

大电导钾离子通道(BK)结构与功能的研究进展*

王彦婷 郭西英 黄智刚 汪 盛**

(华中科技大学生命科学与技术学院分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要 大电导钙离子激活钾通道(BK)是细胞膜上唯一接受细胞内 Ca^{2+} 和膜电位双重调控的离子通道。最新发表的关于 BK 通道电镜结构及其胞质功能域的晶体结构的文章, 第一次展示了 BK 通道各亚基的组装, 并证实通道各功能域在通道门控机制中存在紧密的相互作用。近年来, 针对 BK 通道的功能调节及其门控动力学模拟的研究取得较多进展, 有助于更好地理解 BK 通道发挥生理功能的门控机制, 并揭示 BK 通道相关疾病的病理生理学基础。

关键词 BK 通道, 大电导, 电压敏感功能域, 门控环, 动力学模拟, 辅助亚基, 剪接突变体

学科分类号 Q6, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0347

离子通道广泛存在于动植物、单细胞或多细胞生物中, 它们与各种生命活动密切相关。离子通道的基本生理功能是在兴奋性的神经、肌肉组织上产生细胞生物电活动, 并通过生物电信号的传播衍生出一系列包括腺体分泌、心脏搏动, 甚至学习和记忆等重要的高级神经活动。

1 离子通道的研究历史

1952 年, Hodgkin 和 Huxley 利用电压钳技术, 在枪乌贼的巨神经轴突上对细胞膜的电流、电导进行了深入的定量研究并首次提出离子通道的概念^[1]。1976 年, Neher 和 Sakman 发明膜片钳技术, 这是一种以记录离子电流反映单一的或多个离子通道分子活动的技术, 为研究通道结构和功能提供了有力工具, 他们因此分享了 1991 年诺贝尔生理学或医学奖。1998 年, Roderick MacKinnon 利用 X 射线晶体成像技术, 第一次在原子水平展示了钾离子通道 KcsA 的结构, 并揭示由不同细胞信号控制开关的离子通道的工作原理。Roderick MacKinnon 以其开创性的研究工作荣膺 2003 年诺贝尔化学奖。

2 电压门控钾离子通道

钾离子通道是分布最广、亚型最多的一类离子通道。依据它们的电生理学特性分为内向整流钾离子通道和电压门控钾离子通道 (voltage-gated

potassium channels, Kv)。Kv 通道由孔道形成亚基 α 与若干辅助亚基构成, 其门控机制具有明显的电压依赖性。 α 亚基通常包含 6 个跨膜螺旋片段 (S1~S6), 其中 S4 上分布了一系列正电荷氨基酸残基。传统的 Kv 通道激活模型认为, 膜去极化使 S4 的带电残基位置偏移, 导致通道开放。Jiang 等^[2]通过对 KvAP 通道的研究, 提出新的划桨模型: 膜去极化时, 通道 S4 与 S3b 形成共轭 α 螺旋体 (S4-S3b), 它们在细胞膜两侧摆动使通道开放。Kv 通道分为三种类型: 延迟整流钾通道、A 型瞬时钾通道和钙离子激活钾通道(K_{Ca})。 K_{Ca} 通道常与 L 型、P/Q 型、N 型等多种钙离子通道耦合。

2.1 大电导钙离子激活钾通道

K_{Ca} 通道中较为特殊的一类是大电导钙离子激活钾通道(BK), 其单通道电导可达 100~300 ps, 明显区别于其他家族成员, 如小电导钾通道(4~20 ps)、中电导钾通道(20~80 ps)。BK 通道的独特性不仅在于其较大的单通道电导, 还表现在它受到细胞内 Ca^{2+} 和膜去极化信号的双重调控。对两种信号的整

* 国家重点基础研究发展计划(2010CB529804)和中央高校基本科研业务费专项资金(2014TS087)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 027-87793053, E-mail: shengwang@hust.edu.cn

收稿日期: 2014-11-19, 接受日期: 2015-02-16

合,使BK通道成为偶联胞内 Ca^{2+} 浓度增加与外向超极化钾电流的重要负反馈体系。此外,诸如细胞膜应力、细胞因子、激素、ATP、NO等信号也能激活BK通道。

