

# Ein schmerzhafter Säuremelder

Stephan Kellenberger

Département de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne

## Hintergrund

Die Protonenkonzentration, üblicherweise als pH-Wert angegeben, wird im Körper durch physiologische Kontroll- und Transportmechanismen innerhalb enger Grenzen gehalten. Sie ist bei pathologischen Prozessen wie Ischämie und Entzündungen sowie in Tumoren erhöht. In aktiven Synapsen, und möglicherweise in der peripheren Mikrozirkulation, ist der pH-Wert raschen Schwankungen unterworfen.

Ich interessiere mich mit meinem Forschungsteam für eine Familie von neuronalen Ionenkanälen, die durch Protonen aktiviert werden, die «Acid-Sensing Ion Channels» (ASICs). Die ASICs sind beim physiologischen pH von 7,4 geschlossen und öffnen sich kurzzeitig, wenn der extrazelluläre pH-Wert unter 7 fällt. Ein funktioneller Kanal besteht aus drei homologen Kanal-Untereinheiten (Abb. 1 A und B) [1]. Sechs solcher Untereinheiten sind bisher bekannt [2]. Durch die geöffneten ASICs strömen  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle, im Falle des ASIC1a auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieser Ionentransport kann mit der Patch-clamp-Methode als elektrischer Strom gemessen werden (Abb. 2) [3].

Der Körper setzt die ASICs für verschiedene physiologische Aufgaben als Säuremelder ein. ASIC1a ist in den meisten Abschnitten des Gehirns exprimiert, am höchsten jedoch in den Amygdalae, einer Region, die in die Angstempfindung involviert ist. ASIC1a kann in den Amygdalae durch die synaptische Aktivität und durch den pH-Abfall infolge einer erhöhten  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blut aktiviert werden, und er spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Formen von Angstzuständen [2, 3]. Verschiedene ASICs befinden sich als Säurerezeptoren an den peripheren Endigungen von sensorischen Neuronen und tragen zum Entzündungsschmerz bei. Die Aktivität von ASIC1a nach einem Hirnschlag kann den Tod von Neuronen verursachen. In einem Mausmodell für Hirnschlag war das Infarktvolume um mehr als 50% vermindert, falls ASIC1a pharmakologisch oder genetisch blockiert wurde [4]. Diese Beispiele illustrieren, dass Hemmer von ASICs als Anxiolytika, Analgetika und zur Therapie des Hirnschlags eingesetzt werden könnten.

Im Tierreich finden wir weitere Beispiele für den Einsatz von ASIC-Aktivatoren oder -Hemmern: ASIC-Agonisten sind im Gift einer Schlange mit schmerzhaftem Biss gefunden worden; eine Spinne benützt einen ASIC-Modulator und eine Meeresanemone einen ASIC-Blocker für bisher noch unbekannte Zwecke [5].

## Ziel und Strategien

Das Ziel unserer Forschung ist es, die zellulären Funktionen der ASICs zu verstehen und auf molekularer Ebene die Mechanismen zu begreifen, welche die ASICs durch eine pH-Änderung öffnen können. Um dies zu erreichen, wenden wir hauptsächlich Methoden der Elektrophysiologie an. Mit der «Voltage-clamp»-Technik wird die Kanalfunktion als Ionenstrom bei einer vorgegebenen Potentialdifferenz gemessen. Ein mehr physiologischer Wert ist das Membranpotential, das in einem «Current-clamp»-Experiment gemessen wird.

