



Die Rolle von Autophagieverbindungen im Hinblick auf Ototoxizität: Eine In-vitro-Screening Studie.

Clara Draff^{1,4}, Taylor Wyrick¹, Eduardo Chavez^{1,2}, Kwang Pak^{1,3}, Stefan Dazert⁴
Allen F. Ryan^{1,2,3}

¹ Department of Surgery / Otolaryngology,
² Department of Neurosciences* University of California, San Diego,
³ Department San Diego VA Medical Center, La Jolla, California, USA*
⁴ Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Ruhr-Universität Bochum im St. Elisabeth-Hospital



HINTERGRUND

Autophagie ist ein intrazellulärer, lysosomal-vermittelter Prozess, bei dem dysfunktionelles HZ-Material abgebaut und recycelt wird (1,2). Dabei entsteht ein dynamisches System zwischen Autophagie, Zellmetabolismus und Redox-Gleichgewicht (4).

Während inzwischen nachgewiesen werden konnte, dass Autophagie bei Haarzellschäden (HZ) auftritt, ist die bisherige Studienlage gemischt. Einige unterstützen die These, dass Autophagie HZ-Schäden reduziert (3), andere wiederum weisen auf eine Beteiligung der HZ-Destruktion hin (5). Weitere Studien konnten Autophagieverbindungen eine Doppelrolle zusprechen, bei der Autophagie frühzeitig im Schadensprozess Schutz bietet. Am Zelltod kann die Autophagie dennoch partizipieren, wenn die Schutzreaktion überwältigt wird (6). So wird diskutiert, dass Autophagie oxidativen Stress in HZ unterdrückt oder alternativ, dass oxidativer Stress die HZ-Schutzwirkung von Autophagie vermindert (7).

Folglich lag das Ziel der vorliegenden Studie darin, ein breites Spektrum von Verbindungen zu untersuchen, welche auf verschiedene Aspekte der Autophagie abzielen und deren Auswirkungen auf den HZ-Untergang infolge von Gentamicin (GM)-Toxizität zu bewerten.

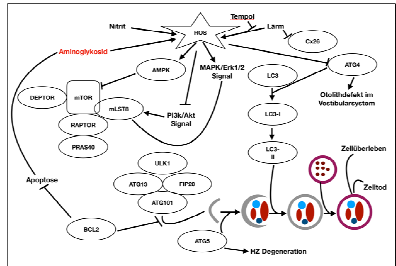


Abb. 1: Der Signalweg der Autophagie und dessen Beziehung zum auditorischen System (Abb. modifiziert nach (1)).

Makroautophagie: Ein Teil des Endoplasmatischen Retikulums umschließt die abzubauenden Strukturen und isoliert diese mit einer doppelten Biomembran (Autophagosom). Das Autophagosom bindet unter Hydrolyse an ein Lysosom. Dies resultiert in der Degradierung der autophagosomalen Komponenten.

MATERIAL UND METHODEN

Tiere. Es wurden Neonaten (3-5 Tage) von pou4f3/GFP transgenen Mäusen verwendet, in denen Haarzellen grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren. Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des National Institutes of Health durchgeführt und von dem Veteran Affairs San Diego Medical Center IACUC genehmigt.

Microdissektion. Das Cortische Organ der Jungtiere wurde unter dem Mikroskop präpariert und die apikalen Windungen wurden verworfen, die gegenüber Aminoglykosiden (AGS) empfindlich waren. Die basalen und mittleren Windungen wurden in sogenannte Mikroexplantate unterteilt.

Screening. Es erfolgte gezieltes Screening der "SELLECKChem Autophagy compound library", welche aus 154 Autophagieverbindungen (AV) besteht. Jedes Mikroexplantat wurde in ein Well einer mit Nährmedium enthaltenen 96-Well Mikrotiterplatte positioniert. Jeweils drei Wells wurden mit 200µM Gentamicin (GM) sowie drei Dosierungen einer Autophagieverbindung behandelt. Die höchste Dosis diente als Kontrolle der Toxizität der Testsubstanz. Drei Wells mit GM fungierten als Negativkontrolle, drei Kammern mit Nährmedium als Positivkontrolle.

Evaluation. Die 96-Well Mikrotiterplatte wurde drei Tage lang in einem mit 5% CO2 begasteten Inkubator bei 37° kultiviert und zu Beginn sowie alle 24h fotografiert. Die Zellzahl wurde anschließend manuell und mittels des ImageJ Programmes gezählt und ausgewertet. Autophagieverbindungen, die im Vergleich zur Negativkontrolle ein verbessertes GFP+ HZ Überleben aufwiesen, galten als protektiv. Testsubstanzen, bei welchen auch ohne GM ein verstärkter Verlust von Haarzellen zu verzeichnen war, wurden als toxisch vermerkt. Bei Autophagiesubstanzen, die einen protektiven Effekt aufwiesen, erfolgte eine erneute Durchführung zur Verifizierung.

