritoneal-Lavage mit ca. 10 ml gekühltem Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (Sigma), welchem 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin mit β-Mercaptoethanol zugesetzt wurden, geerntet. Die gewonnene Lavageflüssigkeit enthält eingewanderte Leukozyten, überwiegend Makrophagen, welche anschließend zwei- bis dreimal mit PBS-Lösung gewaschen werden. Anschließend wurden die Zellen erneut resuspendiert in Medium, analog zum oben genannten Lavage-Medium, und bei 37°C und 5%iger-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gezüchtet. Die Zellen wurden anschließend auf 48-Well-Platten mit einer Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well ausgesät. Für jede Maus und jeden Beobachtungszeitpunkt wurde das Experiment jeweils dreifach durchgeführt.

Zur Gewinnung einer Bakterienlösung mit *NTHi* in der mittleren exponentiellen Phase wurden zwei *NTHi*-Kolonien einer Schokoladenagar-Platte (nachdem diese 24 h bei 37°C inkubiert wurde) in einem Nährmedium, welches aus 25 ml BHI Medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) mit 1 ml Fildes Enrichment (BD Diagnostic Systems) besteht, suspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 37°C in einer Inkubations-Schüttelmaschine bei 30 g für 3-4 h inkubiert und anschließend mit 1400 g bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und in PBS resuspendiert (60). Zehn Mikroliter (entsprechen ca. 5 x 10<sup>7</sup> Bakterien) wurden jedem Well zugefügt. Um sicherzustellen, dass die Makrophagen bei dieser Menge an *NTHi* nicht gesättigt sind und um damit funktionelle Unterschiede zwischen den Mäusegruppen sichtbar machen zu können, wurden in vorherigen Studien Makrophagen bereits mit 5 x 10<sup>8</sup> Bakterien/ Well inkubiert. Die 10-mal höheren Konzentrationen resultierten dabei in einer deutlich gesteigerten Aufnahme von *NTHi* (30).

Um den Kontakt zwischen Bakterien und Makrophagen zu optimieren, wurden die Zellkultur-Mikroplatten mit 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden sie für 1 h bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand mit nicht phagozytierten, extrazellulären Bakterien abpipetiert und die Wells mit warmem Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well frisches Medium, bestehend aus DMEM mit 10% FBS, Makrophagen-Colony Stimulating Factor (CSF) und Gentamicin, mit 50 µg/ml zugefügt. Somit

wurde gewährleistet, dass nach den Waschvorgängen verbliebene extrazelluläre Bakterien abgetötet wurden, ohne dabei auf bereits phagozytierte Bakterien einzuwirken, da Gentamicin die Phagozyten nicht penetriert. In vorherigen Versuchen wurde eine Konzentration von 1 µg/ml als minimal notwendige Konzentration von Gentamicin zur Abtötung von extrazellulär verbliebenen *NTHi*-Bakterien ermittelt (30).

Die verbleibenden Mono-Zellschichten aus Makrophagen mit intrazellulären *NTHi*-Bakterien wurden für 1 h oder 3 h inkubiert. Die Zellen wurden nach diesen Zeitspannen gewaschen und lysiert mit 0,5 ml sterilem und pyrogenfreiem Wasser. Das Zell-Lysat wurde danach fünf Mal mit einer 23-Gauge-Spritze aspiriert. Das Zell-Lysat mit Überstand wurde anschließend auf einer Schokoladenagar-Platte in seriellen Verdünnungen von 1:1 bis 1:10<sup>5</sup> ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und das Bakterienwachstum auf den Kulturplatten anschließend durch manuelles Zählen der CFUs evaluiert. Für jede der beiden Mäusegruppen und Beobachtungszeitpunkte wurden 6 Wells verwendet. Die Menge an Bakterien, welche nach 1 h Einwirkung von Gentamicin aus den Zell-Lysaten kultiviert werden konnte, wurde zur Bewertung der Phagozytose herangezogen. Zur Beurteilung des intrazellulären Abtötens von *NTHi*, ähnlich wie in anderen zuvor publizierten Assays (32, 52), wurde das Verhältnis von verbliebenen *NTHi*-Bakterien 3 h zu 1 h nach Gentamicin-Applikation bestimmt. Zur Berechnung des Prozentsatzes an abgetöteten *NTHi*-Bakterien wurde die folgende Formel benutzt, welche ebenfalls in vorherigen Arbeiten bereits beschrieben wurde (52):

Killing % =  $[1 - (\text{Anzahl an CFUs aus getestetem Well nach 3 h Gentamicin-Einwirkung} / \text{Anzahl an CFUs aus getestetem Well nach 1 h Gentamicin Einwirkung}) \times 100]$ .

## 2.10 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 durchgeführt. Die in den Grafiken präsentierten Daten werden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden ab  $p < 0,05$  als signifikant gewertet. Für die Messdaten der Mukosadicke wurden zweifaktorielle ANOVA Varianz-Analysen mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt.



Der exakte Fisher-Irwin-Test wurde zur Bewertung der statistischen Signifikanz der prozentualen Anteile positiver Mittelohr-Bakterienkulturen verwendet.

Für Daten ohne Normalverteilung, wie der Analyse von Entzündungszellen im Mittelohr, den CFU-Zählungen aus Nasopharynx-Proben bzw. *NTHi*-Lysaten aus den Phagozytose Assays, wurde der Mann-Whitney U Test angewandt.

Zur Überprüfung, ob eine Normalverteilung vorliegt, wurde der D'Agostino-Pearson-Test durchgeführt.

Angeichts der Knappheit und Kosten von Knockout-Mäusen, sowie auch aus ethischen Beweggründen zur Einsparung von Versuchstieren, wurden für alle Experimente das rechte und linke Ohr als unabhängig voneinander betrachtet und entsprechend auch unabhängig voneinander analysiert, basierend auf folgenden Überlegungen und Berechnungen aus vorherigen Arbeiten (61, 64):

- 1) Die individuellen Mäuse der Experimente stammten aus langen Inzuchtlinien und damit einer genetisch homogenen Population. Aus genetischen Gesichtspunkten entstammt also jedes Ohr einer Versuchsgruppe aus dem gleichen Versuchstier.
- 2) In allen Messreihen der oben genannten Veröffentlichungen entsprach der Variationskoeffizient der voneinander getrennt betrachteten rechten und linken Seite dem Variationskoeffizienten, der sich unter Einbeziehung aller Ohren der Versuchsgruppe ergibt. Dies zeigt, dass die Varianz der Messwerte zwischen zwei Ohren des gleichen Individuums der Varianz zwischen unterschiedlichen Individuen entspricht.
- 3) Für jede Variable wurden gepaarte t-Tests zum Vergleich der linken und rechten Seite einer Mäuse-Versuchsgruppe durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten.
- 4) Bei zweifaktorieller ANOVA zeigte sich an keinem Beobachtungszeitpunkt ein signifikanter Effekt der Seite oder eine signifikante Interaktion zwischen Beobachtungszeitpunkt und Seite.
- 5) In einer dreifaktoriellen ANOVA ergab sich für den Haupteffekt der Variable „Seite“ keine signifikante Wirkung auf die Messgröße. Darüber hinaus konnte

kein weiterer Interaktionseffekt zwischen den Variablen "Seite" und "Beobachtungszeitpunkt" festgestellt werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Regulation der CCL Gene bei akuter Otitis media

Im Laufe einer akuten *NTHi*-induzierten OM in WT Mäusen wird eine signifikant gesteigerte Expression für sieben CCL Gene verzeichnet: CCL2, CCL3, CCL4, CCL6, CCL7, CCL12, CCL20.

Die Expressionsprofile lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- a) maximaler Expressionsanstieg in der frühen Infektionsphase (3-24 Stunden nach *NTHi*-Inokulation, z.B. CCL4, CCL20),
- b) maximaler Expressionsanstieg in der späteren Infektionsphase (2-3 Tage nach *NTHi*-Inokulation, z.B. CCL6, CCL7, CCL12) oder
- c) deutlicher Expressionsanstieg in beiden Infektionsphasen (z.B. CCL2, CCL3).

Der letztgenannten Kategorie ist auch CCL3 zuzuordnen, welches, mit einem 600-fachen Expressionsanstieg an Tag 1 und über 100-facher Expressionssteigerung zwischen 3 Stunden und 3 Tagen *post inoculationem*, das am stärksten exprimierte CCL-Gen im Mittelohr darstellt (siehe Anlage 1, Figure 1). Dieser

Expressionszeitraum korreliert mit der stärksten Entzündungsantwort in immunkompetenten WT-Mittelohren (siehe Anlage 1, Figures 2 und 3). Die Expressionsänderungen ließen sich gleichermaßen in beiden unabhängigen Gewebeproben und jeweils auf beiden Genarrays reproduzieren. Kontroll-Mäuse, welchen nur PBS in das Mittelohr injiziert wurde, zeigen deutlich geringere Expressionsänderungen der CCL Gene, übereinstimmend mit dem Großteil aller anderen regulierten Gene (28). Beispielsweise beträgt in den PBS-inokulierten Kontroll-Mäusen die Expressionssteigerung von CCL3 nur 3% von derjenigen in *NTHi*-inokulierten Tieren.

#### 3.2 Verstärkte Mukosahyperplasie in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren

An den ersten 3 Tagen nach *NTHi*-Inokulation zeigen beide Genotypen eine deutliche Hyperplasie der Mittelohrmukosa, ohne signifikante Unterschiede. CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren zeigen eine signifikant gesteigerte Schleimhauthyperplasie an Tag 5 ( $P < 0,001$ ), 7 ( $P < 0,01$ ) und 10 ( $P < 0,05$ ) post-*NTHi*-Infektion (siehe Anlage 1, Figure 2A, B).

### **3.3 Verzögerter, jedoch langanhaltender Einstrom von Leukozyten in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren**

Der initiale Leukozyten-Einstrom in das Mittelohrlumen von CCL3<sup>-/-</sup> Tieren, 1 Tag nach *NTHi*-Instillation, ist signifikant verringert ( $P < 0,01$ ). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zeigen sich an den Tagen 2 und 7, während in der späteren Infektionsphase (Tag 10:  $P < 0,01$  und Tag 14:  $P < 0,05$ ) deutlich mehr Entzündungszellen in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren beobachtet werden (siehe Anlage 1, Figure 3A).

Neutrophile Granulozyten sind der dominierende Zelltyp in den Mittelohr-Infiltraten im gesamten Beobachtungszeitraum. In den CCL3-Knockout-Tieren erreicht der Neutrophilen-Einstrom, nach einer kurzen initialen Verzögerung, am 2. Tag sein Maximum mit signifikant erhöhter Anzahl verglichen mit WT Mäusen ( $P < 0,05$ ). Anschließend sinken die Neutrophilenzahlen in Exsudaten beider Genotypen, bleiben jedoch in CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen an den Tagen 7, 10 ( $P < 0,01$ ) und 14 ( $P < 0,05$ ), verglichen mit WT Mäusen (siehe Anlage 1, Figure 3B), signifikant erhöht.

Makrophagen werden ab dem 2. Tag in Mittelohr-Exsudaten beider Genotypen detektiert. In CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren persistieren Makrophagen länger, mit signifikant erhöhten Zellzahlen an den Tagen 7 ( $P < 0,01$ ), 10 und 14 ( $P < 0,05$ ; siehe Anlage 1, Figure 3C).

In einigen CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren können noch an Tag 21 neutrophile Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden.

### **3.4 Verzögerte bakterielle Klärung des Mittelohres in CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen**

An den ersten 5 Tagen nach *NTHi*-Infektion finden sich keine signifikanten Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung der Mittelohren beider Mausstämme. Nach dem 5. Tag werden CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren signifikant häufiger mit *NTHi* besiedelt ( $P < 0,01$  an Tag 10 und  $P < 0,05$  an Tag 14). An Tag 21 nach *NTHi*-Inokulation, dem letzten Untersuchungszeitpunkt, werden keine *NTHi*-Stämme mehr aus WT Mittelohren kultiviert, während dies in einigen CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren im gesamten Untersuchungszeitraum möglich ist (siehe Anlage 1, Figure 4).

### **3.5 CCL Genexpression in Abwesenheit von CCL3**

In mehreren Gen-Knockout-Studien wurden kompensatorische Expressionsänderungen in Genen mit redundanten Funktionen berichtet. In dieser Arbeit wurden daher mithilfe von qPCR die Expression von CCL2, CCL7 und CCL12 in Mittelohren von WT und CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen während einer OM verglichen. Die getesteten Gene wurden ausgewählt, da sie jeweils in WT Mäusen annähernd im gleichen Zeitintervall exprimiert werden wie CCL3 (siehe Anlage 1, Figure 1). In der qPCR zeigt die Expression von CCL2 keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen. In beiden Mäusespezies präsentiert CCL2 dasselbe biphasische Expressionsprofil, welches auch in den Genearray-Studien in WT Mäusen beobachtet werden kann (siehe Anlage 1, Figure 1).

Die Expression von CCL7 und CCL12 ist in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren 6 Stunden und 2 Tage nach *NTHi*-Inokulation signifikant erhöht. Auch im Falle dieser beiden CCL Gene lässt sich übereinstimmend in den qPCR- und Genearray-Studien in beiden Mäusespezies eine biphasische Antwort erkennen.

### **3.6 Geschwächte bakterielle Phagozytose von CCL3<sup>-/-</sup>**

#### **Peritonealmakrophagen bei intakter intrazellulärer Abtötung**

Die Phagozytoseaktivität und Kapazität zur intrazellulären Abtötung wurden in einem etablierten *in vitro* Assay mit Peritonealmakrophagen aus beiden Mausstämmen bestimmt. Die Phagozytoseaktivität in CCL3<sup>-/-</sup> Makrophagen ist, verglichen mit WT-Makrophagen, signifikant reduziert ( $P < 0,01$ ). Die intrazelluläre Abtötung von phagozytierten *NTHi* zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen CCL3<sup>-/-</sup> und WT Makrophagen.

### **3.7 Erhöhte bakterielle Dichte im Nasopharynx von CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen**

Die mittlere Anzahl an kultivierten Bakterienkolonien aus dem Nasopharynx von CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen ist signifikant höher, verglichen mit WT Mäusen ( $P < 0,05$ ; siehe Anlage 1, Figure 7). Alle Versuchstiere zeigen negative Blutkulturen.