## Wichtigste Ergebnisse

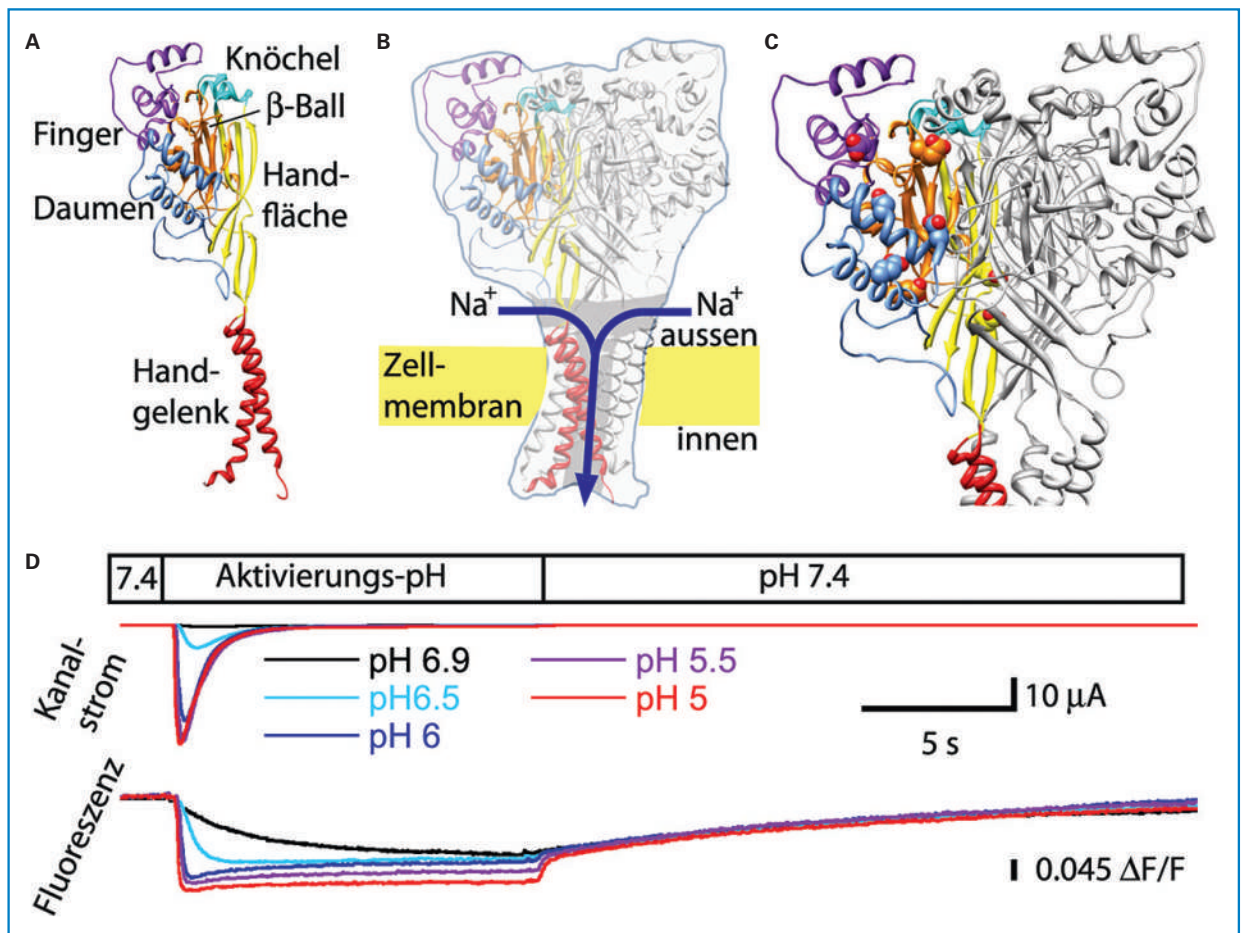
### Die Aktivierung der ASICs führt zu Aktionspotentialen

Wir untersuchten die zelluläre Funktion von ASICs in isolierten Neuronen des Hippocampus (Abb. 2) [6]. Der Wechsel des extrazellulären pH von 7,4 zu 6 aktiviert im Voltage-clamp-Experiment den charakteristischen biphasischen ASIC-Strom, bestehend aus Aktivierung und nachfolgender Inaktivierung. Amilorid, ein Hemmer des ASIC-verwandten epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals, wird klinisch als Diuretikum benutzt. Bei höheren Konzentrationen blockiert Amilorid auch ASICs (Abb. 2B). Neuronen haben neben ASICs viele andere Ionenkanäle. Abbildung 2A illustriert ein Experiment vom gleichen Neuron wie in 2B, in dem die Veränderung des Membranpotentials infolge eines extrazellulären pH-Wechsels gemessen wurde. Hier zeigt sich, dass die Aktivierung der ASICs das Membranpotential anhebt. Sobald die Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle überschritten wird, werden Aktionspotentiale ausgelöst, die als «Spikes» in der Aufnahme sichtbar sind. Ändert sich der pH in der Gegenwart von Amilorid, öffnen sich die ASICs nicht, und die Depolarisation wie auch die Aktionspotentiale unterbleiben [6]. Wir konnten in analogen Experimenten zeigen, dass in sensorischen Neuronen eine pH-Änderung von 7,4 zu Werten unter 7,0 via Aktivierung der ASICs Aktionspotentiale auslösen kann [7, 8].

