

# Ein heteromeres Schlangengift und die molekularen Details der Schmerzempfindung

Kristian Strømgaard\* und Anders S. Kristensen\*

Ionenkanäle · Schmerz · Naturstoffe · Schlangengifte

Verbindungen aus Organismen aller Bereiche des Lebens werden sind jeher als aktive Bestandteile in Heilmitteln genutzt. Trotz der Entwicklung von Hochdurchsatz-Screening-verfahren, computergestütztem Wirkstoffdesign und kombinatorischer Chemie sind Naturstoffe nach wie vor eine äußerst ergiebige Quelle für die Entdeckung neuer Verbindungen mit therapeutischer Wirkung, welche entweder direkt verwendet werden oder als Vorlage für synthetische Modifikationen dienen. Trotz dieser dominanten Rolle in der Arzneimittelforschung ist die Naturstoffforschung in den letzten Jahren erheblich zurückgegangen, besonders in der pharmazeutischen Industrie.

In der Vergangenheit haben niedermolekulare Naturstoffe aus Pflanzen und Mikroorganismen die Mehrheit aller Leitstrukturen für die Arzneimittelforschung geliefert. In den letzten Jahren haben jedoch auch die Fortschritte in der Biotechnologie und Proteinchemie die Verwendung von Peptiden und Proteinen als Arzneimittel für Menschen beschleunigt. Bisher sind die meisten Biopharmazeutika rekombinante Antikörper und Peptidhormone, es gibt aber auch schon erste Medikamente, die aus Peptiden oder Proteinen von Giften erzeugt wurden. Erwähnenswerte Beispiele hierfür sind das aus 25 Aminosäuren bestehende  $\omega$ -Conotoxin MVIIA (Ziconotid, Prialt) aus der Meeresschnecke *Conus magus*, das spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle blockiert und für die Behandlung von neuropathischem Schmerz verwendet wird, und Exendin-4 (Exenatid, Byetta), das aus 39 Aminosäuren besteht und aus der giftigen Gila-Krustenechse isoliert wurde. Das Peptid wirkt auf den glukagonähnlichen Peptid-1-Rezeptor (GLP-1) und wird bei der Behandlung von Typ-2-Diabetes verwendet.

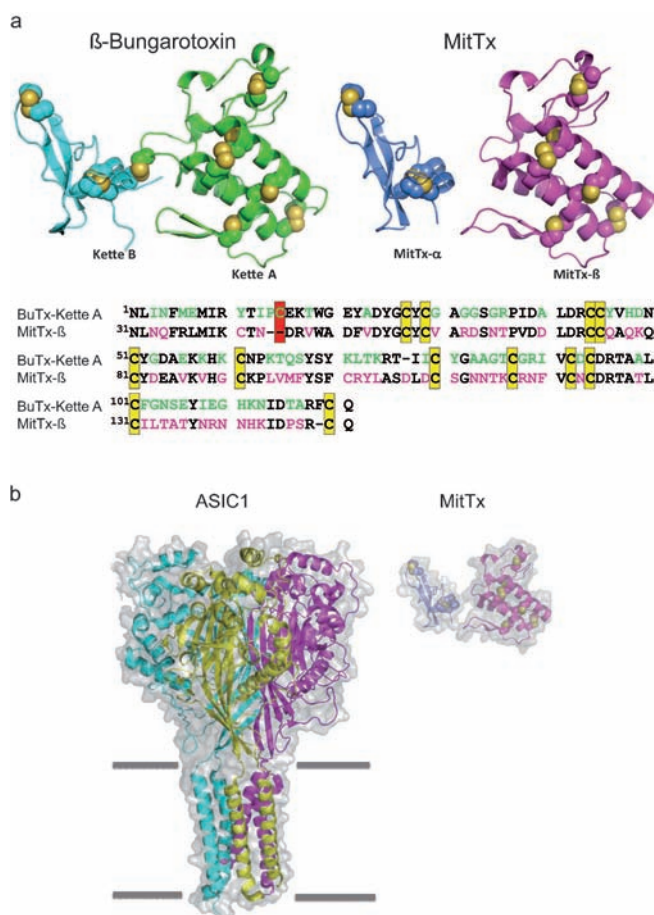
Naturstoffe sind zusätzlich zu ihrer Rolle in der Arzneimittelforschung auch von entscheidender Bedeutung als pharmakologische Werkzeuge in der biologischen Forschung. Auf diesem Gebiet haben sich Julius und Mitarbeiter verdient gemacht, die Naturstoffe als Werkzeuge verwendeten, um die Signalübertragung im Nervensystem zu verstehen. Beispielsweise nutzten sie das kleine Molekül Capsaicin, das für die brennende Schärfe von Chilis verantwortlich ist, um die mo-