### **3.8 Zusammenfassung**

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass während einer akuten OM zahlreiche CCL Gene reguliert und vermehrt exprimiert werden, wobei CCL3 die höchste

Expressionssteigerung aufweist. Die genetische Deaktivierung von CCL3 hat einen signifikanten Effekt auf die Pathogenese und das Ausheilen einer *NTHi*-induzierten OM. Dies konnte demonstriert werden an einer verzögerten initialen Rekrutierung von Entzündungszellen, ihrer verlängerten Persistenz im Mittelohr (siehe Anlage 1, Figure 3 A-C), einer verlängerten Entzündungsreaktion im Mittelohr (Graphiken 2 und 3 der Originalpublikation) und einer verzögerten Bakterieneliminierung, wobei in einigen Mittelohren selbst 21 Tage nach *NTHi*-Inokulation noch eine Infektion nachgewiesen wurde (siehe Anlage 1, Figure 4 und Table 1). Passend zu diesen Beobachtungen wurde eine verminderte Kapazität der CCL3-defizienten-Makrophagen zur Phagozytose von *NTHi*, sowie eine erhöhte bakterielle Besiedlung des Nasopharynx in nicht infizierten CCL3-Knockoutmäusen demonstriert (siehe Anlage 1, Figures 6 und 7).

## 4 Diskussion

### 4.1 Expressionsprofil der CCL Gene

Die Expression von CCL Genen im Mittelohr zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem initialen Peak in den ersten Stunden nach der *NTHi*-Inokulation, einer sich anschließenden reduzierten Expression bei 24 Stunden und einem zweiten Peak bei 48 - 72 Stunden. Dieses Muster wurde übereinstimmend in den Ergebnissen der Genearray- und qPCR-Studien nachgewiesen (siehe Anlage 1, Figures 1 und 5). Vorausgehende Studien zeigten analoge Expressionsprofile im gesamten Transkriptom des Mittelohres von WT Mäusen während einer akuten Mittelohrinfection (28). Über die physiologische Bedeutung dieser Abfolge kann nur spekuliert werden. Die Expressionssteigerungen der CCL Gene stehen möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Entzündungsreaktion. Der frühe Peak der CCL Expression folgt der initialen Entzündungsantwort auf *NTHi*. Der spätere Peak könnte als Antwort auf die Entzündungsreaktionen gewertet werden, welche durch neutrophile Granulozyten und Zytokine ausgelöst wird. Neutrophile zeigen ungefähr 24 Stunden nach *NTHi*-Inokulation einen Peak hinsichtlich ihrer Anzahl im Mittelohr (siehe Anlage 1, Figure 3B) und proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF-alpha hinsichtlich ihrer mRNA-Expression (28).

### 4.2 Bedeutung von CCL3 für die Immunabwehr des Mittelohres

#### 4.2.1 Leukozytenrekrutierung bei CCL3-Gendeletion

##### 4.2.1.1 Verzögerter initialer Leukozyteneinstrom

Die verzögerte initiale Rekrutierung von Leukozyten in das Mittelohr, welche in CCL3<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT Mäusen signifikant reduziert war (siehe Anlage 1, Figure 3A), ist im Einklang mit der etablierten Rolle dieses Chemokins, der Chemoattraktion und Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten (39, 40, 41, 65, 66). Typisch für die frühe Entzündungsreaktion, wie an anderen Lokalisationen bereits demonstriert wurde, sind neutrophile Granulozyten die ersten nachweisbaren Immunzellen im Mittelohr, gefolgt von Makrophagen 1-2 Tage später (67, 68, 69). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die initiale Zelleinwanderung von Granulozyten in das Mittelohr entscheidend durch CCL3 gesteuert wird.

#### **4.2.1.2 Zeitlicher Verlauf der Leukozytenrekrutierung in Einklang mit CCL3-Genexpression**

Der Einstrom von neutrophilen Granulozyten korreliert mit dem zeitlichen Verlauf der CCL3-Genexpression während einer *NTHi*-induzierten OM in immunkompetenten WT-Mäusen (siehe Anlage 1, Figures 1 und 3B): nach einem rapiden Anstieg erreicht die CCL3-Genexpression 1 Tag nach der *NTHi*-Infektion ihr Maximum. Daraufhin fällt das Expressionslevel wieder rapide ab, um am Tag 7 post-*NTHi*-Infektion wieder nahezu das Ausgangsniveau zu erreichen.

Der initiale Einstrom von Makrophagen in das Mittelohrlumen wird durch das Fehlen von CCL3 nicht beeinflusst. Tatsächlich ist CCL3 jedoch für eine potente Chemoattraktion von Makrophagen bekannt (41). Es scheint, als seien in den späteren Infektionsstadien, nach dem initialen Einstrom der neutrophilen Granulozyten, andere chemotaktisch aktive Substanzen mit redundanten Funktionen in der Lage, das Fehlen von CCL3 zu kompensieren und in diesem Knockout-Modell die Rekrutierung von Makrophagen zu übernehmen. Potentielle Kandidaten sind CCL7 und CCL12, welche eine erhöhte Expression in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren zeigen (siehe Anlage 1, Figure 5). Weitere mögliche Kandidaten finden sich in einer zuvor veröffentlichten Studie, in der das gesamte Transkriptom einer *NTHi*-Mittelohrinfection analysiert wurde. Neben CCL3 zeigten unter allen Chemokinen folgende die höchsten Expressionslevels: CXCL2, CXCL3 und CXCL10 (28).

#### **4.2.1.3 Intakte Leukozytenrekrutierung**

Angesichts der angenommenen Rolle von CCL3 als chemotaktisch aktive Substanz in der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Krankheitsbilder (39) und seiner erhöhten Expression während einer Mittelohrinfection (siehe Anlage 1, Figure 1) ist folgende Beobachtung unerwartet: die Rekrutierung von Entzündungszellen in das Mittelohr der CCL3-Knockout-Mäuse ist insgesamt intakt, obgleich die Entzündungszellen verzögert einströmen (siehe Anlage 1, Figure 3A). In Widerspruch zu diesen Ergebnissen berichteten andere Studien mit CCL3-defizienten Mäusen von verminderter Leukozyteninfiltration (70, 71, 72, 73). Übereinstimmend hingegen mit den Ergebnissen dieser Arbeit war die Rekrutierung von Entzündungszellen bei CCL3-Knockout-Modellen mit pulmonaler Infektion (67) und Periodontitis (74) ebenfalls nicht reduziert. Ein Erklärungsansatz für diese unterschiedlichen Phänotypen bei CCL3-Gendeletion ist die abweichende Bedeutung



und Präsenz redundanter Substanzen an den jeweils unterschiedlichen Infektions-Lokalitäten und bei den unterschiedlichen entzündlichen Krankheitsbildern.

#### **4.2.2 Funktionelle Redundanz von Chemokinen und anderen Botenstoffen**

Das Thema der funktionellen Redundanz von Chemokinen wurde ausgiebig in der jüngsten Literatur diskutiert. Chemokin-Rezeptoren sind promiskuitiv, das heißt sie können verschiedene Chemokine binden und durch diese gleichermaßen aktiviert werden. Chemokine wiederum binden mit hoher Affinität an mehrere unterschiedliche Rezeptoren. So sind CCR1 und CCR5, die beiden Rezeptoren, welche CCL3 binden können, nicht selektiv für dieses Chemokin. CCR5 kann beispielsweise ebenfalls CC chemokine ligand 5 (RANTES) und Macrophage inflammatory Protein-1 beta (CCL4) binden, wobei beide letztgenannten Chemokine bekanntlich überlappende Funktionen mit CCL3 ausüben. Zusätzlich existieren noch andere Chemokine, wie CCL2, CCL7 und CCL12, sowie Zytokine, wie z.B. Monocyte chemotactic Peptide-1 (MCP-1) und Macrophage inhibitory Factor (MIF), welche an andere Rezeptoren binden und denen ebenfalls eine mitwirkende Rolle an der Leukozyten-Migration zugesprochen wird (40, 75). Die Hypothese einer partiellen Kompensation der CCL3-Gendeletion durch eine vermehrte Expression redundanter Substanzen wird unterstützt durch zwei weitere Arbeiten mit CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen in anderen Organsystemen, welche gleichermaßen Redundanz und verstärkte Expression alternativer Chemokine als Mechanismus für die Kompensation einer CCL3-Gendeletion vermuten (74, 76). In dieser Arbeit wurde die Genexpression von CCL2, CCL7 und CCL12 in WT und CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen evaluiert. Diese Chemokine werden bei einer akuten Mittelohrinfection im selben Zeitintervall vermehrt exprimiert wie CCL3. Die Expressionslevel für CCL7 und CCL12 in CCL3-defizienten Mittelohren waren signifikant erhöht, was vereinbar ist mit einer kompensierenden Hochregulierung. Darüber hinaus sind aber sicherlich noch weitere Chemokine und Zytokine an der Kompensation einer CCL3-Deletion beteiligt.

#### **4.2.3 Prolongierte Entzündungsreaktion in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren**

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen verweilen länger in den Mittelohren von CCL3<sup>-/-</sup> Tieren, verglichen mit WT Tieren, entsprechend den Ergebnissen früherer Studien mit Antikörper-induzierter Blockade von CCL3 (30), bei jedoch noch längerer Präsenz im Genmodell. Dieses längere Verweilen der Entzündungszellen und die

signifikant verlängerte und verstärkte Schleimhautschwellung im Mittelohr scheinen in erster Linie mit der längeren Präsenz von *NTHi*-Bakterien zusammenzuhängen, welche die Entzündungsreaktion durch Aktivierung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems initiieren und aufrecht erhalten. Dieser Zusammenhang konnte bereits bei anderen Defekten des angeborenen Immunsystems beobachtet werden (30, 32, 34).

Wichtiger Faktor für die bakterielle Persistenz im Mittelohr ist sicherlich die verminderte Phagozytosekapazität der CCL3<sup>-/-</sup> Makrophagen. Entzündungszellen strömen in suffizienten Mengen in das Mittelohr ein (siehe Anlage 1, Figure 3 A-C), was den funktionellen Defekt der professionellen Phagozyten weiter unterstreicht. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind eine verzögerte bakterizide Aktivität von neutrophilen Granulozyten, was wiederum eine erhöhte Replikationsrate von *NTHi* zulässt, und eine ausbleibende Aktivierung der verzögert eintreffenden Neutrophilen durch CCL3.

#### **4.2.4 Funktionelle Beeinträchtigung der CCL3<sup>-/-</sup>-Makrophagen**

Vorausgehende Studien mit Makrophagen aus CCL3<sup>-/-</sup> Tieren demonstrierten eine verminderte Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa* (52) und *Klebsiella pneumoniae* (67), übereinstimmend mit der defekten Phagozytose von *NTHi* in den vorliegenden Experimenten. Weitere Arbeiten lieferten im Vorfeld zusätzliche Hinweise auf die Bedeutung von CCL3 für die Funktion von Makrophagen: durch die Gabe von CCL3 konnten in Makrophagen mit genetischem Mangel an TLR2, MyD88, TNF (51) und CCL3 (52) funktionelle Phagozyten-Defizite ausgeglichen werden. Abweichend von der oben erwähnten Studie, in welcher CCL3<sup>-/-</sup> Makrophagen mit *Pseudomonas aeruginosa* inkubiert wurden (52), ist in der vorliegenden Studie kein Defekt hinsichtlich der intrazellulären Abtötung von *NTHi* zu erkennen (siehe Anlage 1, Figure 6B). Mutmaßlich sind verschiedene Bakterienspezies unterschiedlich empfindlich für die in CCL3<sup>-/-</sup> Makrophagen involvierten, noch intakten Abtötungsmechanismen. Zum genaueren Verständnis, über welchen Mechanismus genau CCL3 die Funktion von Makrophagen beeinflusst, sind weiterführende Studien notwendig.

Die *in vitro* Ergebnisse einer intakten intrazellulären Keimabtötung liefern einen Erklärungsansatz für die *in vivo*-*NTHi*-Eliminierung, welche zwar in den CCL3-Knockout-Mäusen deutlich verzögert ist, aber nicht vollständig ausbleibt. So konnten

am 21. Tag *post infectionem* nur noch wenige lebensfähige *NTHi*-Bakterien aus den Mittelohren der CCL3<sup>-/-</sup> Tiere gewonnen werden (siehe Anlage 1, Figure 4 und Table 1).

#### **4.2.5 Otitis media-Phänotyp in CCL3<sup>-/-</sup> -Mäusen im Vergleich zu anderen Gendefekten**

Der OM-Phänotyp, der in CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden konnte, ähnelt unter mehreren Gesichtspunkten den Knockout-Modellen, bei welchen Gene der TLRs bzw. der TLR-Signalkaskade ausgeschaltet wurden. Mäuse mit Mutationen im TLR2 (34), MyD88 (32) oder TNF-Gen (30) präsentierten alle eine verminderte Eliminierung von *NTHi* aus dem Mittelohr, bei gleichzeitig verzögerter Rückbildung der Schleimhautschwellung. Der OM-Phänotyp der CCL3<sup>-/-</sup> Mäuse in dieser Arbeit erscheint jedoch insgesamt weniger ausgeprägt als in den letztgenannten Knockout-Mäusen, welche nicht im Stande waren, die induzierte Mittelohrinfection auszuheilen. Belegt wurde dies durch eine anhaltende Entzündungsreaktion mit signifikanter Mukosahyperplasie und noch hoher bakterieller Dichte im Mittelohr am 21. oder sogar 42. Tag nach *NTHi*-Inokulation (30, 32, 34). Die Gene der oben genannten, vorausgehenden Knockout-Studien (TLR2, MyD88, TNF) kodieren in einer TLR-MyD88-TNF-Signalkaskade allesamt für upstream-Komponenten von CCL3, weshalb grundsätzlich ein etwas milderer Phänotyp nicht überraschend ist. Angesichts der Vielzahl an möglichen downstream-Effektormolekülen, welche in der Immunantwort des Mittelohres involviert sind, ist jedoch das Ausmaß der defekten Immunabwehr in CCL3<sup>-/-</sup> Mittelohren dennoch beachtlich. Dies unterstreicht die Bedeutung von CCL3 im weiten Spektrum von potentiellen Effektormolekülen (Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide).