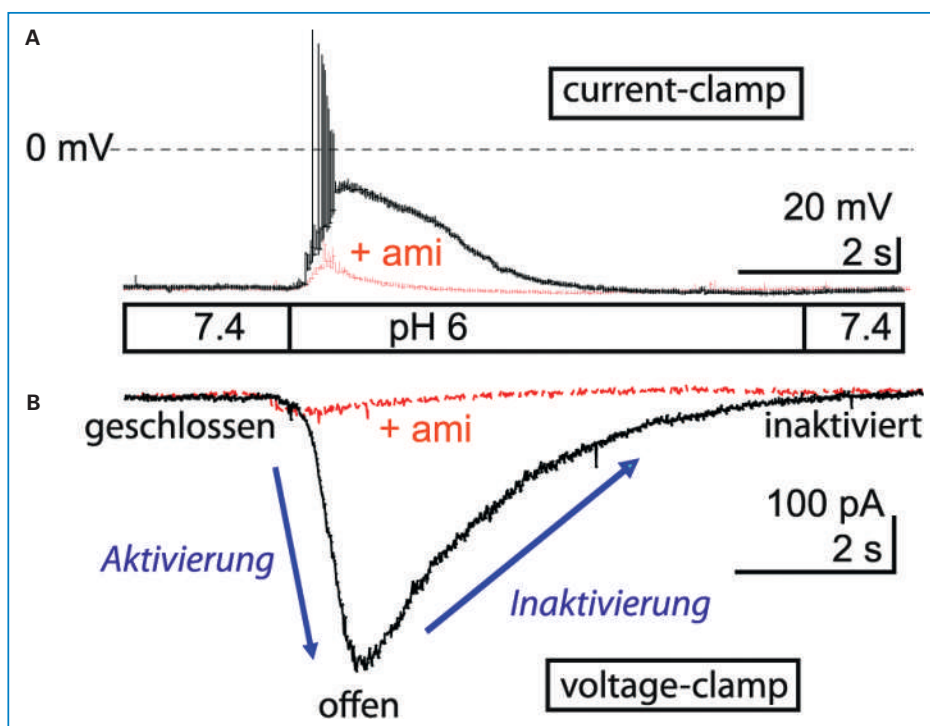
### Wie öffnen Protonen den Ionenkanal?

Wie in Abbildung 2B angegeben, kann sich ASIC in drei verschiedenen Konformationen befinden: geschlossen, offen oder inaktiviert. Ein inaktivierter ASIC leitet keine Ionen und muss für einige Sekunden einem pH über 7,3 ausgesetzt werden, bevor er durch Protonen wieder geöffnet werden kann. Kristallstrukturen von ASIC1 im in-

Die Autoren haben keine finanzielle Unterstützung und keine anderen Interessenkonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.



**Abbildung 1**  
Struktur und Funktion der ASICs. **A:** Strukturmodell einer ASIC-Untereinheit, basierend auf der Kristallstruktur [1]. **B, C:** Modell des Kanals bestehend aus drei Untereinheiten mit der Kanalpore, durch die Na<sup>+</sup>-Ionen fließen (**B**) und den AS, die als Protonensensoren dienen [10] (**C**). **D:** Ein typisches «Voltage-clamp-fluorometry»-Experiment, bei dem gleichzeitig der Kanalstrom (obere Linien) und die Fluoreszenz-Intensität einer in der Porenregion angebrachten fluoreszierenden Substanz (AlexaFluor488, untere Linien) gemessen wird. Das Experiment wurde bei fünf verschiedenen Aktivierungs-pH-Werten durchgeführt.



**Abbildung 2**  
Messung der ASIC-Funktion mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden. Der horizontale Balken gibt den kontrollierten extrazellulären pH-Wert an. Die Messungen wurden in kultivierten Hippocampus-Neuronen der Maus durchgeführt, entweder in «Current-clamp»- (**A**) oder «Voltage-clamp»-Konfiguration bei -60 mV (**B**). Die Messungen wurden in der Gegenwart von 100 μM Amilorid wiederholt (rote Linien). In **B** sind die drei Zustände des Kanals (geschlossen, offen und inaktiviert) in schwarzem Schriftzug, die Übergänge (Aktivierung und Inaktivierung) in blauem Schriftzug angegeben.

aktivierten und möglicherweise im offenen Zustand sind publiziert worden [1, 9].

Die Struktur der Untereinheit kann mit einer Hand verglichen werden (Abb. 1A). Abbildung 1B illustriert den Weg der Na<sup>+</sup>-Ionen durch die Kanalöffnung. Das «Tor» ist im transmembranären Teil des Kanals untergebracht. Es wird angenommen, dass bei einer Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration einige Aminosäuren (AS) im extrazellulären Teil des Kanals protoniert werden (= Protonensensoren), und dass dies zu einer Konformationsänderung im Protein führt. Dies führt auf der Stufe der Kanalpore zuerst zur Kanalöffnung und anschliessend zur Inaktivierung.