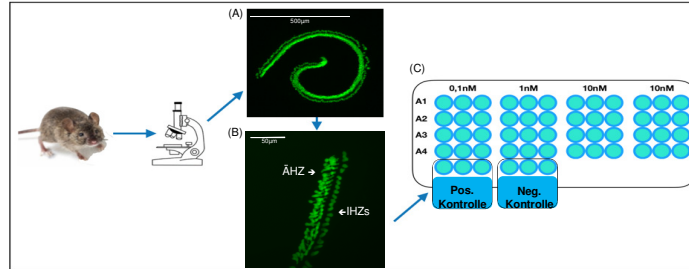


Abb. 2: Methodik. Der Weg des Cortischen Organs (A) der pou4f3/GFP transgenen Maus zu Mikroexplantaten (B) in die mit Nährmedium, Autophagieverbindung (A1-A4) und Gentamicin angereicherte Mikrotiterplatte (C). Das Mikroexplantat des Cortischen Organs (B) besteht aus ~25 inneren Haarzellen (iHZ) und äußeren Haarzellen (ÄHZ).

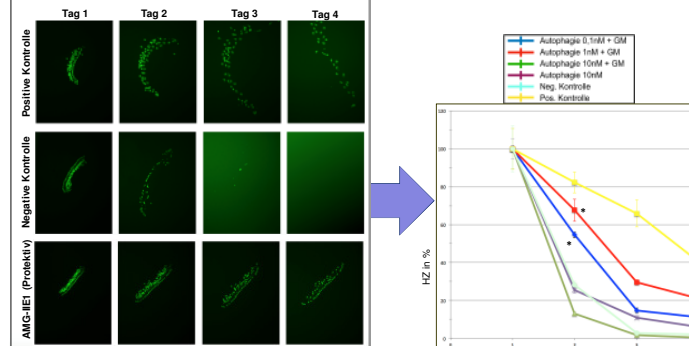


Abb. 3.1: Überblick der HZ Abnahme über 72h
Abb. 3.2: AMG-IIB6 Ergebnisse: Beispiele für Autophagieverbindungen mit protektiver Wirkung (3.1B + 3.2), ausbleibender Wirkung (3.3) und toxischer Wirkung (3.4).
3.2.: **Protektiver Effekt:** Nach der Behandlung mit Gentamicin ist das Überleben der HZ im Vergleich zu der negativen Kontrolle an Tag 2, 3 und 4 signifikant verbessert (*p < 0.05). AMG-IIB8 wirkt protektiv in den zwei niedrigeren Konzentrationen, während es in der höchsten Dosis einen toxischen Effekt hat.
3.3.: **Wirkungslos:** Die Autophagieverbindung AMG-IIC10 weist in allen drei Dosierungen keine Wirksamkeit auf.
3.4.: **Toxischer Effekt:** Die Testsubstanz AMG-IID9 führt selbst ohne Gentamicin Behandlung zum Haarzellenverlust.

ERGEBNISSE

Gesamtzahl der Autophagieverbindungen	Protektiver Effekt	Wirkungslos	Toxischer Effekt	Protektiv & toxischer Effekt
N=154 (100%)	15 (9,74%)	135 (87,68%)	1 (0,65%)	3 (1,94%)

Tab. 1: Ergebnisübersicht

Die Mehrheit der 154 Autophagie induzierenden und / oder Autophagie inhibierenden Verbindungen hatte keinen Einfluss auf den GM bedingten HZ Untergang. Eine Untergruppe von Autophagieverbindungen (s. u.) zeigte jedoch eine signifikante, dosisabhängige, protektive Wirkung. Eine weitere Untergruppe wies auch in Abwesenheit von GM signifikanten Haarzellverlust auf. Jene Effekte ließen sich überwiegend an Tag 2 und Tag 3 nachweisen.