### **4.3 Bedeutung von CCL3 in der mikrobiellen Homöostase des Nasopharynx**

#### **4.3.1 Erhöhte bakterielle Kolonisation des Nasopharynx in CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen**

Angesichts des apparenten Immundefektes des Mittelohres von CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen ist nicht davon auszugehen, dass das Mittelohr das einzige, von dieser Immunschwäche betroffene Organsystem darstellt. Der Nasopharynx stellt eine ökologische Nische für kommensale Bakterien einerseits und potentielle Pathogene

andererseits dar, welche wiederum ursächlich für Infektionen des Atemtraktes oder invasive Infektionen sein können (76, 77). Jegliches Ungleichgewicht in diesem komplexen nasopharyngealen Mikrobiom, sowohl qualitativ als auch quantitativ, prädisponiert beim Menschen bekanntlich für Infektionen des oberen Atemtraktes und/oder des Mittelohres (15, 17). Die Nasopharynx-Bakterienkulturen dieser Arbeit zeigen einen höheren Grad an bakterieller Besiedlung in Knockout-Tieren, verglichen mit ihren WT-Pendants (siehe Anlage 1, Figure 7). Dies deutet darauf hin, dass CCL3 an der Aufrechterhaltung der nasopharyngealen Homöostase beteiligt ist und damit möglicherweise, neben seiner direkten Rolle im Mittelohr, eine noch weiterreichende Bedeutung in der multifaktoriellen Pathogenese von Mittelohrinfektionen besitzt.

#### **4.3.2 Keine *de novo* Mittelohrinfektionen in CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen**

Interessanterweise zeigen die Mittelohren von naiven CCL3<sup>-/-</sup> Mäusen negative Bakterienkulturen und darüber hinaus keinerlei Entzündungszeichen, wie beispielsweise eine Schleimhautschwellung oder leukozytenhaltige Exsudate. Mäuse mit Gen-Knockout von MyD88 (32), TLR2 (34) oder TNF (30) demonstrierten hingegen alle einen gewissen Grad einer Entzündungsreaktion im Mittelohr, auch ohne vorherige *NTHi*-Inokulation. Auch wenn also eine nasopharyngeale Kolonisation als beitragender Faktor zur Ätiologie von OM beim Menschen mehrfach angeführt wurde (15, 16), scheint das Fehlen von CCL3 unter diesen Versuchsbedingungen mit pathogenfreier Haltung der Tiere nicht die *de novo* Mittelohrinfektion aus dem Nasopharynx zu erleichtern.

#### **4.3.3 Virale Koinfektion als möglicher prädisponierender Faktor für Atemwegsinfektionen**

Ein mehrfach belegter Umstand, welcher die Invasion bakterieller Pathogene erleichtern kann, ist die Präsenz von respiratorischen Viren, welche die epitheliale Barriere schädigen (78, 79), die Inhibition der bakteriellen Translokation vermindern (80), sowie weitere lokale Abwehrmechanismen schwächen können, wie beispielsweise die mukoziliäre Clearance des oberen Atemtraktes (81). Aktuelle Studien identifizierten Chemokine, inklusive CCL3, als wichtige Entzündungsmediatoren während viraler Infektionen des Atemtraktes (80, 82, 83). Unter Berücksichtigung des engen pathophysiologischen Zusammenhanges zwischen viralen Infektionen des oberen Atemtraktes, Dysfunktion der Tuba auditiva,

Unterdruck im Mittelohr und akuter OM, der in zahlreichen Studien belegt wurde (84), ist auch denkbar, dass eine virale Infektion in CCL3-Knockout-Mäusen den Aufstieg von nasopharyngealen Bakterien initiieren könnte. Um diese Theorie jedoch zu bestätigen oder zu widerlegen sind zusätzliche Studien unumgänglich.

#### **4.3.4 Rolle des pharyngealen Mikrobioms in der Kanzerogenese**

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass ein verändertes pharyngeales Mikrobiom in mehreren Studien verdächtigt wird, eine Rolle bei der Entwicklung von Kopf-Hals-Malignomen (85, 86) zu spielen. Eine Erklärung der genauen Rolle der Bakterien und vor allem, ob tatsächlich ein kausaler Zusammenhang besteht, bleiben bisherige Studien jedoch noch schuldig.

#### **4.4 Ausblick**

Vor dem Hintergrund der rasanten Zunahme antibiotikaresistenter Keime (87), resultierend aus unüberlegten und zu häufigen Antibiotikaverschreibungen weltweit (5, 6, 87), besteht ein akuter Bedarf an medikamentösen Therapiealternativen zur Behandlung von Kindern, welche besonders anfällig für OM sind und unter rezidivierenden oder chronischen Krankheitsverläufen leiden. Vielversprechende Ergebnisse aus der *in vivo* Applikation von CCL3 in Tieren mit OM-Abwehrschwäche (30) sowie die Ergebnisse dieser Arbeit machen dieses Chemokin und seine Rezeptoren zu interessanten therapeutischen Angriffspunkten.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

|                     |  |
|---------------------|--|
| BHI                 | Brain Heart Infusion Medium  |
| CCL2                | C-C Chemokine Ligand 2 / Monocyte chemotactic Protein 1  |
| CCL3                | C-C Chemokin Ligand 3 / Macrophage inflammatory Protein-1alpha                                 |
| CCL4                | C-C Chemokin Ligand 4 / Macrophage inflammatory Protein-1beta                                  |
| CCL5                | C-C Chemokin Ligand 5 / Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) |
| CCR                 | C-C Chemokin Rezeptor  |
| CFUs                | Colony-forming units   |
| CSF                 | Colony Stimulating Factor  |
| C <sub>t</sub>      | Cycle of threshold   |
| CXCL2               | Macrophage inflammatory Protein-2  |
| DMEM                | Dulbecco's modified Eagle Medium   |
| EDTA                | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| FBS                 | Fetal Bovine Serum   |
| GAPDH               | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase   |
| MCP1                | Monocyte chemotactic Peptide-1   |
| MIF                 | Macrophage inhibitory Factor   |
| MyD88               | Myeloid Differentiation Primary Response Gene-88   |
| NFκB                | Nuclear Factor "Kappa-Light-Chain-Enhancer" of activated B cells                               |
| NTHi                | Nicht-typisierbarer <i>Haemophilus influenzae</i>  |
| NOD-like Rezeptoren | Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Rezeptoren                                      |
| OM                  | Otitis media   |
| PBS                 | Phosphate buffered Saline  |
| PFA                 | Paraformaldehyd  |
| PRRs                | Pattern Recognition Rezeptoren   |
| qPCR                | Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion   |
| TLR                 | Toll-like Rezeptor   |

|         |   |
|---------|---|
| TNF     | Tumornekrosefaktor                      |
| VAMPIRE | Variance-modeled posterior Interference |
| WT      | Wildtyp                                 |

## 6 Literaturverzeichnis

---

- 1 **Strutz J, Arndt O.** 2010. Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie : 265 Tabellen. Georg Thieme Verlag.
- 2 **Infante-Rivard C, Fernandez A.** 1993. Otitis media in children: frequency, risk factors, and research avenues. *Epidemiol Rev.* **15**:444–465.
- 3 **Cherry DK, Woodwell DA, Rechtsteiner EA, Division of Health Care Statistics.** 2007. National Ambulatory Medical Care Survey: 2005 Summary. *Adv Data from Vital Heal Stat.* **387**:1–40.
- 4 **Cullen K a, Hall MJ, Golosinskiy A.** 2009. Ambulatory surgery in the United States, 2006. *Natl Health Stat Report.* **11**:1–25.
- 5 **Grijalva CG, Nuorti JP, Griffin MR.** 2009. Antibiotic prescription rates for acute respiratory tract infections in US ambulatory settings. *JAMA.* **302**:758-766.
- 6 **McCaig LF, Besser RE, Hughes JM.** 2002. Trends in antimicrobial prescribing rates for children and adolescents. *JAMA.* **287**:3096–3102.
- 7 **Venekamp RP, Sanders SL, Glasziou PP, Del Mar CB, Rovers MM.** 2015. Antibiotics for acute otitis media in children. *Cochrane database Syst Rev.* **6**:CD000219.
- 8 **Monasta L, Ronfani L, Marchetti F, Montico M, Vecchi Brumatti L, Bavcar A, Grasso D, Barbiero C, Tamburlini G.** 2012. Burden of Disease Caused by Otitis Media: Systematic Review and Global Estimates. *PLoS ONE.* **7**:e36226-e36226.
- 9 **Zapalac J, Billings K, Schwade N, Roland P.** 2002. Suppurative Complications of Acute Otitis Media in the Era of Antibiotic Resistance. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery.* **128**:660.
- 10 **Thorne MC, Chewaproug L, Elden LM.** 2009. Suppurative complications of acute otitis media: changes in frequency over time. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **135**:638–41.
- 11 **Lim DJ.** 1976. Functional morphology of the mucosa of the middle ear and Eustachian tube. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **85**:36–43.
- 12 **Ryan AF, Catanzaro A, Wasserman SI, Harris JP.** 1986. Secondary immune response in the middle ear: immunological, morphological, and physiological observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **95**:242–9.
- 13 **Ruohola A, Meurman O, Nikkari S, Skottman T, Salmi A, Waris M, Osterback R, Eerola E, Allander T, Niesters H, Heikkinen T, Ruuskanen O.** 2006. Microbiology of



---

acute otitis media in children with tympanostomy tubes: prevalences of bacteria and viruses. Clin infect dis. **43**:1417-1422.

- 14 **Casey JR, Kaur R, Friedel VC, Pichichero ME.** 2013. Acute otitis media otopathogens during 2008 to 2010 in Rochester, New York. Pediatr infect Dis J. **32**:805-809.
- 15 **Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y.** 1997. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda / Williamsville Pediatrics. J Infect Dis. **175**:1440-1445.
- 16 **Ruohola A, Pettigrew M, Lindholm L, Jalava J, Räisänen KS, Vainionpää R, Waris M, Tähtinen PA, Laine MK, Lahti E, Ruuskanen O, Huovinen P.** 2013. Bacterial and viral interactions within the nasopharynx contribute to the risk of acute otitis media. J Infect. **66**:247-254.
- 17 **Revai K, Mamidi D, Chonmaitree T.** 2008. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. Clin Infect Dis. **46**:e34-37.
- 18 **Klein JO.** 2000. The burden of otitis media. Vaccine. **19 Suppl 1**:S2-8.
- 19 **Bluestone CD.** 1996. Pathogenesis of otitis media: role of eustachian tube. Pediatr Infect Dis J. **15**:281-291.
- 20 **Ilia S, Goulielmos GN, Samonis G, Galanakis E.** 2008. Host's response in otitis media: understanding genetic susceptibility. Pediatr Infect Dis J. **27**:929-33.
- 21 **Janeway C A, Medzhitov R.** 2002. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. **20**:197-216.
- 22 **Lee H, Takeshita T, Shimada J, Akopyan A, Woo J, Pan H, Moon S, Andalibi A, Park R, Kang S, Kang S, Gellibolian R, Lim D.** 2008. Induction of beta defensin 2 by NTHi requires TLR2 mediated MyD88 and IRAK-TRAF6-p38MAPK signaling pathway in human middle ear epithelial cells. BMC Infect Dis. **8**:87-87.
- 23 **Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson J.** 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proceedings of the National Academy of Sciences. **95**:9541-9546.
- 24 **Mittal R, Kodiyan J, Gerring R, Mathee K, Li J, Grati M, Liu X.** 2014. Role of innate immunity in the pathogenesis of otitis media. International Journal of Infectious Diseases. **29**:259-267.

- 
- 25 **Zarembek K a, Godowski PJ.** 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* **168**:554–561.
- 26 **Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu X, Murphy T, Lim D, Li J.** 2001. Activation of NF- B by nontypeable *Hemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK / -I B and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **98**:8774-8779.
- 27 **Takeda K, Kaisho T, Akira S.** 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* **21**:335-376.
- 28 **Hernandez M, Leichtle A, Pak K, Webster NJ, Wasserman SI, Ryan AF.** 2015. The transcriptome of a complete episode of acute otitis media. *BMC Genomics.* **16**:259.
- 29 **MacArthur CJ, Hausman F, Kempton JB, Choi D, Trune DR.** 2013. Otitis media impacts hundreds of mouse middle and inner ear genes. *PLoS One.* **8**:e75213. [SEP]
- 30 **Leichtle A, Hernandez M, Ebmeyer J, Yamasaki K, Lai Y, Radek K, Choung YH, Euteneuer S, Pak K, Gallo R, Wasserman SI, Ryan AF.** 2010. CC chemokine ligand 3 overcomes the bacteriocidal and phagocytic defect of macrophages and hastens recovery from experimental otitis media in TNF-/- mice. *J Immunol.* **184**:3087-3097.
- 31 **Leichtle A, Hernandez M, Pak K, Webster NJ, Wasserman SI, Ryan AF.** 2009. The toll-Like receptor adaptor TRIF contributes to otitis media pathogenesis and recovery. *BMC Immunol* **10**:45.
- 32 **Hernandez M, Leichtle A, Pak K, Ebmeyer J, Euteneuer S, Obonyo M, Guiney DG, Webster NJ, Broide DH, Ryan AF, Wasserman SI.** 2008. Myeloid differentiation primary response gene 88 is required for the resolution of otitis media. *J Infect Dis.* **198**:1862-1869.
- 33 **Leichtle A, Hernandez M, Lee J, Pak K, Webster NJ, Wollenberg B, Wasserman SI, Ryan AF.** 2012. The role of DNA sensing and innate immune receptor TLR9 in otitis media. *Innate Immun.* **18**:3–13.
- 34 **Leichtle A, Hernandez M, Pak K, Yamasaki K, Cheng CF, Webster NJ, Ryan AF, Wasserman SI.** 2009. TLR4-mediated induction of TLR2 signaling is critical in the pathogenesis and resolution of otitis media. *Innate Immun.* **15**:205-215.
- 35 **Emonts M, Veenhoven RH, Wiertsema SP, Houwing-Duistermaat JJ, Walraven V, de Groot R, Hermans PW, Sanders EA.** . 2007. Genetic polymorphisms in

- 
- immunoresponse genes TNFA, IL6, IL10, and TLR4 are associated with recurrent acute otitis media. *Pediatrics*. **120**:814-823.
- 36 **Lee YC, Kim C, Shim JS, Byun JY, Park MS, Cha CI, Kim YI, Lee JW, Yeo SG.** 2008. Toll-like receptors 2 and 4 and their mutations in patients with otitis media and middle ear effusion. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. **1**:189-195.
- 37 **Wiertsema SP, Khoo SK, Baynam G, Veenhoven RH, Laing IA, Zielhuis GA, Rijkers GT, Goldblatt J, LeSouëf PN, Sanders EAM.** 2006. Association of CD14 promoter polymorphism with otitis media and pneumococcal vaccine responses. *Clin Vaccine Immunol*. **13**:892–897.
- 38 **Patel J a, Nair S, Revai K, Grady J, Saeed K, Matalon R, Block S, Chonmaitree T.** 2006. Association of Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms With Susceptibility to Otitis Media. *Pediatrics*. **118**:2273–2279.
- 39 **Maurer M, von Stebut E.** 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Intl Biochem Cell Biol*. **36**:1882-1886.
- 40 **Rollins B J.** 1997. Chemokines. *Blood*. **90**:909-928.
- 41 **Luster A D.** 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. **338**:436-445.
- 42 **Kim CH, Broxmeyer HE.** 1999. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol*. **65**:6–15.
- 43 **Yung S, Murphy P.** 2012. Antimicrobial Chemokines. *Front. Immun*. **3**:276-276.
- 44 **Wolf M, Moser B.** 2012. Antimicrobial activities of chemokines: Not just a side-effect? *Front Immunol*. **3**:213-213.
- 45 **Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP.** 2001. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin Immunol*. **98**:39–45.
- 46 **Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM.** 1997. Release of RANTES, MIP-1 $\alpha$ , and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. **156**:1377–1383.
- 47 **Ziegenhagen MW, Schrum S, Zissel G, Zipfel PF, Schlaak M, Muller-Quernheim J.** 1998. Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *J Invest Med*. **46**:223–31.