Als ersten Schritt zu einem besseren Verständnis dieser Mechanismen identifizierten wir AS, die als Protonensensoren im Kanal dienen könnten. Protonierbare AS sind His (Histidin), Glu (Glutamat) und Asp (Aspartat). Im pH-Bereich nahe der Säurekonstante (pKa) verändert eine kleine Änderung des pHs den Protonierungsgrad und die Ladung der AS und führt damit sicherlich zu einer Konformationsänderung im Protein. AS mit einem pKa-Wert im Bereich, in dem ASICs geöffnet werden (~7,4–5), sind deshalb potentielle Protonensensoren. Innerhalb eines Proteins hängt der pKa jeder einzelnen AS von den Interaktionen mit anderen AS ab. Wir haben auf der Basis der Kristallstruktur die pKa-Werte aller His-, Asp- und Glu-Reste berechnet und identifizierten 16 AS pro Untereinheit mit einem pKa-Wert zwischen 7,4 und 5. Wir haben jede einzelne dieser AS durch eine ähnliche, nicht protonierbare AS ersetzt und die Funktion des mutierten Kanals analysiert. Wir identifizierten 8 AS mit einem pKa zwischen 7,4 und 5, deren konservative Mutation die Kanalfunktion verändert und die deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit die Protonensensoren im ASIC darstellen [10]. Diese AS befinden sich in verschiedenen Domänen des Proteins (Abb. 1C).

Um zu verstehen, wie das Signal von den Protonensensoren zum Kanaltor geleitet wird, verfolgen wir die Konformationsänderungen des Kanals. Seit kurzem benützen wir zu diesem Zweck die Voltage-clamp-fluorometry-Technik. Dazu platzieren wir mit Hilfe einer Methode, die auf spezifischer chemischer Modifizierung von Zysteinresten beruht, ein fluoreszierendes Molekül an eine bestimmte Stelle des Kanals. Die Intensität der Fluoreszenz des Moleküls hängt von seiner Umgebung ab. Wir aktivieren die ASICs und messen gleichzeitig mit der Fluoreszenz auch die Kanalfunktion als elektrischen Strom. Abbildung 1D illustriert ein solches Experiment. Eine Änderung der Fluoreszenz bedeutet, dass in unmittelbarer Nähe der eingefügten Fluoreszenzgruppe eine Bewegung stattfindet. Ein Vergleich des Zeitverlaufs der

beiden Signale zeigt, mit welcher Funktion (Kanalöffnung, Inaktivierung) die Konformationsänderung gekoppelt ist. Im Beispiel in Abbildung 1D, einer Position in der Nähe der Pore, erfolgt die Bewegung kurz nach der Kanalöffnung, jedoch vor der Inaktivierung. Sie bereitet demnach die Inaktivierung vor. Die Rückwärtsbewegung erfolgt erst mit dem Lösungswechsel zurück zu pH 7,4. Eine Analyse der verschiedenen Domänen des Kanals mit Hilfe dieser Technik wird es uns erlauben, die Reihenfolge der Bewegungen dieser Domänen während der Kanalöffnung und der Inaktivierung zu bestimmen.

## Schlussfolgerungen und Ausblick

ASICs spielen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Unsere Arbeiten in Neuronen zeigen, dass ASICs Aktionspotentiale erzeugen und damit die Neuronen aktivieren können. Wir haben Protonensensoren im ASIC-Protein identifiziert und verfügen über erste Informationen zu Konformationsänderungen. Das Ziel dieser Arbeiten ist es, den Mechanismus der Kanalöffnung der ASICs zu verstehen, um die Grundlage für eine rationale Entwicklung von Medikamenten zu schaffen, die an ASICs wirken.

### Dank

Ich danke meinen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern, Marija Vukicevic, Olivier Poirot, Benoîte Bargeton, Maxime Blanchard, Sophie Roy, Angelica Liechti und Gaetano Bonifacio, die in wichtiger Weise zu den zitierten Arbeiten beigetragen haben. Ich danke Simon Bernèche (Universität Basel) für die Zusammenarbeit bezüglich der bioinformatischen Aspekte und Edith Hummler sowie Olivier Staub für das Korrekturlesen dieses Textes. Ich danke dem Schweizerischen Nationalfonds für die wertvolle finanzielle Unterstützung meiner Forschung (310030\_135542/1).

Swiss National Science Foundation Grant 310030\_135542/1

### Korrespondenz:

Stephan Kellenberger  
Département de Pharmacologie et de Toxicologie  
Université de Lausanne  
Rue du Bugnon 27  
CH-1005 Lausanne  
[Stephan.Kellenberger\[at\]Junil.ch](mailto:Stephan.Kellenberger[at]Junil.ch)

### Empfohlene Literatur

- Wemmie JA, Price MP, and Welsh MJ. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci.* 2006;29:578–86.
- Liechti LA, Berneche S, Bargeton B, Iwaszkiewicz J, Roy S, Michielin O, et al. A combined computational and functional approach identifies new residues involved in pH-dependent gating of ASIC1a. *J Biol Chem.* 2010;285:16315–29.

Die vollständige nummerierte Literaturliste finden Sie unter [www.medicalforum.ch](http://www.medicalforum.ch).