2.2 BK通道基本生理特性

BK通道具有较高的 K^{+} 传导速率,与此同时,它们还能保证精细的选择过滤机制:通透Pauling半径 $1.33\text{\AA}$ 的 K^{+} ,却排阻更小的 $\text{Na}^{+}(0.95\text{\AA})$ 。这种离子选择性源于通道的选择过滤器。BK通道的选择过滤器与KcsA通道的类似^[1],它包含4个空间结构等同的 K^{+} 结合位点,且 K^{+} 周围的氧原子与通道空腔中 K^{+} 周围的水分子排布相似,因此 K^{+} 结合位点可抵消 K^{+} 脱水时的能量。但 Na^{+} 的尺寸对于结合位点的空间区域明显偏小,它们脱水的能量得不到补偿,所以通道选择 K^{+} ,排阻 Na^{+} 。过去的研究^[1]认为, K^{+} 对于选择过滤器构象的稳定是必需的,但Jiang等^[2]最新研究发现,完全没有 K^{+} 时,嗜热自养甲烷菌的MthK通道仍能通透 Na^{+} ,而微量 K^{+} 浓度即阻断钠电流。他们的研究解释了离子通道领域多年悬而未决的问题——反常摩尔混合效应。

2.3 BK通道生理学功能

BK通道广泛分布于各种组织细胞的内质网、高尔基体、细胞质膜,甚至线粒体内膜等^[4]。它们具有多种重要的生理学功能,包括调节神经递质释放、细胞兴奋性、平滑肌收缩、激素分泌、生理节律等^[5]。

酗酒和心血管疾病是当今影响公众健康的重大问题。目前酒精作用的分子机制尚不明确,但多种动物模型研究表明BK通道在酒精耐受性调节中扮演重要角色^[6]。在线虫中,酒精以BK通道为靶点影响其运动及产卵行为。基因敲除的小鼠模型证实BK通道辅助亚基调节通道的酒精敏感性。同样,人体BK通道也与酒精依赖性相关。众所周知,现今心血管疾病死亡率远远高于癌症和艾滋病,成为危害人类健康的第一杀手。高血压是最常见的心血管疾病,可诱发冠心病、心绞痛、脑卒中、脑梗死等。近来研究证实血管平滑肌细胞的收缩性与高血压发病机理密切相关^[7]。BK通道正是那种能够调节血管舒张和改善血流的通道。在平滑肌细胞中,细胞内钙库释放,激活的BK通道使钙离子通道失活,促进血管松弛。因此BK通道与多种心血管疾病包括扩张型心肌病、原发性高血压等紧密相关。

过去研究认为,BK通道极少在心脏中表达。1999年,Kawakubo等^[8]首次在胚胎鸡心肌细胞中

发现了机械敏感的BK通道,称为SAKCA。SAKCA通道的活性受到膜张力与细胞内钙浓度的独立调控^[9]。SAKCA包含一段剪接突变体序列STREX,该序列与通道的应力激活特性相关^[10],目前已发现STREX依赖型和非依赖型两种力敏感的BK通道^[10-11]。近年,Ko等^[12]克隆出小鼠心肌BK通道的基因。Poulsen等^[13]在大鼠心房和心室细胞中发现了少量的包含STREX序列的BK通道。此外,Bentzen等^[14]在大鼠心脏线粒体内膜中也发现了BK通道的存在,这些通道具有对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。研究表明,BK通道还参与防止心肌梗死^[15],抑制BK通道活性可致心动过缓。Wang等^[16]在心肌成纤维细胞中鉴定出BK通道,认为该通道与心脏的功能活性密切相关。

另外,人类胶质瘤细胞膜高丰度表达BK通道(gBK)。gBK与人体BK通道剪接突变体hbr5同源性较高。对gBK通道参与的神经胶质瘤细胞增殖与迁移的病理机制研究发现,gBK对胶质瘤细胞增殖、迁移影响巨大,它因此成为肿瘤遏制药物的热门靶点^[4]。最近,蛋白质组学研究将BK通道及其互作蛋白联系起来,用以探究其在癌症,特别是脑部肿瘤发生中的重要地位^[4]。鉴于BK通道精细的生理功能调节机制和广泛的生理学意义,因此对其结构功能的研究与探讨离子通道相关疾病的发病机制和药物治疗有着重大的联系。

3 BK通道的组成及三维结构

3.1 BK通道 α 亚基组成结构

BK通道也称MaxiK通道,它是由4个 α 亚基结合多个辅助亚基形成的蛋白质复合物。1991年,Atkinson等^[17]首次从果蝇中克隆到BK通道 α 亚基(BK α)的编码基因。敲除该基因的果蝇具有懒惰且嗜睡的表型,因此该基因被命名为*Slowpoke*或*Slo1*。随后研究人员陆续从小鼠骨骼肌、人主动脉平滑肌细胞中克隆了同源基因*mSlo*与*hSlo*。*hSlo*位于人类基因组10q22.3染色体,它跨越长度约750 kb,包括27个组成型外显子和多个可变外显子^[18]。MaxiK基因具有严格的选择性,在哺乳动物中其组成型外显子表达的氨基酸序列有98%的相似性^[18]。