- 
- 48 **Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E, Damås JK, Wikeby L, Brunsvig a, Müller F, Forfang K, Frøland SS, Gullestad L.** 2001. Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* **37**:485–91.
- 49 **Wark G, Heyworth CM, Spooncer E, Czaplewski L, Francis JM, Dexter TM, Whetton a D.** 1998. Abl protein kinase abrogates the response of multipotent haemopoietic cells to the growth inhibitor macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Oncogene.* **16**:1319–24.
- 50 **Basara N, Stošić-Grujicic S, Šefer D, Ivanovic Z, Antunovic P, Milenkovic P.** 1996. The inhibitory effect of human macrophage inflammatory protein-1 (LD78) on acute myeloid leukemia cells in vitro. *Stem Cells.* **14**:445–51.
- 51 **Leichtle A, Yamasaki K, Euteneuer S, Wasserman SI, Wollenberg B, Ryan AF.** 2009. Impaired antibacterial function is restored via CCL3. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **141**:82-83.
- 52 **Takahashi H, Tashiro T, Miyazaki M, Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F.** 2002. An essential role of macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 on the expression of host's innate immunities against infectious complications. *J Leukocyte Biol.* **72**:1190-1197.
- 53 **Brown SDM, Hardisty-Hughes RE, Mburu P.** 2008. Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat Rev Genet.* **9**:277–290.
- 54 **Brown SDM, Wurst W, Kühn R, Hancock JM.** 2009. The functional annotation of mammalian genomes: the challenge of phenotyping. *Annu Rev Genet.* **43**:305–33.
- 55 **Tyrer HE, Crompton M, Bhutta MF.** 2013. What have we learned from murine models of otitis media? *Curr Allergy Asthma Rep.* **13**:501–511.
- 56 **Leach AJ, Boswell JB, Asche V, Nienhuys TG, Mathews JD.** 1994. Bacterial colonization of the nasopharynx predicts very early onset and persistence of otitis media in Australian aboriginal infants. *Pediatr Infect Dis J.* **13**:983-989.
- 57 **Jones EA, Kananurak A, Bevins CL, Hollox EJ, Bakaletz LO.** 2014. Copy number variation of the beta defensin gene cluster on chromosome 8p influences the bacterial microbiota within the nasopharynx of otitis-prone children. *PLoS One.* **9**:e98269.
- 58 **Melhus A, Ryan AF.** 2003. A mouse model for acute otitis media. *APMIS.* **111**:989-994.

- 
- 59 **Alrawi AM, Chern KC, Cevallos V, Lietman T, Whitcher JP, Margolis TP, Cunningham Jr. ET.** 2002. Biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* ocular isolates. *Br J Ophthalmol.* **86**:276–277.
- 60 **Melhus A, Hermansson A, Prellner K.** 1994. Nontypeable and encapsulated *Haemophilus influenzae* yield different clinical courses of experimental otitis media. *Acta Otolaryngol.* **114**:289-94.
- 61 **Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Ebmeyer U, Sudhoff H, Broide D, Ryan AF, Wasserman S.** 2005. Role of mast cells in otitis media. *J Allergy Clin Immunol* **116**:1129-1135.
- 62 **Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T.** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* **7**:3.
- 63 **Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al.** 1995. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 64 **Kurabi A, Lee J, Wong C, Pak K, Hoffman HM, Ryan AF, Wasserman SI.** 2015. The inflammasome adaptor ASC contributes to multiple innate immune processes in the resolution of otitis media. *Innate Immun.* **21**:203-14.
- 65 **Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, Cunha FQ.** 2005. MIP-1 $\alpha$ [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF- $\alpha$  and LTB $_4$ . *J. Leukoc. Biol.* **78**:167–177.
- 66 **Xue ML, Thakur A, Cole N, Lloyd A, Stapleton F, Wakefield D, Willcox MD.** 2007. A critical role for CCL2 and CCL3 chemokines in the regulation of polymorphonuclear neutrophils recruitment during corneal infection in mice. *Immunol. Cell Biol.* **85**:525–531.
- 67 **Lindell DM, Standiford TJ, Mancuso P, Leshen ZJ, Huffnagle GB.** 2001. Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ /CCL3 is required for clearance of an acute *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection. *Infection Immun.* **69**:6364-6369.
- 68 **Eming SA, Krieg T, Davidson JM.** 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* **127**: 514-525.
- 69 **Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al.** 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. Garland Science, New York:.. Induced innate responses to infection. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27122/>

- 
- 70 **Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O.** 1995. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science*. **269**:1583-1585.
- 71 **Lu P, Li L, Wu Y, Mukaida N, Zhang X.** 2008. Essential contribution of CCL3 to alkali-induced corneal neovascularization by regulating vascular endothelial growth factor production by macrophages. *Mol Vis*. **14**:1614-1622.
- 72 **Heinrichs D, Berres M, Nellen A, Fischer P, Scholten D, Trautwein C, Wasmuth HE, Sahin H.** 2013. The chemokine CCL3 promotes experimental liver fibrosis in mice. *PLoS One*. **8**:e66106.
- 73 **Yang X, Walton W, Cook D N, Hua X, Tilley S, Haskell CA, Horuk R, Blackstock AW, Kirby SL.** 2011. The chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, mediate thoracic radiation-induced pulmonary fibrosis. *Amer J Respir Cell Mol Biol*. **45**:127-135.
- 74 **Repeke CE, Ferreira SB, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, Silva JS, Garlet GP.** 2010. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*. **46**:1122-1130.
- 75 **Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ, Ralph JA, Hall P, Yang YH, McColl SR, Hickey MJ.** 2006. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol*. **177**:8072-8079.
- 76 **Yanaba K, Mukaida N, Matsushima K, Murphy PM, Takehara K, Sato S.** 2004. Role of C-C chemokine receptors 1 and 5 and CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha in the cutaneous Arthus reaction: possible attenuation of their inhibitory effects by compensatory chemokine production. *Euro J Immunol*. **34**:3553-3561.
- 77 **Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G.** 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Eng J Med*. **344**:11-16.
- 78 **K Suzuki, L O Bakaletz.** 1993. Synergistic effect of adenovirus type 1 and nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of experimental otitis media. *Infect Immun*. **62**:1710-1718.
- 79 **Sajjan U, Wang Q, Zhao Y, Gruenert DC, Hershenson MB.** 2008. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. **178**: 1271-1281.

- 
- 80 **Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K, Sánchez PJ, Ramilo O.** 1999. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* **18**:115-22.
- 81 **Pittet LA, Hall-Stoodley L, Rutkowski MR, Harmsen AG.** 2010. Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of streptococcus pneumoniae. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **42**:450–460.
- 82 **Tong HH, Long JP, Shannon PA, DeMaria TF.** 2003. Expression of Cytokine and Chemokine Genes by Human Middle Ear Epithelial Cells Induced by Influenza A Virus and Streptococcus pneumoniae Opacity Variants. *Infect Immun.* **71**:4289-96.
- 83 **Fritz RS, Hayden FG, Calfee DP, Cass LM, Peng AW, Alvord WG, Strober W, Straus SE.** 1999. Nasal cytokine and chemokine responses in experimental influenza A virus infection: results of a placebo-controlled trial of intravenous zanamivir treatment. *J. Infect. Dis.* **180**:586-593.
- 84 **Heikkinen T, Chonmaitree T.** 2003. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. *Clin Microbiol Rev.* **16**:230-41.
- 85 **Hooper SJ, Crean SJ, Fardy MJ, Lewis MA, Spratt DA, Wade WG, Wilson MJ.** 2007. A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. *J Med Microbiol.* **56**:1651-9.
- 86 **Hooper SJ, Wilson MJ, Crean SJ.** 2009. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck.* **31**:1228-39.
- 87 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Rheinbach, 2016.  
<http://media.econtext.de/v1/stream/16-424/0d8597f0c9715208faa712caaf9d70d9/1475671620/16/424.econtext>

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

OTITIS MEDIA UND BAKTERIELLE KOLONISATION DES NASOPHARYNX IN  
CCL3<sup>-/-</sup> MÄUSEN  
-OTITIS MEDIA AND NASOPHARYNGEAL COLONIZATION IN CCL3<sup>-/-</sup> MICE-

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dominik Deniffel

ANLAGEN

Anlage 1: Originalpublikation



## Originalpublikation

Deniffel D, Nuyen B, Pak K, Suzukawa K, Hung J, Kurabi A, Wasserman SI, Ryan AF. 2017. Otitis media and nasopharyngeal colonization in ccl3<sup>-/-</sup> mice. *Infect Immun* **85**:e00148-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00148-17>.

Manuskript eingereicht am 28.02.2017, angenommen zur Veröffentlichung am 09.08.2017. Veröffentlichung auf der Online-Plattform des Journals „Infection and Immunity“, Journal Impact Factor 3,593 (Thomson Reuters, 2017 Incites Journal Citation Report), am 28.08.2017. Gedruckt in Jahrgang 85, Ausgabe 11, November 2017.



# Otitis Media and Nasopharyngeal Colonization in *cc13*<sup>-/-</sup> Mice

Dominik Deniffel,<sup>a,d</sup> Brian Nuyen,<sup>a,c</sup> Kwang Pak,<sup>a,c</sup> Keigo Suzukawa,<sup>a,e</sup> Jun Hung,<sup>a,c</sup> Arwa Kurabi,<sup>a</sup> Stephen I. Wasserman,<sup>b</sup> Allen F. Ryan<sup>a,c</sup>

Department of Surgery/Otolaryngology<sup>a</sup> and Medicine/Rheumatology, Allergy and Immunology,<sup>b</sup> University of California, San Diego, La Jolla, California, USA; Veterans Administration San Diego Healthcare System, San Diego, California, USA<sup>c</sup>; Ortenau Hospital Offenburg Department of Radiology, Offenburg, Germany<sup>d</sup>; University of Tokyo Department of Otolaryngology, Tokyo, Japan<sup>e</sup>

**ABSTRACT** We previously found CC chemokine ligand 3 (CCL3) to be a potent effector of inflammation during otitis media (OM): exogenous CCL3 rescues the OM phenotype of tumor necrosis factor-deficient mice and the function of macrophages deficient in several innate immune molecules. To further delineate the role of CCL3 in OM, we evaluated middle ear (ME) responses of *cc13*<sup>-/-</sup> mice to nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi). CCL chemokine gene expression was evaluated in wild-type (WT) mice during the complete course of acute OM. OM was induced in *cc13*<sup>-/-</sup> and WT mice, and infection and inflammation were monitored for 21 days. Phagocytosis and killing of NTHi by macrophages were evaluated by an *in vitro* assay. The nasopharyngeal bacterial load was assessed in naive animals of both strains. Many CCL genes showed increased expression levels during acute OM, with CCL3 being the most upregulated, at levels 600-fold higher than the baseline. *cc13*<sup>-/-</sup> deletion compromised ME bacterial clearance and prolonged mucosal hyperplasia. ME recruitment of leukocytes was delayed but persisted far longer than in WT mice. These events were linked to a decrease in the macrophage capacity for NTHi phagocytosis and increased nasopharyngeal bacterial loads in *cc13*<sup>-/-</sup> mice. The generalized impairment in inflammatory cell recruitment was associated with compensatory changes in the expression profiles of CCL2, CCL7, and CCL12. CCL3 plays a significant role in the clearance of infection and resolution of inflammation and contributes to mucosal host defense of the nasopharyngeal niche, a reservoir for ME and upper respiratory infections. Therapies based on CCL3 could prove useful in treating or preventing persistent disease.

**KEYWORDS** chemokines, otitis media, nontypeable *Haemophilus influenzae*, innate immunity, nasopharyngeal culture, mucosal flora

Otitis media (OM) is a primarily infectious disease that involves, in the majority of cases, pathogenic bacteria alone or in combination with a virus (1). The bacteria most frequently isolated from middle ear (ME) effusions during acute OM are *Streptococcus pneumoniae*, nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi), and *Moraxella catarrhalis* (2). Children acquire these potential otopathogens, along with a broad variety of other microorganisms, as part of their normal nasopharyngeal flora early in infancy (3).

The pathogenesis of OM is considered multifactorial. Prior viral infection of the nasopharynx, significantly increased bacterial colonization of the nasopharynx (4) and/or cocolonization by different bacterial strains (4, 5), as well as dysfunction of the Eustachian tube leading to pressure differences between the nasopharynx and Eustachian tube (6) have all been associated with an elevated risk of OM. Immature or compromised immune status, allergy, and genetic predispositions (7) also contribute to OM susceptibility.

The fact that acute OM normally resolves in a few days, before cognate immunity

Received 28 February 2017 Returned for modification 4 April 2017 Accepted 9 August 2017

Accepted manuscript posted online 28 August 2017

**Citation** Deniffel D, Nuyen B, Pak K, Suzukawa K, Hung J, Kurabi A, Wasserman SI, Ryan AF. 2017. Otitis media and nasopharyngeal colonization in *cc13*<sup>-/-</sup> mice. *Infect Immun* 85:e00148-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00148-17>.

**Editor** Shelley M. Payne, The University of Texas at Austin

**Copyright** © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Allen F. Ryan, [afryan@ucsd.edu](mailto:afryan@ucsd.edu).