Autophagieverbindungen	Effekt	Funktion	Autophagieverbindungen	Effekt	Funktion
AMG-IIA1	Protektiv	Selektiver Dopamin D1 Rezeptor Antagonist	AMG-IIF3	Toxisch	Klasse I PI3K/mTOR Inhibitor
AMG-IIA7	Protektiv	Reversibler, kompetitiver Proteasom Inhibitor von Uch-L1	AMG-IE7	Protektiv	Calcium Wiederaufnahme Inhibitor
AMG-IIA9	Protektiv	Selektiver ATP-kompetitiver Inhibitor von mTOR	AMG-IG8	Protektiv (Dosisrelevant)	Calcium Kanal Blocker
AMG-IIB2	In niedriger Dosis: Protektiv In hoher Dosis: Toxisch	Zell-permeabler Proteasom und Calpain Inhibitor	AMG-IB7	Protektiv	Proton Pumpen Inhibitor
AMG-IIB3	Protektiv	Selektiver Pan-Aurora kinase Inhibitor	AMG-ID6	In niedriger Dosis: Protektiv In hoher Dosis: Toxisch	Calcium Kanal Blocker
AMG-IIB4	Protektiv	Selektiver Aurora A Inhibitor	AMG-IE1	Protektiv (Dosisrelevant)	Selektiver µ-Opioid Rezeptor Agonist
AMG-IIB5	Protektiv	NF-KB Inhibitor	AMG-IC2	Protektiv	Selektiver ROCK1 Inhibitor
AMG-IIB6	In niedriger Dosis: Protektiv In hoher Dosis: Toxisch	Laktam Antibiotikum und ATPase Inhibitor für Proteintransport	AMG-ID9	Protektiv	Calcium Kanal Blocker
AMG-IIC4	Protektiv	Reversibler Inhibitor von Abl und Mikrotubulus Polymerisation	AMG-IG1	Protektiv	Calcium Kanal Blocker
			AMG-IC1	Protektiv	Proteasom Inhibitor

Tab. 2 und Tab. 3: Protektive und toxische Effekte von Autophagieverbindungen auf Haarzellen nach GM Exposition.

DISKUSSION

Das gezielte Screening erwies sich als effiziente Technik für die Untersuchung von Autophagieverbindungen in multiplen Dosierungen im Hinblick auf die Auswirkungen auf die inneren und äußeren Haarzellen von Säugetieren. Bei einer Gruppe von Autophagieverbindungen zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige protektive Wirkung, die bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

In vorangegangenen Studien stellte sich bereits ein Inhibitor von mTOR als Autophagie induzierend und protektiv wirkend heraus (8). Andere Autophagie beeinflussende Substanzen wie Metformin und Temozolamid zeigten in unserem Assay keine signifikante Wirkung. Dies kann an der Dosis der Autophagieverbindungen liegen oder auch mit Faktoren des In-vitro-Screenings assoziiert sein.

SCHLUSSFOLGERUNG

Diese disparaten Ergebnisse weisen auf die Komplexität der Rolle der Autophagie bei der HZ-Schädigung infolge eines Ototoxins hin. Im Hinblick auf zukünftige Studien könnten weitere In-vitro Tests mit einer breiteren Vielfalt an Dosierungen der Autophagieverbindungen und In-vivo-Tests aufschlussreich und geeignet sein.

Diese Studie wurde durch ein Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) unterstützt.

LITERATUR

- He Z, Fang Q, Waaga M, Wu X et al.: *Role of Autophagy in Auditory System Development and Survival*. J. Otorhinolaryngol. Hear. Balance Med. 2016, 1, doi:10.3390/otobm1010007
- Mazharia N, Komatsu M: *Autophagy: Revisitation of Cells and Tissues*. Cell 2011, Volume 147, Issue 4, P729-741
- Kim YJ, Tian C, Kim J, Shin B, Cho O, Kim YS, Chung WH: *Autophagic flux: possible mechanism for delayed gentamicin-induced ototoxicity*. Sci Rep. 2017 Feb 1; 7:41306
- Lee J, Giordano S, Zhang J: *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling*. Biochem J. 2012 Jan 15; 441(2): p. 523-40.
- Taylor RR, Nevil G, Forge A: *Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions*. J Assoc Res Otolaryngol. 2008 Mar; 9(1): p. 44-64.
- Yuan H, Wang X, Hill K, Chen J, Lemasters J, Yang SM, Sha SH: *Autophagy attenuates noise-induced hearing loss by reducing oxidative stress*. Antioxid Redox Signal. 2015 May 20; 22(15): p. 1308-24.
- Suzhishvili NA, Hayashi K, Dan K, Goto F, Nomura Y, Fujikita M, Kanaki S, Komune S, Ogawa K: *Autophagy through AMPK and AMPK requires oxidative stress-induced membrane senescence in auditory cells*. Oncotarget. 2015 Feb 28; 6(6): p. 3644-55.
- Portillo-Núñez S, Esbrat P, Alcaraz M.J., Largo R.: *Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis*. Biochem. Pharmacol. 2016; 106: 1-10.