lekulare und zelluläre Grundlage der Hitzeempfindung aufzuklären, indem sie zeigten, dass Capsaicin einen bis dahin unbekannten Ionenkanal aktiviert, den Transient-Rezeptor-Potential-V1-Rezeptor (TRPV1), auch bekannt als Capsaicinrezeptor.<sup>[2a]</sup> TRPV1 gehört zu einer Überfamilie sensorischer Rezeptoren für verschiedene Reize, der auch der kälte wahrnehmende TRPM8-Rezeptor angehört. Dieser Rezeptor wurde unter Verwendung des in Pfefferminzblättern enthaltenen Menthols, das ein Kältegefühl verursacht, ebenfalls von der Julius und Mitarbeitern entdeckt.<sup>[2b]</sup> Vor kurzem identifizierte dieselbe Arbeitsgruppe auch Peptidgifte (Vanillotoxine) sowie ein bivalentes Peptidgift aus Taranteln, die alle auf den TRPV1-Rezeptor wirken.<sup>[3]</sup>

In ihren jüngsten Arbeiten konnten Julius und Mitarbeiter erneut das enorme Potenzial zeigen, das die Kombination von Isolierung und Verwendung neuer Naturstoffe mit modernster biomolekularer Technologie birgt, um zuvor unbekannte Aspekte der Schmerzübertragung zu ermitteln. In diesem Fall war das Ziel die Identifizierung der aktiven Komponenten im Gift der Texas-Korallenotter, die beim Biss der Schlange das einzigartig-qualvolle Schmerzempfinden verursachen. Durch eine Reihe von biochemischen, biophysikalischen und genetischen Experimenten identifizierten sie zunächst die schmerzauslösende Komponente des Giftes, ein heteromeres Protein, und ermittelten dann dessen molekulares Ziel, eine Untergruppe säureempfindlicher Ionenkanäle (ASICs, acid-sensitive ion channels), die in sensorischen Nervenzellen vorkommen. Schließlich verwendeten sie das Gift, um eine zuvor unbekannte Funktion dieses sensorischen Rezeptors bei der Schmerzempfindung aufzuzeigen.<sup>[4]</sup>

Interessanterweise stellten sie fest, dass nur die Kombination zweier Teile des Giftes mit jeweils einem Protein einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslöst. Dieser Anstieg ist ein deutliches Zeichen für die Aktivierung der intrazellulären Kaskaden zur Schmerzsignalisierung in Nervenzellen. Thermodynamische Analysen dieser beiden Proteinkomponenten, MitTx- $\alpha$  und MitTx- $\beta$ , zeigen, dass sie leicht und nicht-kovalent den heterodimeren Komplex MitTx bilden. Somit aktiviert nur der Proteinkomplex, nicht jedoch die einzelnen Komponenten MitTx- $\alpha$  und MitTx- $\beta$ , die sensorische Übertragung in diesen Nervenzellen. Die Aminosäuresequenzen von MitTx- $\alpha$  und MitTx- $\beta$  zeigen, dass sie einen ähnlichen Aufbau wie gut bekannte Proteine aufweisen (Abbildung 1). MitTx- $\alpha$  ist ein 6-kDa-Protein des Kunitz-Typs, welche meist Proteasehemmer sind, während MitTx- $\beta$  den Phospholipase-A2-Enzymen (PLA<sub>2</sub>) ähnelt, die in einer

[\*] Prof. K. Strømgaard, Prof. A. S. Kristensen  
Department of Medicinal Chemistry, University of Copenhagen  
Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen (Dänemark)  
E-Mail: ask@farma.ku.dk  
krst@farma.ku.dk  
Homepage: <http://www.farma.ku.dk/chembiol>



**Abbildung 1.** a) Modell der MitTx-Struktur (rechts), basierend auf  $\beta$ -Bungarotoxin (links; BuTx, pdb 1BUN) und Ausrichtung der Aminosäuresequenz von MitTx- $\beta$  mit der A-Kette von  $\beta$ -Bungarotoxin. Die an intramolekulare Disulfidbrücken beteiligten Cys-Reste sind als gelbe Kugeln dargestellt. Cys-Reste, die eine domänenübergreifende Disulfidbrücke in BuTx bilden, jedoch nicht in MitTx enthalten sind, sind als rote Kugeln dargestellt. b) Röntgenkristallstruktur von ASIC1 und das Modell von MitTx.