S.I.W. and A.F.R. contributed equally to the supervision of this work.

can be effectively engaged, suggests that innate defenses are the primary means of recovery from OM. The host recognizes invading pathogens by innate immune receptors, including Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors. Pathogen molecule binding to these receptors initiates signaling cascades that result in a variety of antimicrobial responses. The TLRs that are the primary receptors for the recognition of NTHi (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TLR9 [8]) can signal via a myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)-dependent pathway to induce the release of proinflammatory cytokines, including interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-12, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and chemokines such as macrophage inflammatory protein 2 (CXCL2) and CC chemokine ligand 3 (CCL3)/macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (9, 10). Previous gene expression studies of the ME mucosa in mice after NTHi exposure demonstrated increased expression levels of TLR signaling molecules, especially during the initial stages of the inflammatory response, during acute OM (11, 12). Defects in TLR signaling are associated with an impaired immune response to NTHi-induced ME infection (13–15). In humans, polymorphisms in TLR genes are associated with increased susceptibility to ME infections (16, 17).

CCL3 belongs to the CC subfamily of the chemokine superfamily. CCL chemokines share the common biologic property of leukocyte chemoattraction. CCL3, because of its ability to attract and activate various inflammatory cells, including T cells, monocytes, eosinophils, and neutrophils, is an important determinant of inflammatory cell infiltration. This is mediated by interactions with its CC chemokine receptors (CCRs), CCR1 and CCR5 (18, 19), and is intimately involved in many inflammatory and infectious diseases (20).

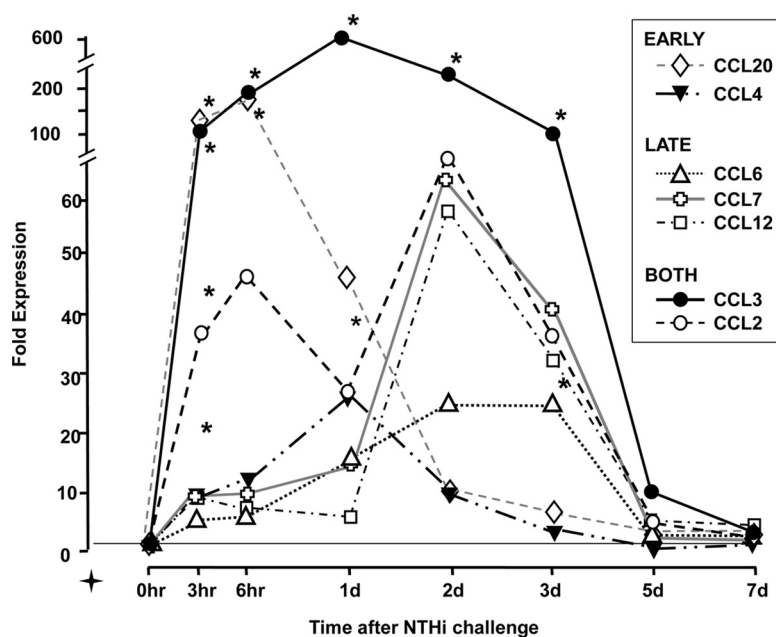
Critical to the host defense of the ME against invading pathogens is the capacity of professional phagocytes, such as macrophages, to efficiently engulf and degrade microorganisms. Macrophages derived from TNF<sup>-/-</sup> and TLR2<sup>-/-</sup> mice have been shown *in vitro* to be defective in the phagocytosis/intracellular killing of NTHi and to express reduced levels of CCL3 (13). Moreover, stimulation with CCL3 was found to reverse the functional impairment of macrophages derived from TLR2<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup>, and TNF<sup>-/-</sup> mice in previous studies (21). Furthermore, CCL3<sup>+/+</sup> macrophages were shown to expand their phagocytic and killing activities after stimulation with CCL3 (13, 22). In addition to these *in vitro* effects, the administration of CCL3 *in vivo*, alone or in combination with TNF, prior to infection with NTHi restored the impaired immune response to OM in TNF<sup>-/-</sup> mice (13). Delayed recovery from OM was observed after blocking CCL3 activity with anti-CCL3 antibodies *in vivo* (13).

The above-mentioned findings make the CCL chemokines in general and CCL3 in particular an attractive target for further investigation in a well-established murine model of OM induced by NTHi infection of the ME (11). Our goal was to determine the extent to which CCL3, while sufficient to rescue innate immune defects, is also necessary for normal recovery from OM.

(Some of the data included in the manuscript were presented at the 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference in June 2013 at Stanford University [Palo Alto, CA].)

## RESULTS

**Regulation of CCL genes during acute OM.** Changes in the expression levels of the most highly regulated (peak increase of >20-fold) CCL chemokine genes over the course of an episode of acute NTHi-induced OM in WT mice are illustrated in Fig. 1. Data from all CCL genes and fold expression variability are provided in Table S1 in the supplemental material. Substantial changes in the expression levels of seven CCL genes were observed during OM. These changes fell into three categories: an increase early during OM (peaking 3 to 24 h after NTHi inoculation, e.g., CCL4 and CCL20), an increase later during OM (peaking 2 to 3 days after inoculation, e.g., CCL6, CCL7, and CCL12), or an increase during both time periods (e.g., CCL2 and CCL3). As shown in Fig. 1 and Table S1, CCL3 was by far the most highly regulated CCL gene. Expression peaked at a >600-fold increase 1 day after inoculation and increased >100-fold throughout the



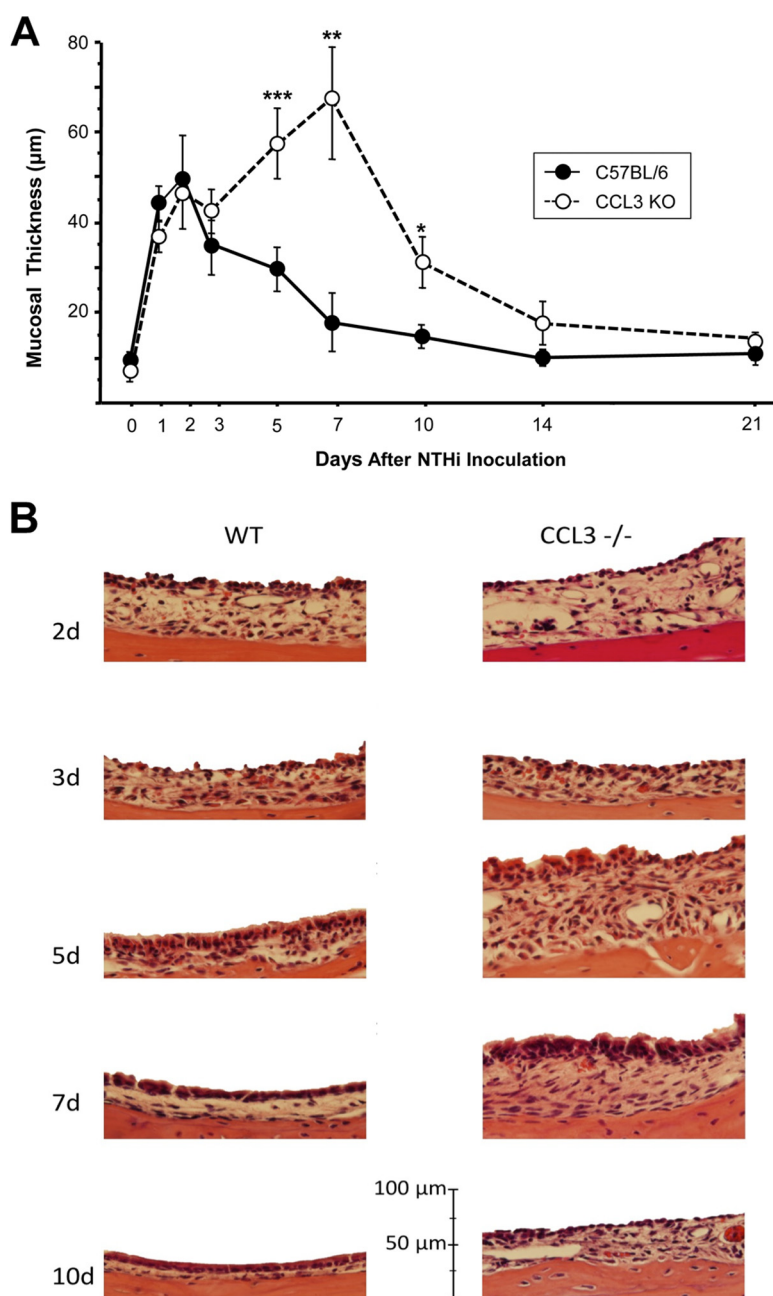
**FIG 1** Regulation of CCL genes in the ME during the course of an episode of acute OM in mice. Data are from gene arrays using two independent groups of mice. CCL genes for which peak expression levels increased at least 20-fold are illustrated. Increased expression fell into three categories: (i) genes upregulated early (3 to 24 h) during OM, (ii) those upregulated late (2 to 3 days) during OM, and (iii) those upregulated both early and late. Results for all CCL genes and the variability of expression levels are presented in Table S1 in the supplemental material. CCL20 data were reported previously in a different form (14). Data analysis was performed by using VAMPIRE (41). For this and subsequent figures, \* indicates a *P* value of <0.05, \*\* indicates a *P* value of <0.01, and \*\*\* indicates a *P* value of <0.001.

period from 3 h to 3 days, which corresponds to the most active ME inflammatory response. As can be seen from the range of fold change values presented in Table S1, the expression changes were replicated both in independent tissue samples and in the two chips of each sample. Mice injected with saline alone in the ME exhibited much smaller changes in the expression levels of CCL genes, as in almost all other regulated genes (11). For example, the peak fold change in CCL3 expression after saline injection was only 3% of that seen after NTHi injection.

**Mucosal hyperplasia in the absence of CCL3.** Hyperplasia of the ME mucosa is illustrated in Fig. 2A and B. When exposed to NTHi, WT mice exhibited characteristic, robust ME mucosal hyperplasia that reached a maximum on day 2 after inoculation. By day 7, the mucosa thickness was not different from preinfection values, although there was a nonsignificant tendency for increased thickness.

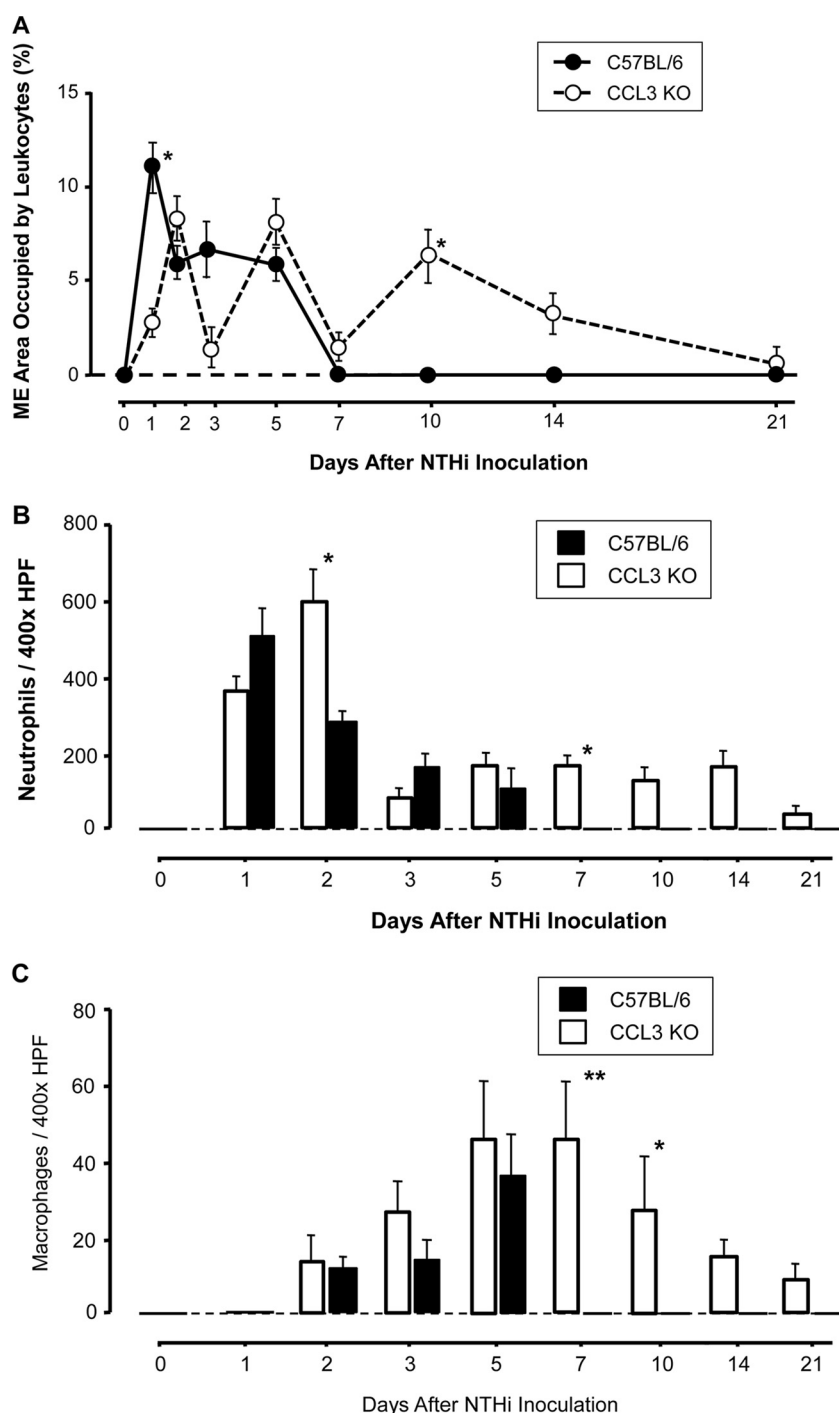
There were no significant differences in mucosal thicknesses between WT and *ccl3*<sup>-/-</sup> mice until day 5 (*P* < 0.001 by 2-way analysis of variance [ANOVA] and Fisher's exact *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons). The mucosa of *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs reached its maximum thickness and difference from those of WT mice on day 7 (*P* < 0.01). Thereafter, mucosal hyperplasia in *ccl3*<sup>-/-</sup> mice decreased but remained significantly greater than that in WT mice through day 10 (*P* < 0.05).

**Delayed and persistent leukocyte recruitment to the ME in the absence of CCL3.** In WT mice, the highest percentage of the ME lumen occupied by infiltrating leukocytes was observed on the first day after NTHi inoculation, and cells persisted in the ME until day 5. In the absence of CCL3, the initial recruitment of leukocytes was delayed. One day after NTHi instillation, the level of infiltration of inflammatory cells into the MEs of animals lacking CCL3 was significantly lower than that in WT mice (*P* < 0.05 by a Mann-Whitney U test), reaching the level seen in WT animals on day 2. However, on day 10 (<0.01) and day 14 (*P* < 0.05), it exceeded that in WT animals, and some *ccl3*<sup>-/-</sup> animals showed ME leukocytes even on day 21 (Fig. 3A).