与其他Kv通道的 α 亚基不同,BK α 包含额外的S0跨膜片段,使蛋白质N端朝向细胞膜外。BK α 具有3个功能域:电压敏感功能域(VSD)、 Ca^{2+} 敏感胞质功能域和孔道门控功能域(PGD)。

VSD、PGD 分别由 S1~S4、S5~S6 构成, 它们合称为跨膜功能域^[19]. α 亚基的 S4 上排布一系列正电荷氨基酸残基, 它作为通道初级电压感受器, 在响应膜的去极化信号时朝细胞外侧移动^[19]. S5、S6 及其间的 P 环为 BK 通道 PGD 区, 4 个此重复成分形成离子孔道, 内陷 P 环组成 K^+ 选择过滤器, 并具有典型的保守序列 TVGYGD.

BK α 胞质功能域占亚基全长的 2/3, 它包含 4 个疏水片段(S7~S10). S6~S7 之间的亲水区域介导 α 亚基四聚化, 它与 Kv 通道 T1 结构域类似,

称为 BK-T1 结构域^[20]. S7~S10 包含一对调节 K^+ 电导 (regulator of potassium conductance, RCK) 的 RCK1、RCK2 功能域. 在 RCK2 功能域中有一段保守性极高的负电荷残基(Asp), 它们结合 Ca^{2+} , 俗称“钙碗(Ca^{2+} bowl)”^[20] (图 1). RCK 功能域作为 Ca^{2+} 感受器调节通道门控性质, 但 Ca^{2+} 的结合与 BK 通道激活的偶联机制目前尚不清楚. 另外, BK α 的胞质功能域还具有其他调节位点, 如 Mg^{2+} 结合位点、亮氨酸拉链区、磷酸化、棕榈酰化位点等^[20].

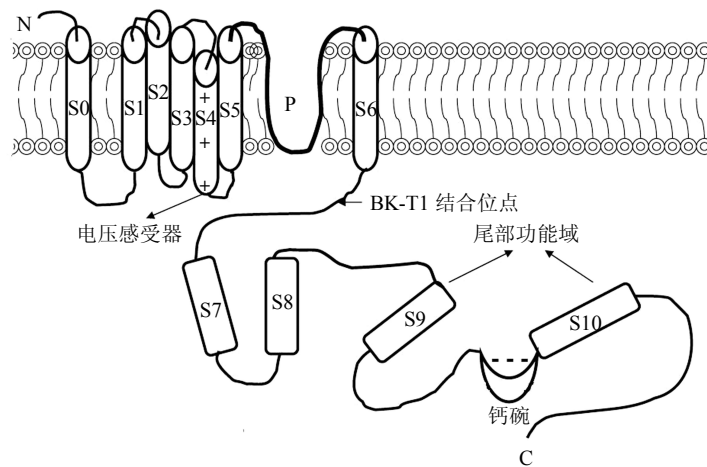


Fig. 1 Cartoon model of BK channel α subunit^[20]

图 1 BK 通道 α 亚基的结构示意图^[20]

3.2 BK 通道空间结构模型

目前尚没有 BK 通道三维结构的报道. 为探究通道生理及其门控调节机制, 研究人员基于序列同源性和结构模拟, 以哺乳动物 Kv1.2 通道结构作为跨膜区模板, 以 MthK 通道结构模拟胞质功能域, 构建了 BK 通道同源结构模型. Kv1.2 通道 4 个 α 亚基的 S5~S6 形成离子孔道, VSD 分布于孔道四角. VSD 与 PGD 依靠 S4、S5 之间的柔性区 (linker) 连接, S4~S5 linker 与 S6 胞质侧、S4 与相邻亚基 S5 之间分别存在相互作用, 它们介导电压感受器移动与通道激活门开放的偶联^[21], BK 通道的情况类似. MthK 通道中 8 个等同的 RCK 功能域构成门控环. 门控环结合 Ca^{2+} 后直径扩张, 并拉动连接于孔区的多肽链使通道开放^[22]. BK 通道 RCK1 的结构与 MthK 的相似, 但 RCK2 结构保守性稍差^[23].

