



2014年度浙江大学学术进展

BK离子通道的泛素化在调控癫痫发生中的机制研究

★★★★★

该项研究从分子机制上揭示了CRL4ACRBN泛素连接酶介导的Bk离子通道的泛素化调控在癫痫疾病发生中的作用，为这一类癫痫疾病的治疗提供了全新的认识。

项目负责人：仓勇

细胞通过精确地调控细胞膜上离子通道的表达和活性来维持细胞内外离子和液体的平衡。但是遗传上的突变，特别是那些编码组成电压门控和配体门控离子通道亚基的基因突变会改变这些通道的功能，从而会诱发在人体中最常见的一种慢性神经功能失调疾病——癫痫。相对于目前大量的关于离子通道蛋白结构和功能的研究，我们对于离子通道活性的翻译后修饰调控却知之甚少。

BK离子通道是由4个 α 亚基组成的四聚体，同时在不同的组织中又有四种 β 亚基调控整个通道。这个离子通道的特别之处在于，它既能被细胞膜的去极化激活，也能被细胞中增加的钙离子浓度激活。因此，它能作为神经元中的钙离子传感器，同时调节神经递质的释放以及神经元的兴奋性。有研究表明在人体内BK离子通道 α 亚基的一个获得功能性突变或者 β 4亚基的敲除都能增强通道的激活，并诱发癫痫。BK离子通道的功能还能被

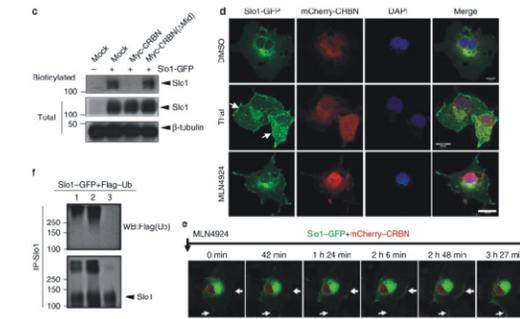


Figure 2 | CRL4ACRBN retains ubiquitinated BK channels in the ER and inhibits their surface expression in cultured cells. (a) Confocal fluorescent imaging of COS-7 cells transfected with Slo1-GFP and mCherry-CRBN or mCherry-CRBN(Mid). EB-Tracker was used to stain the ER. Scale bar, 10 μ m. (b) Confocal imaging of cells transfected with N-terminally tagged Flag-Slo1 and YFP-CRBN or YFP-CRBN(Mid). The extracellular flag epitope was visualized by indirect immunofluorescence under nonpermeabilized conditions. Scale bar, 10 μ m. (c) Western blot analysis of extracellularly biotinylated BK channels in HEK 293 cells transfected with expression vectors of CRBN or CRBN(Mid). Cells were incubated with 1 mg ml⁻¹ Sulfo-NHS-S5-biotin solution. Surface biotinylated proteins were precipitated with streptavidin agarose resin. (d) Confocal imaging of COS-7 cells transfected with Slo1-GFP and mCherry-CRBN and treated with 50 μ M thalidomide or 0.1 μ M MLN4924 for 6 h. Scale bar, 20 μ m. (e) Live imaging of COS-7 cells.

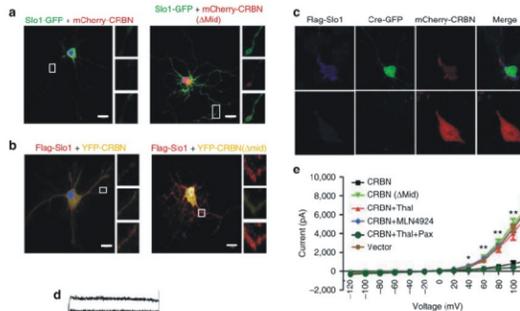
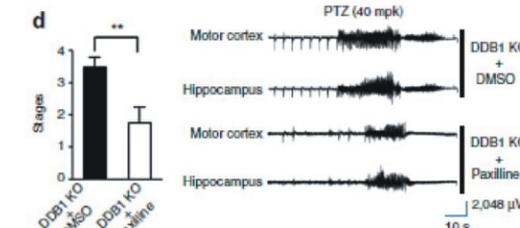
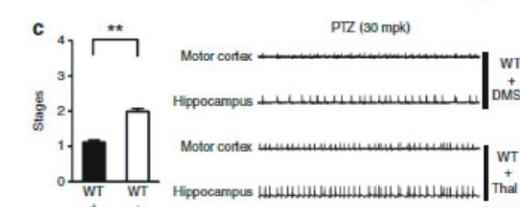
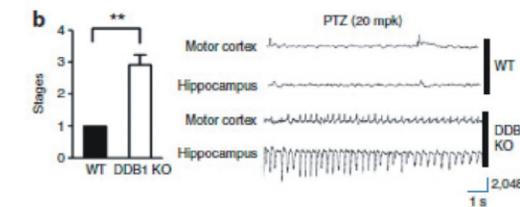


Figure 3 | Electrophysiological characterization of BK channels. (a) Confocal imaging of cells transfected with Slo1-GFP + mCherry-CRBN or Slo1-GFP + mCherry-CRBN(Mid). Scale bar, 10 μ m. (b) Confocal imaging of cells transfected with Flag-Slo1 + YFP-CRBN or Flag-Slo1 + YFP-CRBN(Mid). Scale bar, 10 μ m. (c) Current-voltage relationships of BK channels in HEK 293 cells transfected with expression vectors of CRBN, CRBN(Mid), CRBN+Thal, CRBN+MLN4924, CRBN+Thal+Pax, and Vector. Currents were elicited by voltage steps from -100 to 100 mV. (d) Representative current traces for Slo1-GFP+mCherry and Slo1-GFP+mCherry-CRBN. Scale bar, 1 nA, 50 ms.



一些翻译后修饰所调节，包括蛋白质的磷酸化和棕榈酰化。然而在体内这些调控的意义目前都还没有被阐明。

在这个研究中我们报道了大电导、钙离子和电压门控的钾离子通道（BK）能被CRL4ACRBN E3 泛素连接酶靶向并被多聚泛素化，从而滞留在内质网中，不向细胞膜上运输。当我们在实验中使CRL4ACRBN泛素连接酶失活，就能看到去泛素化的BK离子通道从内质网中释放出来，并且运输到细胞膜上，从而导致了显著的BK离子通道活性的增加。同时我们构建了转基因小鼠，在小鼠的海马和大脑皮层中特异性地敲除了DDB1基因，使CRL4ACRBN泛素连接酶失活，这些突变小鼠在年老的时候会自发地产生癫痫，而且对于药物诱发的癫痫特别敏感。当我们用CRL4ACRBN泛素连接酶的抑制剂去处理正常的小鼠时，我们也能发现这些小鼠对诱发癫痫的药物非常敏感。同时这种对诱发癫痫药物的敏感性能被BK离子通道的特异性抑制剂所减轻。因此，我们认为当BK离子通道在细胞中合成后运输到细胞膜表面的泛素化调控是细胞调节神经系统兴奋性和癫痫发生的重要步骤。

该研究成果从分子机制上揭示了BK离子通道的泛素化调控在癫痫疾病发生中的作用，为这一类癫痫疾病的治疗提供了全新的认识。该研究成果已经发表在2014年5月21日的《自然通讯》杂志上。