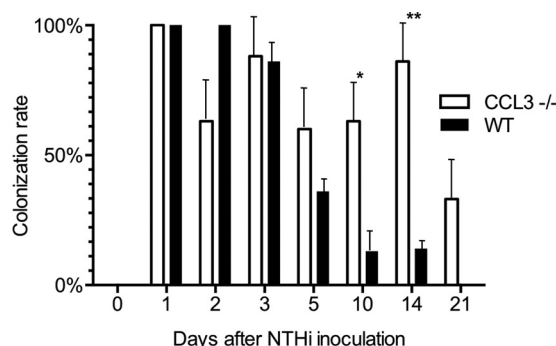
**FIG 2** Mucosal response of the ME after NTHi challenge. (A) Time course of mucosal thicknesses in the MEs of CCL3-null versus WT mice after NTHi challenge. No significant differences in mucosal responses were noted during the first 3 days after NTHi infection. On day 5 (\*\*\*,  $P < 0.001$  by Fisher's exact  $t$  test), day 7 (\*\*,  $P < 0.01$ ), and day 10 (\*,  $P < 0.05$ ), *ccl3*<sup>-/-</sup> animals displayed significantly enhanced mucosal thickness ( $n = 6$  to 7 MEs per time point and strain; bars and error bars represent means  $\pm$  SEM). (B) Representative histological changes of the ME mucosa of *ccl3*<sup>-/-</sup> versus WT mice 2, 3, 5, 7, and 10 days after inoculation of NTHi in MEs (original magnification,  $\times 40$ ).

Neutrophils were the predominant cell type in the MEs of both mouse strains throughout the observation period. As shown in Fig. 3B, the maximum influx of neutrophils into WT MEs occurred on day 1, with a gradual decrease through day 5. In *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs, consistent with the delayed total inflammatory cell recruitment, neutrophil counts reached a peak on day 2, with significantly increased numbers compared to those in WT mice ( $P < 0.05$  by a Mann-Whitney U test). After this peak, the numbers of neutrophils declined in both groups, but the numbers of neutrophils peaked again and



**FIG 3** Inflammatory cells in the ME cavity after NTHi infection. (A) Percent area of the ME cavity occupied by leukocytes during OM in WT and *ccl3*<sup>-/-</sup> mice. The initial level of leukocyte infiltration on day 1 post-NTHi inoculation was significantly lower in CCL3<sup>-/-</sup> MEs (\*,  $P < 0.05$  by a Mann-Whitney U test), as was also observed on day 3. While the infiltration of both WT and *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs declined on day 7, *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs showed a significant increase on day 10. Thereafter, leukocytes were observed only in *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs although not in every case. (B) Number of neutrophils in a standard area ( $\times 400$  field) of ME infiltrates. Neutrophils were the primary cell type in ME infiltrates throughout the observation period. In the absence of CCL3, neutrophil infiltration peaked after 2 days following a slight delay. Numbers of neutrophils were significantly increased in the MEs of *ccl3*<sup>-/-</sup> animals on days 2, 7, 10, and 14 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  by a Mann-Whitney U test) compared to those in WT animals and persisted in at least some MEs through day 21. HPF, high-power field. (C) Number of macrophages in a standard area of ME infiltrates. Macrophages were recruited to the ME by 2 days after NTHi infection of both WT and *ccl3*<sup>-/-</sup> animals. *ccl3*<sup>-/-</sup> mice displayed a prolonged presence of macrophages in MEs, with significantly increased numbers of macrophages on days 7 and 10 (\*,  $P < 0.05$  by a Mann-Whitney U test), and

(Continued on next page)



**FIG 4** NTHi colonization rate as a percentage of culture-positive ME samples of *cc13*<sup>-/-</sup> and WT mice. We found no significant differences in colonization rates of NTHi in the first 5 days post-NTHi inoculation. After day 5, colonization rates of NTHi diverged. *cc13*<sup>-/-</sup> MEs were colonized by NTHi to a significantly higher degree on day 10 and 14 after NTHi inoculation (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  by a Fisher-Irwin  $t$  test for proportions). By day 21, no NTHi were cultured from WT mice. In contrast, NTHi remained present in the MEs of *cc13*<sup>-/-</sup> animals throughout the observation period ( $n \geq 6$  MEs per time point and strain).

persisted longer in MEs of mice lacking CCL3, with significantly higher numbers on days 7 and 10 ( $P < 0.01$ ) and day 14 ( $P < 0.05$ ) and with some MEs exhibiting a small number even on day 21 (Fig. 3B).

Macrophages were observed in the ME cavities of both strains by day 2 after infection but in much smaller numbers than neutrophils. In WT mice, macrophage counts peaked on day 5 and were absent from the ME by day 7. In *cc13*<sup>-/-</sup> mice, the early dynamics of macrophage infiltration were similar, but as with neutrophils, macrophages remained longer in the MEs. Macrophage counts were significantly higher than those in WT mice on day 7 ( $P < 0.01$ ) and days 10 and 14 ( $P < 0.05$ ), and some MEs retained macrophages on day 21 (Fig. 3C).

**Bacterial clearance is delayed in *cc13*<sup>-/-</sup> mice.** Next, we assessed ME bacterial clearance in WT and *cc13*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4 and Table 1). As expected, MEs of neither CCL3-deficient nor WT mice showed bacterial colonies on day 0, prior to challenge with NTHi. For the first 3 days post-NTHi inoculation, MEs of both *cc13*<sup>-/-</sup> and WT mice showed similarly robust culture positivity, between 63% and 100%. Thereafter, on day 5 postinoculation, 36% of ME cultures from WT mice were NTHi positive. This value decreased to 13% and 14% positivities on days 10 and 14, respectively. By day 21, no NTHi bacteria were recovered from WT mice.

In contrast to WT MEs, NTHi bacteria were isolated at a significantly higher percentage in *cc13*<sup>-/-</sup> mice on day 10 ( $P < 0.05$ ) and day 14 ( $P < 0.05$  by a Fisher-Irwin test) following inoculation. Furthermore, NTHi persisted longer in MEs of CCL3 knockout (KO) animals and remained present in some ears even on day 21. Thus, the persistent inflammation seen in the MEs of *cc13*<sup>-/-</sup> mice, as evidenced by mucosal hyperplasia and leukocyte infiltration, was associated with an impaired capacity to clear NTHi.

**CCL gene expression in the absence of CCL3.** In many gene knockout studies, compensatory changes in the expression levels of genes with redundant functions are observed. We therefore compared the expression levels of CCL2, CCL7, and CCL12, which are expressed over approximately the same period as CCL3 in WT mice, in the MEs of WT and *cc13*<sup>-/-</sup> mice during OM by quantitative PCR (qPCR). As shown in Fig. 5, CCL2 expression levels showed complex changes in *cc13*<sup>-/-</sup> MEs. The CCL2 mRNA expression level was significantly lower 6 h and 3 days after NTHi inoculation, but was

#### FIG 3 Legend (Continued)

macrophages were still present in some ears on day 21 ( $n = 6$  to 8 MEs per time point and strain; bars and error bars represent means  $\pm$  SEM). It should be noted that since the measurements in panels B and C were taken from the largest cellular clusters in a given ear, the numbers do not reflect the total number of leukocytes in each ear. Rather, they reflect the density of the cell clusters and the proportions of neutrophils and macrophages present.



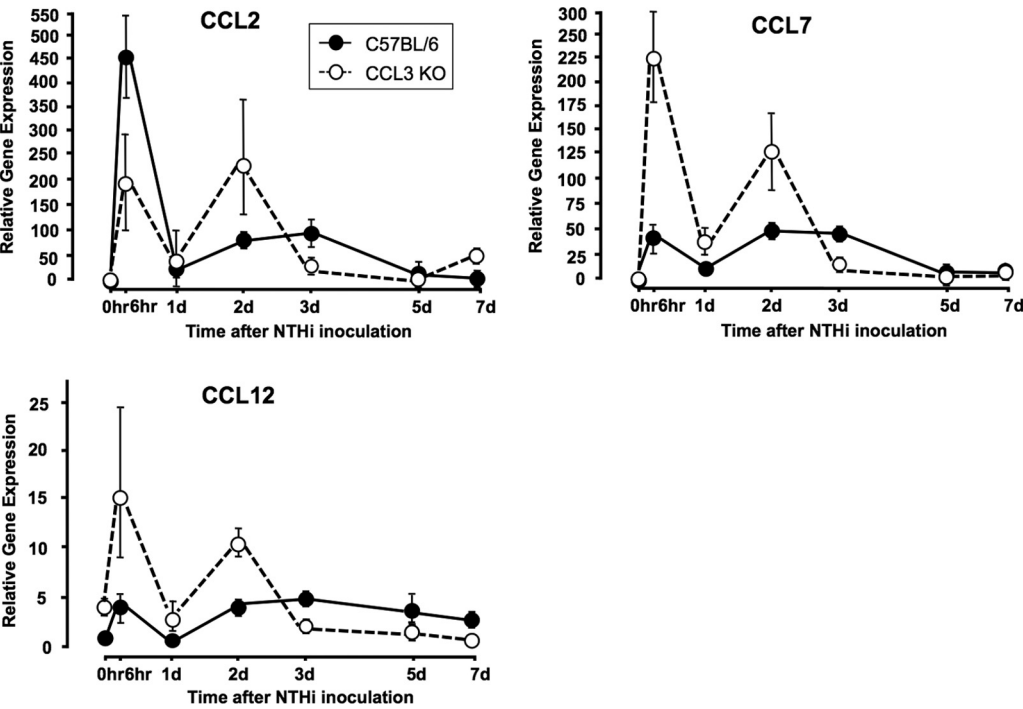
**TABLE 1** Recovery of NTHi from CCL3<sup>-/-</sup> and WT MEs, expressed as degree of culture plate colonization<sup>a</sup>

| Day after NTHi instillation | Mean score for NTHi colonization per ME |         |
|-----------------------------|---|---------|
|                             | CCL3 <sup>-/-</sup> mice                | WT mice |
| 0                           | 0                                       | 0       |
| 1                           | 3.2                                     | 3.3     |
| 2                           | 1.4                                     | 1.7     |
| 3                           | 3                                       | 2.3     |
| 5                           | 1.5                                     | 0.8     |
| 10                          | 1.2                                     | 0.1     |
| 14                          | 1.4                                     | 0.6     |
| 21                          | 0.3                                     | 0       |

<sup>a</sup>Bacterial colonization of MEs was evaluated by using a semiquantitative analysis of the presence of bacteria on culture plates. A 1- $\mu$ l loop from the ME was sequentially streaked onto the four quadrants of each culture plate, where 0 indicates no CFU, 1 indicates one quadrant with CFU, 2 indicates two quadrants with CFU, 3 indicates three quadrants with CFU, and 4 indicates CFU in all four quadrants. Data represent means of results from at least 6 MEs per time point and strain.

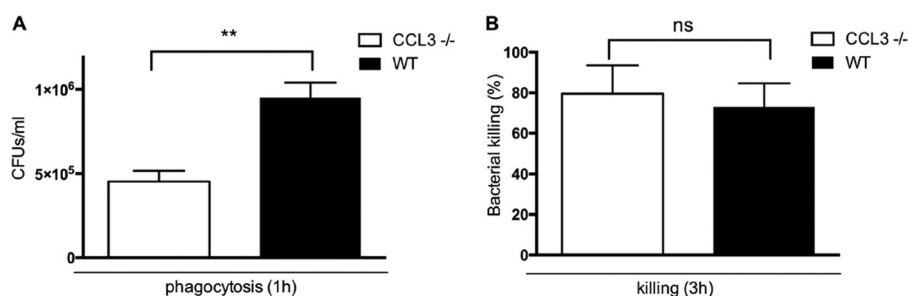
higher at 2 days, in the absence of CCL3. The CCL2 qPCR data for both genotypes exhibited the biphasic expression that was present in the gene array data for WT mice (Fig. 1). In contrast, CCL7 and CCL12 expression levels were significantly higher 6 h, 1 day, and 2 days after inoculation, but lower 3 days after inoculation, in *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs. A biphasic response for these CCL mRNAs was also noted for both genotypes.

**Bacterial phagocytosis by peritoneal macrophages is impaired, whereas intracellular killing is not affected, in the absence of CCL3.** *ccl3*<sup>-/-</sup> mice exhibited a reduced clearance of NTHi from the ME cavity despite the prolonged presence of macrophages in the ME lumen (Fig. 3C). We therefore hypothesized that macrophage function in mice lacking CCL3 is impaired. In *in vitro* assays, we observed significantly impaired phagocytic function in *ccl3*<sup>-/-</sup> macrophages compared to WT macrophages ( $P < 0.01$  by a Mann-Whitney U test) (Fig. 6A). In contrast, the levels of intracellular



**FIG 5** Expression levels of CCL2, CCL7, and CCL12 mRNAs in the MEs of WT versus CCL3-null mice during OM. cDNAs were generated from 6 MEs at each time point. The 0-h time point denotes untreated mice. Results represent data from 2 replicates, with error bars denoting the 95% confidence intervals. Data points for which the confidence intervals do not overlap are significantly different between the two genotypes.





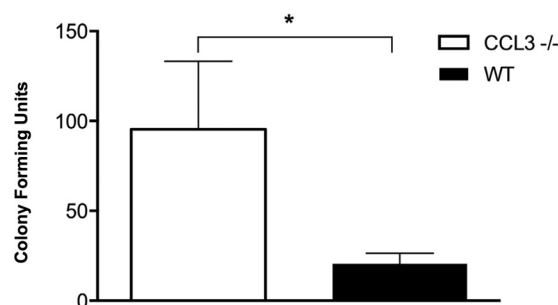
**FIG 6** Phagocytic and killing activities, assessed in peritoneal macrophages from *ccl3*<sup>-/-</sup> and WT mice. (A) Numbers of bacteria recovered from lysed macrophages after a 1-h ingestion period in culture and a 1-h exposure to gentamicin to kill extracellular bacteria (a measure of phagocytosis) were quantified by colony counting. Phagocytosis was significantly impaired in *ccl3*<sup>-/-</sup> macrophages (\*\*,  $P < 0.01$  as determined by a Mann-Whitney U test), compared to macrophages from WT mice. (B) Intracellular bacteria recovered 3 h after NTHi ingestion and gentamicin treatment as a percentage of the number observed at 1 h (a measure of intracellular killing). Bacterial killing by *ccl3*<sup>-/-</sup> macrophages and that by WT macrophages were similar (Mann-Whitney U test) ( $n = 6$  per time point and strain; bars and error bars represent means  $\pm$  SEM). ns, nonsignificant.

killing of bacteria that were phagocytosed did not significantly differ between the two strains (nonsignificant by a Mann-Whitney U test) (Fig. 6B).