最近, Wang 等^[24]获得了分辨率为 1.7~2.0 nm 的 BK 通道电镜结构. 该结构胞外侧氨基酸残基和跨膜区的空间维度均与 Kv1.2 通道类似, 符合 BK 通道同源结构模型. 同样, MthK 通道的门控环也

与 BK 电镜结构吻合. 近期, Wu 等^[23]解析了 BK α 胞质功能域(包括 RCK1 和 RCK2)的晶体结构, 此外, 同源的 Slo2 通道胞质结构已获解析, 这些信息提示 4 个 Slo1 亚基的 RCK 功能域可能形成了门控环结构.

另外, BK 通道结构反映出其几个重要特征.

- 与 Kv1.2 通道相比, BK 电镜结构的跨膜功能域包含额外组分如 S0 片段、S0~S1 linker 区等. S0 片段分布于 VSD 边缘, 毗邻 S2 片段^[24], 这之前利用二硫键十字交联法确定 S0 位置的结果一致^[25].
- BK 通道胞质功能域比 MthK 通道的更大.
- 从 BK 通道的结构信息反映其胞质功能域和跨膜功能域相距较近, 与功能研究发现两者在通道激活时存在紧密交互作用的现象相符^[26].

4 BK 通道的门控调节机制

BK 通道是细胞膜上唯一接受两种基本信号细胞内 Ca^{2+} 和膜电位双重调控的离子通道. 研究发现, BK 单通道存在多个动力学可辨且 Ca^{2+} 依赖的门控状态, 但 Ca^{2+} 不存在时, 膜的去极化仍能激

活 BK 通道, 这在一定程度上表明生理条件下 BK 通道的激活存在变构调节效应. 以往的研究已确定 BK 通道电压和金属离子感受器在空间上独立存在, 那么它们如何跨越空间限制使通道开放呢.

4.1 BK 通道各功能域在门控调节中的作用网络

BK α 的胞质功能域通过一段由 17 个氨基酸残基组成的多肽链连接到孔区 S6 片段, 此肽链称为 C-linker, 它可能参与通道各功能域间的偶联过程. 没有 Ca $^{2+}$ 时, 缩短 C-linker 长度使通道开放几率和电压依赖曲线(P_o -V)朝负向移动, 加长 C-linker 使 P_o -V 曲线朝正向移动, 但曲线斜率均没有明显变化^[9]. 另外, C-linker 的长度也影响 BK 通道活性. 在同一电压下, 随着 C-linker 延长, 通道活性逐渐降低, 该结果符合 C-linker 拉动模型^[22], 加长 C-linker 减弱拉力并降低通道对 Ca $^{2+}$ 感受器的敏感性. 类似地, C-linker 的长度也与 SAKCA 通道的应力门控机制有关. 无论有无 Ca $^{2+}$ 时, 缩短或延长 C-linker 的长度将相应地增加或降低 BK 通道的力敏感性^[27].

除了与孔道门控功能域的作用外, 胞质功能域也紧密地与 VSD 互作介导 Mg $^{2+}$ 依赖的 BK 通道激活. Mg $^{2+}$ 结合位点位于 BK 通道 VSD 与胞质功能域的交界面, 由 S0-S1 linker 的 Asp99, S2 胞质侧的 Asn172 以及相邻亚基上 RCK1 功能域的 Glu374、Glu399 组成^[9]. 为了保证与 Mg $^{2+}$ 结合, α 亚基的 VSD 应与邻近亚基的胞质功能域相距较近. 例如, 将 VSD 的 Asp99 及胞质功能域的 Gln397 突变为半胱氨酸, 两者自发形成二硫键, 说明它们的距离介于 2.9~4.6Å^[9]. 研究证实 BK 通道 S4 胞质侧的 Arg213 不仅对膜电压变化敏感, 而且它也作为 Mg $^{2+}$ 感受器, 通过与 Mg $^{2+}$ 的静电排斥作用介导通道激活^[26]. Yang 等^[26]将邻近 Mg $^{2+}$ 结合位点的 Gln397 突变为正电荷氨基酸(Q397K 或

Q397R), 突变体可模拟 Mg $^{2+}$ 的效应, 与 Arg213 产生静电排斥作用, 从而影响 VSD 的移动, 促进 BK 通道激活. 另外, 理论计算获得 Arg213 与 Gln397 的距离大约 9.1Å^[26], 由此也推测 VSD 与胞质功能域存在紧密地相互作用.