Vielzahl von Schlangengiften enthalten sind. Dieser heteromere Komplex ähnelt einer anderen Gruppe von Schlangengiften, den  $\beta$ -Bungarotoxinen, die aus einer funktionellen PLA<sub>2</sub>-Domäne und einer Kunitz-Typ-Domäne bestehen, welche ein kovalent gebundenes Heterodimer bilden, das durch eine domänenübergreifende Disulfidbrücke gebunden ist (Abbildung 1).<sup>[5]</sup>

Die Julius-Gruppe konzentrierte sich auf die Ermittlung des Mechanismus, durch den der MitTx-Komplex die intrazelluläre Reaktion in den Nervenzellen auslöst. Nachdem sie ausgeschlossen hatten, dass die enzymatische Aktivität von PLA<sub>2</sub> eine Rolle spielt, verwendeten sie Elektrophysiologie, um die Ionenkanalaktivität in den sensorischen Nervenzellen bei der Zuführung von MitTx zu überwachen. Sie stellten fest, dass der auslösende Mechanismus mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der Aktivierung von Kationenkanälen beginnt. Daher prüften sie eine Klasse von ionotropen sensorischen Rezeptoren, bei denen es sich um säureempfindliche Ionenkanäle (ASICs) handelt, die dafür bekannt sind, dass sie bei der Schmerzübermittlung eine Rolle spielen. Es stellte sich

heraus, dass die einzelnen Komponenten inaktiv sind, der MitTx-Komplex jedoch ein wirksamer und selektiver Aktivator einer Reihe von ASIC-Untertypen ist. ASICs sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die durch pH-Änderungen aktiviert werden und in sensorischen Nervenzellen des peripheren Nervensystems (PNS) genauso wie in zentralen Nervenzellen im Gehirn exprimiert werden. Strukturell sind sie aus drei Proteinuntergruppen aufgebaut, welche entweder als Homomere oder Heteromere vorliegen. ASICs enthalten eine extrazelluläre, protonenempfindliche Domäne, die bei der Protonierung des Sensors einen in die Membran eingelagerten Ionenkanal öffnet, der hauptsächlich für Na<sup>+</sup>-Ionen durchlässig ist. Das Absinken des physiologischen pH-Werts (etwa pH 7.4) ist häufig mit Gewebeschäden und Entzündungen verbunden, und ASICs werden im PNS von sensorischen Nervenzellen verwendet, um als pH-sensitive Schmerzrezeptoren Gewebeschäden zu melden. In Menschen und Nagern sind vier Gene zur Codierung der ASIC-Untereinheiten vorhanden (ASIC1–ASIC4). ASIC1 und ASIC2 können weiterhin als verschiedene Spleißvarianten exprimiert werden (ASIC1a, ASIC1b und ASIC2a, ASIC2b). Beim Testen von MitTx an in *Xenopus oocytes* exprimierten Subtypen der ASICs wurde festgestellt, dass MitTx bei allen ASICs-Subtypen als offensichtlicher Agonist wirkt. MitTx zeigte aber vor allem eine sehr unterschiedliche Wirksamkeit, mit Aktivitäten für die ASIC1a- und ASIC1b-Subtypen im niedrigen nanomolaren Bereich und mehr als 100-fach niedrigerer Wirksamkeit für die ASIC2- und ASIC3-Subtypen. MitTx zeigte keine Wirkung auf eine Reihe anderer sensorischer Rezeptoren, die typischerweise in sensorischen Nervenzellen wie TRPV1 vorhanden sind. Dies bedeutet, dass MitTx ein hochselektiver Antagonist von ASIC1-Rezeptoren ist.

Nachdem der ASIC1-Subtyp als potenzielles Target für MitTx ermittelt worden war, verwendete die Julius-Gruppe transgene Mäuse, in denen einzelne ASIC-Gene entfernt worden waren, um zu bestätigen, dass die Effekte von MitTx in vivo tatsächlich von ASIC1-Rezeptoren verursacht werden. Tiere ohne Expression von ASIC1 zeigten tatsächlich kein MitTx-schmerzbezogenes Verhalten, wohingegen Tiere ohne ASIC3 keine Unterschiede zu Wildtyp-Tieren aufzeigten. Darüber hinaus war der Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den sensorischen Nervenzellen nach der MitTx-Zugabe in Mäusen ohne ASIC1 wesentlich geringer als in solchen ohne ASIC3 oder in Wildtyp-Mäusen. MitTx ist somit ein wirksames und selektives Werkzeug, um die Rolle des ASIC1-Rezeptors bei der Schmerzempfindung zu testen. Damit lassen sich unmittelbar neue Erkenntnisse gewinnen, indem gezeigt wird, dass ASIC1-exprimierende sensorische Nervenzellpopulationen eine bislang unbeachtete Rolle bei der Schmerzempfindung spielen. Dies ist von Bedeutung, da der Fokus in der Erforschung der Bedeutung von ASICs bei der Schmerzübertragung bisher hauptsächlich auf den ASIC3-Subtyp gerichtet war.