**Higher bacterial load in the nasopharynx of CCL3<sup>-/-</sup> mice.** In order to determine whether the genetic loss of CCL3 is correlated with an increased bacterial load in the nasopharynx, we collected nasopharynx samples from both *ccl3*<sup>-/-</sup> and WT mice. The mean bacterial load of nasopharynx cultures obtained from *ccl3*<sup>-/-</sup> animals was significantly higher than that in cultures obtained from WT animals ( $P < 0.05$  by a Mann-Whitney U test) (Fig. 7). In order to rule out general infection/hematogenous dissemination of bacteria, we collected blood samples from the same animals. Blood cultures were negative for all tested animals of both strains.

## DISCUSSION

The results of this study demonstrate that many CCL genes are regulated during acute OM, with CCL3 being the most highly expressed. Moreover, the lack of CCL3 has a significant effect upon the pathogenesis of and recovery from OM induced by NTHi. This effect includes a delayed early recruitment of leukocytes into the ME (Fig. 2). In addition, a longer duration of OM was evidenced by persistent ME mucosal hyperplasia and leukocyte infiltration (Fig. 2 and 3) and delayed bacterial clearance, with MEs showing infection even 21 days after ME inoculation (Fig. 4 and Table 1). This was associated with a reduced ability of CCL-null macrophages to phagocytose NTHi (Fig. 5) and increased bacterial colonization of the naive nasopharynx by murine bacterial pathogens (Fig. 6).



**FIG 7** Presence of bacteria determined as CFU detected per microliter loop sample scraped from the nasopharynx of *ccl3*<sup>-/-</sup> versus WT mice. None of the mice tested had been previously infected with NTHi in the ME; thus, the CFU represent murine bacterial species. Significantly more bacteria were cultured from the nasopharynxes of *ccl3*<sup>-/-</sup> mice than from those of WT animals (\*,  $P < 0.05$  as determined by a Mann-Whitney U test) ( $n = 6$  to 8 per strain; bars and error bars represent means  $\pm$  SEM).

The CCL genes expressed in the ME included some that displayed biphasic regulation, with an initial peak in the first hours after NTHi inoculation and then a reduction at 24 h, followed by a second peak at 48 to 72 h. This was observed in both gene array and qPCR data (Fig. 1 and 2). This pattern was also noted more broadly in the complete transcriptome of acute OM (11). We can only speculate on the physiologic meaning of such responses. However, in the case of CCLs, they are produced in response to inflammation. Thus, the early peak in CCL expression may be related to the initial inflammatory response to bacteria. The later peak may be produced in response to inflammation induced by neutrophils and cytokines, both of which peak in the ME at around 24 h.

The delayed recruitment of neutrophils to CCL3-null MEs is consistent with the known role of this chemokine as a polymorphonuclear leukocyte (PMN) chemoattractant and activator (18–20, 23, 24). As at other sites, neutrophils are the first leukocytes to enter the ME in response to inflammation or infection, with macrophages entering 1 to 2 days later (25–27). Our data suggest that for the initial attraction of granulocytes to the ME, CCL3 plays a dominant role. The early expression of the *cc13* gene during NTHi-induced ME infection in WT animals (Fig. 1) is consistent with such a role. It would also appear that, at later stages of infection, other chemoattractants with redundant functions are able to compensate for the lack of CCL3. These chemoattractants include CCL7 and CCL12, which show enhanced expression levels in CCL3-null MEs. Other CCLs, the CXCL chemokines, which are broadly involved in neutrophil chemoattraction, and select cytokines may also participate.

The early recruitment of macrophages into the ME was unaffected by the lack of CCL3. Since CCL3 is known to chemoattract macrophages, this suggests that other chemokines predominantly regulate the entry of this cell type into the ME. As shown in Table S1 in the supplemental material, several other macrophage chemoattractants are upregulated in the ME both early and late during OM.

Our observation of delayed, but not decreased, inflammatory cell recruitment in CCL3-null mice (Fig. 3A) was unanticipated in view of the known role of CCL3 as a chemoattractant in the pathogenesis of various inflammatory diseases, its high level of expression during OM, and its broad chemoattractant profile. In contrast to our results, several other studies on infection at other sites in *cc13*<sup>-/-</sup> mice reported a diminished infiltration of leukocytes (28–31). However, in accordance with our observations, inflammatory cell migration was not reduced in CCL3-null models of pulmonary infection (25) or periodontitis (32). Clearly, the context of CCL3 deletion can play a critical role in the null phenotype. This may well reflect the differing roles of redundant factors at various sites and under different inflammatory conditions.

The issue of functional redundancy between chemokines has been much discussed in recent literature. Chemokine receptors are promiscuous, as they are known to bind several different chemokines, and chemokines in turn can bind with high affinity to several different receptors. Thus, CCR1 and CCR5, the two receptors known to bind CCL3, are not selective for this chemokine. CCR5, for example, can also bind CCL4 and CCL5. Both of these chemokines are known to exert overlapping functions with CCL3. Other chemokines such as CCL2, CCL7, and CCL12 bind to different receptors but similarly recruit inflammatory cells, while cytokines such as macrophage migration inhibitory factor (MIF) can also be cooperatively involved in the trafficking of leukocytes (18, 33). Support for the possibility of redundancy comes from studies demonstrating enhanced expression levels of alternative chemokines as a mechanism of compensation for a genetic loss of CCL3 in other systems (27, 34). We evaluated the expression levels of CCL2, CCL7, and CCL12, regulated over the same time period as CCL3 during OM, in *cc13*<sup>-/-</sup> mice. We detected significant differences in the expression levels of all three genes, with most expression levels being higher at intervals of 2 days or less after inoculation, and lower thereafter, than those in WT mice. These increases in expression levels are consistent with a compensatory response to CCL3 deletion. An exception to this was observed for CCL2, for which the expression level was lower at 6 h. This might reflect the lower number of neutrophils present early during OM, since this CCL is

produced by PMNs, while CCL7 and CCL12 are not (18, 19, 24). Of course, other chemokines and cytokines that we did not assess may also help to compensate for CCL3 deletion.

Both neutrophils and macrophages persisted in *ccl3*<sup>-/-</sup> MEs longer than in WT MEs, in agreement with the results of our prior study (13) using antibody-mediated depletion of CCL3, but persisted for much longer periods in the genetic model. This persistence seems most likely to be due to the prolonged presence of NTHi, as has been observed with other defects in innate immunity (13–15). This could well be related to the phagocytic defect in *ccl3*<sup>-/-</sup> macrophages. However, it is possible that neutrophil bactericidal activity is also reduced in CCL3-null animals and that this contributes to persistence. The defect in macrophage NTHi phagocytosis due to the loss of CCL3 is consistent with data from a previous study of *Pseudomonas aeruginosa* uptake in *ccl3*<sup>-/-</sup> macrophages (22). Further evidence for the importance of CCL3 for macrophage function is provided by our previous finding that CCL3 was able to correct functional deficits in macrophages deficient in TLR2, MyD88, TNF (21), or CCL3 (22) (Fig. 5B). However, in contrast to our results, *ccl3*<sup>-/-</sup> macrophages displayed a defect in the intracellular killing of *P. aeruginosa* (22), while we saw no defect in the killing of NTHi. This could be related to the differential sensitivities of these bacterial species to the killing mechanism involved.

The OM phenotype observed in *ccl3*<sup>-/-</sup> animals is similar in many respects to that seen in mice genetically deficient for some TLR genes or TLR signaling genes. Mice with mutations in TLR2 (15), MyD88 (14), or TNF (13) are impaired in the clearance of NTHi from the ME, with a concomitant delay in mucosal recovery. However, our present study found that CCL3 deletion produces a somewhat milder OM phenotype. The deletion of these other genes caused a near-complete failure to resolve OM, as presented by a persistent inflammatory response with significant mucosal hyperplasia and the presence of bacteria in the ME at 21 or even 42 days postinoculation (13–15). Given the large number of other downstream molecules in innate immune pathways, including cytokines, other chemokines, and antimicrobials that are elicited by innate immune receptors, our findings are not surprising. In fact, given these many potentially redundant factors, the extent of the defect in recovery from OM caused by CCL3 deletion might be somewhat unexpected.

The ME would obviously not be predicted to be the only site affected by *ccl3* gene deletion. The nasopharynx is the ecological niche for many commensal bacteria and potential respiratory pathogens. Ultimately, the colonization of the upper airways is a prerequisite for subsequent infection of the lower respiratory tract and ME (35, 36). Any imbalance of this complex microbiome, both qualitative and quantitative, may increase susceptibility to the spread of infection (3, 5). Since our nasopharyngeal cultures revealed that *ccl3*<sup>-/-</sup> mice were colonized with bacteria to a significantly higher degree than WT mice (Fig. 6), it seems likely that CCL3 is an important determinant of nasopharyngeal homeostasis. CCL3 may therefore be a determinant of resistance to ME infection beyond its direct role in the ME. However, it should be noted that despite the observation of increased bacterial colonization of the nasopharynx, the MEs of naive *ccl3*<sup>-/-</sup> mice were culture negative and showed no signs of inflammation such as increased mucosal thickness or the presence of leukocytes. Mice lacking MyD88 (14), TLR2 (15), or TNF (13) all displayed some signs of ME inflammation even in the absence of NTHi inoculation. Enhanced nasopharyngeal colonization has been cited as contributing to the etiology of OM (3). However, the lack of CCL3 alone does not appear to facilitate *de novo* ME infection from the nasopharynx.

With increased microbial antibiotic resistance resulting from the extensive use of antibiotics for the treatment of acute OM (37), there is an urgent need to develop novel therapeutic agents for otitis-prone children who suffer from recurrent or chronic ME disease. Promising results from the *in vivo* application of CCL3 in animals with OM recovery deficits (13) and the conclusions of our present study make this chemokine and its receptors interesting therapeutic targets.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** For CCL gene expression studies, WT C57/WB F1 hybrid mice (gene array) or C57BL/6 mice (qPCR) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). For the evaluation of OM without CCL3, CCL3-deficient (CCL3<sup>-/-</sup>) mice (B6.129P2-Ccl3tm1Unc/J) and age-matched WT mice (C57BL/6J) from the Jackson Laboratory were bred in our animal facility. Animals were housed under specific-pathogen-free conditions. All experiments were performed according to NIH guidelines following approval by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Veterans Affairs Medical Center, San Diego, CA.

**Bacteria.** *Haemophilus influenzae* strain 3655 (nontypeable, biotype II), originally isolated from the ME of an OM patient in St. Louis, Missouri, USA (kindly provided by Asa Melhus, Lund University, Sweden), was used at a concentration of 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> bacteria/ml to induce infection of the ME. Inocula were prepared as described previously (38, 39).

**Surgery.** For gene expression studies, WT mice were used in groups of 20 per gene array. For the evaluation of OM in *ccl3*<sup>-/-</sup> mice, KO and WT C57BL/6J mice were divided into groups of at least 6 mice for each experimental time point (3 to 8 animals for histopathology and bacterial culture, respectively). All surgeries were performed under standard aseptic conditions. As described previously, all animals were deeply anesthetized, and approximately 5  $\mu$ l of an NTHi inoculum was bilaterally injected into the ME via the surgically exposed ME bulla (39, 40). Following inoculation, the tympanic membranes were confirmed visually to be intact. Uninoculated animals (time 0 h) served as controls.

**ME CCL gene expression.** ME mucosae were harvested from 40 deeply anesthetized WT mice 0, 3, and 6 h as well as 1, 2, 3, 5, and 7 days after inoculation of NTHi in saline. The tissues from 20 mice were pooled to generate two samples at each time point. Groups of control mice were injected with saline alone. The tissue was homogenized in TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), and total RNA was extracted. Total RNA quality was assessed by using the RNA 6000 Labchip kit on the Agilent 2100 bioanalyzer for the integrity of 18S and 28S rRNAs. The mRNA was reverse transcribed by using a T7 oligo(dT) primer and then *in vitro* transcribed by using T7 RNA polymerase to generate biotinylated cRNA probes that were hybridized to Affymetrix MU430 2.0 microarrays. Duplicate arrays were hybridized for each time point by using RNA from the two pools of mouse tissues to obtain independent biological replicates. Raw intensity data were median normalized, and statistical differences in gene transcript expression levels were evaluated by using variance-modeled posterior inference (VAMPIRE) (41). This program uses a Bayesian approach to identify altered genes. Statistical analysis by VAMPIRE requires two distinct steps: (i) modeling of the error structure of sample groups and (ii) significance testing with an *a priori*-defined significance threshold. VAMPIRE models the existing error structure to distinguish the signal from noise and identify the coefficients of expression-dependent and expression-independent variances. These models are then used to identify microarray features that are differentially expressed between treatment groups. This method allows the use of small numbers of replicates to evaluate gene expression across a continuum of conditions, down to two or even one array per condition if (as in the present study) many samples are pooled for each array (i.e., each array itself samples the mean value) and if multiple conditions are assessed. We compared mice inoculated with NTHi at each time point to uninoculated (0-h) controls to evaluate genes whose expression levels changed significantly over time following NTHi injection. Bonferroni multiple-testing correction ( $\alpha_{\text{Bonf}} < 0.05$ ) was applied to identify only those genes with the most robust changes. All CCL genes represented on the array were evaluated.

By using separate groups of three mice for each time point, the expression levels of CCL2, CCL7, and CCL12 mRNA were evaluated by qPCR, during the course of NTHi-induced OM in both WT and *ccl3*<sup>-/-</sup> mice. cDNA libraries were prepared from total RNA isolated from ME tissue and infiltrates by using the RNeasy kit (Qiagen, MD, USA). The RNA was reverse transcribed by using SuperScript III (Invitrogen, CA, USA) in a 25- $\mu$ l reaction mixture, and a final 100 ng of the cDNA was used for each real-time quantitative PCR determination. QuantiTect primers (Qiagen, Hilden, Germany), specific for each of the chemokines CCL2, CCL3, CCL7, and CCL12, were used to probe the cDNA templates. Real-time qPCR was performed by using the StepOnePlus PCR cyclor system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A 25- $\mu$ l reaction mixture containing 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  Sybr green PCR master mix (Applied Biosystems), 2.5  $\mu$ l of the primer (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ l cDNA, and 5  $\mu$ l water (molecular biograde) was set up in duplicates per sample. PCR cycling conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 40 s. The relative expression level of each of the cytokines was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) by using the  $\Delta\Delta C_T$  method. Melt curves were used to ensure a single amplicon amplification. Results shown in Fig. 5 represent data from 2 replicates, with error bars denoting the 95% confidence intervals.

**ME histology.** Mice used for histology were anesthetized and perfused intracardially with phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA). MEs were harvested at 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 days postinoculation; postfixed (4% PFA) overnight; decalcified (8% EDTA and 4% PFA) for 14 days; processed in paraffin; and then sectioned at 9  $\mu$ m. Hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections from standardized locations of the ME cavity were digitally recorded, and OM was quantified by using NIH Image-Pro (14, 40). Mucosal thickness was assessed at six standardized locations from each of 4 sections widely spaced throughout the ME (40). To provide an indirect measure of the number of infiltrating leukocytes, the area occupied by inflammatory cells on the section that displayed the maximum number of cells in the ME cavity, versus the total area of the cavity, was measured (40) to determine the percentage covered by leukocytes. To assess the density of cellular infiltrates and the proportions of neutrophils and macrophages comprising ME infiltrates, the two largest clusters of the cellular ME effusion for each ME were photographed ( $\times 400$  magnification), and the number of cells of

each type was counted. Histological measures were performed by two independent observers from sections blinded as to genotype, and the results were averaged to arrive at the final data values.

**ME cultures.** The *in vivo* clearance of NTHi was assessed in 36 *ccf3*<sup>-/-</sup> mice and 38 WT mice. At least 6 ears were sampled at each time point. A 1- $\mu$ l loop sample was obtained from the opened ME lumen 0 days (uninoculated control) and 1, 2, 3, 5, 10, 14, and 21 days after NTHi inoculation. Each loop was streaked over 4 successive quadrants of a chocolate agar plate (42). The plates were incubated for 24 h at 37°C prior to the evaluation of bacterial colonies. The colonization rate was calculated as the proportion of ME cultures positive for NTHi at each time point.

As described previously (14), a semiquantitative scoring system was used to further classify the degree of NTHi colonization per plate, with 0 indicating no CFU, 1 indicating CFU in one quadrant, 2 indicating CFU in two quadrants, 3 indicating CFU in three quadrants, and 4 indicating CFU in all four quadrants. The presence and identity of NTHi were verified by negative Gram staining and negative cultures on blood agar plates versus positive cultures on chocolate agar plates and bacitracin-incorporated chocolate blood agar (42).

**Nasopharyngeal cultures.** The bacterial loads in the nasopharynxes of 6 uninfected WT and 8 uninfected *ccf3*<sup>-/-</sup> mice were determined. A 1- $\mu$ l sample was obtained by scraping the nasopharyngeal mucosa of deeply anesthetized mice with a sterile loop. The sample was spread directly onto chocolate agar and incubated overnight at 37°C. All CFU identified on the plates were quantified by manual counting in triplicate.

**Blood cultures.** For the same mice (at least 6 per strain) used for nasopharyngeal cultures, bacteremia was monitored by culturing blood collected aseptically by cardiac puncture of anesthetized animals. A 1- $\mu$ l loop sample was streaked directly onto chocolate agar and assessed as described above.

**Macrophage phagocytosis and killing.** Macrophage phagocytosis and bacterial killing were assessed by using an established *in vitro* assay (13, 14). Primary peritoneal macrophages were obtained from 6 *ccf3*<sup>-/-</sup> and 6 WT mice as described previously (13, 14) and seeded into 48-well plates at  $5 \times 10^5$  cells per well in triplicate for each mouse and assay time point. Ten microliters of mid-exponential-phase NTHi bacteria ( $5 \times 10^7$  bacteria), a titer that does not saturate the cells, as demonstrated previously (13), was added to each well. After incubation for 1 h, extracellular bacteria were removed and killed by washing, followed by the addition of fresh Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), macrophage colony-stimulating factor, and 50  $\mu$ g/ml gentamicin. After the addition of gentamicin, incubation was continued for 1 or 3 h. The cells were then rinsed and lysed. Supernatants and cell lysates were plated onto chocolate agar in serial dilutions, incubated overnight at 37°C, and then evaluated by manually counting CFU. Six wells were used per time point and mouse strain. The recovery of bacteria after macrophage treatment with gentamicin for 1 h was used to represent phagocytosis. The ratio of the number of NTHi bacteria recovered after gentamicin treatment for 3 h compared to the number of bacteria recovered at 1 h posttreatment was considered to represent intracellular killing (14, 22). Percent bacterial killing was calculated as previously described (22), by using the following formula: % killing =  $1 - (\text{number of CFU in tested wells 3 h after cultivation with gentamicin} / \text{number of CFU in tested wells 1 h after cultivation}) \times 100$ .

**Statistical analysis.** Statistical analyses for studies other than gene expression analyses were performed by using GraphPad Prism 6 software. Data are reported as means  $\pm$  standard errors of the means (SEM). Differences were considered significant at a *P* value of  $<0.05$ . Two-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons was performed on measures of mucosal thickness. ME colonization rates were evaluated statistically by the Fisher-Irwin test for proportions. The Mann-Whitney U test was employed for data lacking a normal distribution, as for analyses of ME inflammatory cells, CFU counts for the nasopharynx, and lysate NTHi counts for the phagocytosis assay. Data normality was evaluated by using the D'Agostino-Pearson omnibus test. Left and right ears in each mouse were considered to be independent of each other, as previously discussed in detail (40), and therefore were analyzed independently.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/IAI.00148-17>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.1 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eduardo Chavez for mouse colony maintenance and Julie Lightner for editorial help.

We certify that we have no conflicts of interest.

A.F.R., S.I.W., D.D., and B.N. conceived of and designed the experiments. D.D., B.N., K.P., J.H., and K.S. performed the experiments. D.D., J.H., A.K., and A.F.R. analyzed the data. D.D., A.K., and A.F.R. wrote the manuscript.

The research reported in this work was supported by the NIDCD of the National Institutes of Health under awards DC000129 to A.F.R., DC006279 to S.I.W., DC012595 to A.F.R., and DC014801 to A.K. and by the Research Service of the Veterans Administration under awards BX001205 and RX000977, both to A.F.R.



The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

A.F.R. is a cofounder of and stockholder in Otonomy, Inc., a company that develops slow-release drug formulations for the middle and inner ears. The company played no role in this research.

## REFERENCES

- Ruohola A, Meurman O, Nikkari S, Skottman T, Salmi A, Waris M, Osterback R, Eerola E, Allander T, Niesters H, Heikkinen T, Ruuskanen O. 2006. Microbiology of acute otitis media in children with tympanostomy tubes: prevalences of bacteria and viruses. *Clin Infect Dis* 43:1417–1422. <https://doi.org/10.1086/509332>.
- Casey JR, Kaur R, Friedel VC, Pichichero ME. 2013. Acute otitis media otopathogens during 2008 to 2010 in Rochester, New York. *Pediatr Infect Dis J* 32:805–809. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31828d9acc>.
- Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. 1997. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis* 175:1440–1445. <https://doi.org/10.1086/516477>.
- Ruohola A, Pettigrew M, Lindholm L, Jalava J, Räisänen KS, Vainionpää R, Waris M, Tähtinen PA, Laine MK, Lahti E, Ruuskanen O, Huovinen P. 2013. Bacterial and viral interactions within the nasopharynx contribute to the risk of acute otitis media. *J Infect* 66:247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.12.002>.
- Revai K, Mamidi D, Chonmaitree T. 2008. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. *Clin Infect Dis* 46:e34–e37. <https://doi.org/10.1086/525856>.
- Bluestone CD. 1996. Pathogenesis of otitis media: role of Eustachian tube. *Pediatr Infect Dis J* 15:281–291. <https://doi.org/10.1097/00006454-199604000-00002>.
- Klein JO. 2000. The burden of otitis media. *Vaccine* 19(Suppl 1):S2–S8. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00271-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00271-1).
- Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD. 2001. Activation of NF-kappa B by nontypeable *Hemophilus [sic] influenzae* is mediated by Toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha/beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8774–8779. <https://doi.org/10.1073/pnas.151236098>.
- Janeway CA, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.
- Hernandez M, Leichtle A, Pak K, Webster NJ, Wasserman SI, Ryan AF. 2015. The transcriptome of a complete episode of acute otitis media. *BMC Genomics* 16:259. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1475-7>.
- MacArthur CJ, Hausman F, Kempton JB, Choi D, Trune DR. 2013. Otitis media impacts hundreds of mouse middle and inner ear genes. *PLoS One* 8:e75213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075213>.
- Leichtle A, Hernandez M, Ebmeyer J, Yamasaki K, Lai Y, Radek K, Choung YH, Euteneuer S, Pak K, Gallo R, Wasserman SI, Ryan AF. 2010. CC chemokine ligand 3 overcomes the bacteriocidal and phagocytic defect of macrophages and hastens recovery from experimental otitis media in TNF<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 184:3087–3097. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901167>.
- Hernandez M, Leichtle A, Pak K, Ebmeyer J, Euteneuer S, Obonyo M, Guiney DG, Webster NJ, Broide DH, Ryan AF, Wasserman SI. 2008. Myeloid differentiation primary response gene 88 is required for the resolution of otitis media. *J Infect Dis* 198:1862–1869. <https://doi.org/10.1086/593213>.
- Leichtle A, Hernandez M, Pak K, Yamasaki K, Cheng CF, Webster NJ, Ryan AF, Wasserman SI. 2009. TLR4-mediated induction of TLR2 signaling is critical in the pathogenesis and resolution of otitis media. *Innate Immun* 15:205–215. <https://doi.org/10.1177/1753425909103170>.
- Emonts M, Veenhoven RH, Wiertsema SP, Houwing-Duistermaat JJ, Walraven V, de Groot R, Hermans PW, Sanders EA. 2007. Genetic polymorphisms in immunoresponse genes TNFA, IL6, IL10, and TLR4 are associated with recurrent acute otitis media. *Pediatrics* 120:814–823. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0524>.
- Lee YC, Kim C, Shim JS, Byun JY, Park MS, Cha CI, Kim YI, Lee JW, Yeo SG. 2008. Toll-like receptors 2 and 4 and their mutations in patients with otitis media and middle ear effusion. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 1:189–195. <https://doi.org/10.3342/ceo.2008.1.4.189>.
- Rollins BJ. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909–928.
- Luster AD. 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436–445. <https://doi.org/10.1056/NEJM199802123380706>.
- Maurer M, von Stebut E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882–1886. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.019>.
- Leichtle A, Yamasaki K, Euteneuer S, Wasserman SI, Wollenberg B, Ryan AF. 2009. Impaired antibacterial function is restored via CCL3. *Otolaryngol Head Neck Surg* 141:82–83.
- Takahashi H, Tashiro T, Miyazaki M, Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F. 2002. An essential role of macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 on the expression of host's innate immunities against infectious complications. *J Leukoc Biol* 72:1190–1197.
- Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, Cunha FQ. 2005. MIP-1a[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-a and LTBA. *J Leukoc Biol* 78:167–177. <https://doi.org/10.1189/jlb.0404237>.
- Xue ML, Thakur A, Cole N, Lloyd A, Stapleton F, Wakefield D, Willcox MD. 2007. A critical role for CCL2 and CCL3 chemokines in the regulation of polymorphonuclear neutrophils recruitment during corneal infection in mice. *Immunol Cell Biol* 85:525–531. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100082>.
- Lindell DM, Standiford TJ, Mancuso P, Leshen ZJ, Huffnagle GB. 2001. Macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 is required for clearance of an acute *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection. *Infect Immun* 69:6364–6369. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6364-6369.2001>.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127:514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
- Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik. 2001. *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th ed. Garland Science, New York, NY. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27122/>.
- Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O. 1995. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 269:1583–1585. <https://doi.org/10.1126/science.7667639>.
- Lu P, Li L, Wu Y, Mukaida N, Zhang X. 2008. Essential contribution of CCL3 to alkali-induced corneal neovascularization by regulating vascular endothelial growth factor production by macrophages. *Mol Vis* 14:1614–1622. <http://www.molvis.org/molvis/v14/a191>.
- Heinrichs D, Berres M, Nellen A, Fischer P, Scholten D, Trautwein C, Wasmuth HE, Sahin H. 2013. The chemokine CCL3 promotes experimental liver fibrosis in mice. *PLoS One* 8:e66106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066106>.
- Yang X, Walton W, Cook DN, Hua X, Tilley S, Haskell CA, Horuk R, Blackstock AW, Kirby SL. 2011. The chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, mediate thoracic radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:127–135. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0265OC>.
- Repeke CE, Ferreira SB, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, Silva JS, Garlet GP. 2010. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone* 46:1122–1130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.12.030>.

33. Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ, Ralph JA, Hall P, Yang YH, McColl SR, Hickey MJ. 2006. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol* 177: 8072–8079. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8072>.
34. Yanaba K, Mukaida N, Matsushima K, Murphy PM, Takehara K, Sato S. 2004. Role of CC chemokine receptors 1 and 5 and CCL3/macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in the cutaneous Arthus reaction: possible attenuation of their inhibitory effects by compensatory chemokine production. *Eur J Immunol* 34:3553–3561. <https://doi.org/10.1002/eji.200425426>.
35. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study group. *N Engl J Med* 344:11–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>.
36. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4:144–154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7).
37. Grijalva CG, Nuorti JP, Griffin MR. 2009. Antibiotic prescription rates for acute respiratory tract infections in US ambulatory settings. *JAMA* 302: 758–766. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1163>.
38. Melhus A, Hermansson A, Prellner K. 1994. Nontypeable and encapsulated *Haemophilus influenzae* yield different clinical courses of experimental otitis media. *Acta Otolaryngol* 114:289–294. <https://doi.org/10.3109/00016489409126058>.
39. Melhus A, Ryan AF. 2003. A mouse model for acute otitis media. *APMIS* 111:989–994. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x>.
40. Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Ebmeyer U, Sudhoff H, Broide D, Ryan AF, Wasserman S. 2005. Role of mast cells in otitis media. *J Allergy Clin Immunol* 116:1129–1135. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.07.026>.
41. Hsiao A, Ideker T, Olefsky JM, Subramaniam S. 2005. VAMPIRE microarray suite: a Web-based platform for the interpretation of gene expression data. *Nucleic Acids Res* 33:W627–W632. <https://doi.org/10.1093/nar/gki443>.
42. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed). 1995. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, DC.