Akute und chronische Schmerzzustände wie beispielsweise neuropathische Schmerzen sind ein großes, bisher nicht behandeltes therapeutisches Gebiet. Selbstverständlich hat MitTx kein direktes Potenzial als Wirkstoffkandidat, da es Schmerzen induziert. Für die Schmerzforschung und die

Rolle der ASICs im Speziellen ist MitTx jedoch ein wichtiges pharmakologisches Werkzeug, das wahrscheinlich von großem Nutzen für die Entwicklung von auf ASICs wirkende Verbindungen sein wird.<sup>[4]</sup> Da sowohl MitTx- $\alpha$  als auch MitTx- $\beta$  zu Proteinklassen mit bekannter Gerüststruktur gehören und der heteromere Komplex MitTx den  $\beta$ -Bungarotoxinen ähnelt, erscheint es angemessen, die Struktur von MitTx mittels Molecular Modeling vorherzusagen (Abbildung 1). Bemerkenswert ist, dass MitTx ein nicht-kovalenter Komplex ist, während in  $\beta$ -Bungarotoxinen die beiden Domänen kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das in  $\beta$ -Bungarotoxinen für diese domänenübergreifende Bindung zur A-Kette zuständige Cystein in der B-Kette ist jedoch in MitTx nicht vorhanden (Abbildung 1). Dies könnte allerdings Verbesserungen der molekularen Eigenschaften von MitTx durch Verbindung der beiden Hälften ermöglichen, wobei generell proteinmedizinisch-chemische Studien von großem Interesse sind, um die Wirksamkeit und Selektivität weiter zu steigern.

Bezüglich des molekularen Mechanismus stehen viele Fragen offen, etwa die der ASIC-Anpassung durch MitTx und den Details, wie sich MitTx an den Ionenkanal bindet und wie dies dessen Funktion beeinflusst. Julius und Mitarbeiter führen den Mechanismus, durch den MitTx Agonisten-ähnliche Reaktionen auslöst, nicht näher aus. Die Identifikation der Bindungsstelle von MitTx und dessen Bindungstyp an ASIC sind geeignete Ansatzpunkte für weitere Schritte. Eine interessante Frage ist außerdem, ob MitTx tatsächlich als ein positiver Modulator agiert, beispielsweise ob es die Protonenempfindlichkeit des Rezeptors verändert, sodass dieser bei physiologischem pH aktiviert werden kann. Wenn ja, wie verändert die Bindung von MitTx die Eigenschaften des Protonensensors? In diesem Zusammenhang ist die neueste Röntgenstruktur des aus Hühnern gewonnenen ASIC1-Rezeptors eine wertvolle Orientierungshilfe für zukünftige Ex-

perimente (Abbildung 1b).<sup>[6]</sup> Das genaue Verständnis der molekularen Grundlagen der MitTx-Modulation der ASICs wird die strukturelle und mechanistische Basis liefern, um in durchdachter Weise Moleküle zu entwerfen, die ASICs entgegenwirken können. Das therapeutische Potenzial der Verwendung von ASICs als Wirkstoffziele wurde bereits erörtert, und ASICs werden bereits als solche für die Schmerzbehandlung untersucht.<sup>[1]</sup> Speziell zwei Giftproteine, Psalmodotoxin1 (PcTX1) und APETx2, die Antagonisten von ASIC1a bzw. ASIC3 sind, werden momentan in vorklinischen Studien für die Schmerzbehandlung eingesetzt.

Die Identifikation von MitTx liefert ein neues und wertvolles Werkzeug für Studien der Rolle von ASICs bei der Schmerzerzeugung und wird zweifellos wichtige Auswirkungen für zukünftige Forschungen haben, um die molekularen Bahnen des Schmerzes zu enträtseln.

Eingegangen am 13. Januar 2012

Online veröffentlicht am 15. März 2012

- 
- [1] G. F. King, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11*, 1469–1484.
  - [2] a) M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius, *Nature* **1997**, *389*, 816–824; b) D. D. McKemy, W. M. Neuhausser, D. Julius, *Nature* **2002**, *416*, 52–59.
  - [3] a) J. Siemens, S. Zhou, R. Piskrowski, T. Nakai, E. A. Lumpkin, A. I. Basbaum, D. King, D. Julius, *Nature* **2006**, *444*, 208–212; b) C. J. Bohlen, A. Priel, S. Zhou, D. King, J. Siemens, D. Julius, *Cell* **2010**, *141*, 834–845.
  - [4] C. J. Bohlen, A. T. Chesler, R. Sharif-Naeini, K. F. Medzihradsky, S. Zhou, D. King, E. E. Sánchez, A. L. Burlingame, A. I. Basbaum, D. Julius, *Nature* **2011**, *479*, 410–414.
  - [5] R. Doley, R. M. Kini, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2851–2871.
  - [6] a) J. Jasti, H. Furukawa, E. B. Gonzales, E. Gouaux, *Nature* **2007**, *449*, 316–323; b) E. B. Gonzales, T. Kawate, E. Gouaux, *Nature* **2009**, *460*, 599–604.