BK 通道在开放或关闭时都能检测到 VSD 的移动, 而且通道处于开放态时, Mg $^{2+}$ 对 VSD 的运动影响更为显著^[26]. 这表明通道激活门可能与 VSD 或胞质功能域存在相互作用, 引起它们之间的位置重排, 从而有利于 Mg $^{2+}$ 接近 S4 片段, 使两者产生更强的静电排斥作用. 反之, VSD 与胞质功能域的位置重排可能引起通道激活门开放, 但目前尚无依据证实这一机制. 并且是否 Mg $^{2+}$ 结合到这两个功能域的交界面会促进它们位置重排, 引起 Mg $^{2+}$ 依赖的通道激活, 现在也不得而知. BK 通道的离子通道门位于选择过滤器附近, 因此过滤器周围的氨基酸残基也可能影响通道门控状态. 例如 BK 通道孔区内的 Leu312 和相邻亚基上 Phe315 的疏水耦合作用维持通道关闭态的稳定^[28]. Aldrich 等^[29]最新报道将 S6 的 Leu312、Ala313 及 Ala316 分别突变成天冬氨酸, 可致 BK 通道组成型开放. 通道激活时, 孔区结构发生重排, 孔区内氨基酸残基侧链朝向孔道的极性环境. 更为有趣的是, 诸如运动训练也能调节 BK 通道的门控性质, 这种方式可以增加通道的开放几率, 延长 BK 通道的平均开放时间等^[9].

4.2 BK 通道钙离子感受器及其门控环调节机制

最近, BK 通道的 RCK 功能域(包括 RCK1 与 RCK2)三维结构已获解析. 每个 RCK 功能域划分成 3 个子功能域: N 端的罗斯曼折叠(从 β A 到 β F)形成门控环的中心孔区; 中间的交叉螺旋(α F-turn- α G)和 C 端子功能域介导同一亚基中 2 个 RCK 功能域的相互作用, 使它们形成双叶状结构(图 2)^[23].

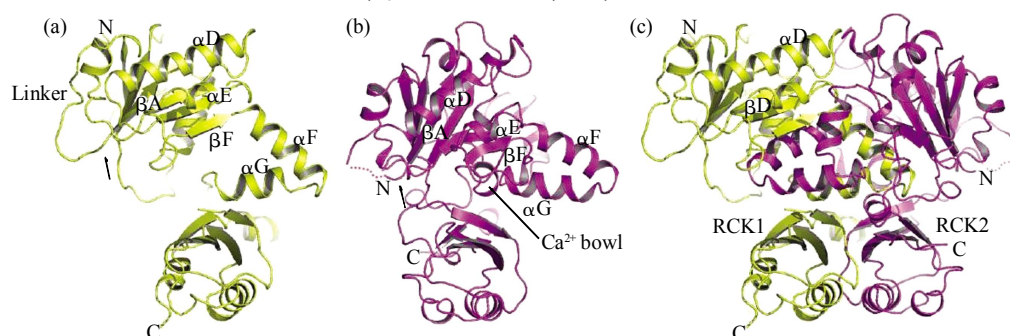


Fig. 2 The RCK domains of BK channel

图 2 BK 通道胞内 RCK 功能域

黄色代表 RCK1 功能域, 紫色代表 RCK2 功能域. (a, b)RCK1 与 RCK2 功能域的结构. 部分二级结构元件在结构中被标注出来, 箭头指示了每个 RCK 功能域的起点, linker 连接 BK 通道孔区与 RCK1 功能域. (c) RCK1 与 RCK2 功能域形成的双叶状结构^[23].

4 对 RCK1 和 RCK2 功能域组装成具有四重对称性的门控环结构, 其中心空腔宽度约 20Å, 便于 K^+ 自由移动(图 3a). 每个 RCK 功能域的 α D、 α E 螺旋以首尾相接模式构成亚基间的疏水作用(图 3b). 钙碗位于 RCK2 功能域的 α E 螺旋之后, 靠近胞内亚基的组装界面. 它和邻近的 α E、 α EF 形成典型的螺旋-环-螺旋模序, 这与 EF 手臂样

的钙结合蛋白的结构相似. 当 Ca^{2+} 不存在时, 钙碗表现出无序状态, 而结合 Ca^{2+} 后其结构变得有序. 基于钙碗的空间位置, Wu 等^[23]推测它与 Ca^{2+} 结合将引起组装界面的构象变化, 改变门控环的大小从而拉动 C-linker, 拓宽离子传导通路而使通道激活.

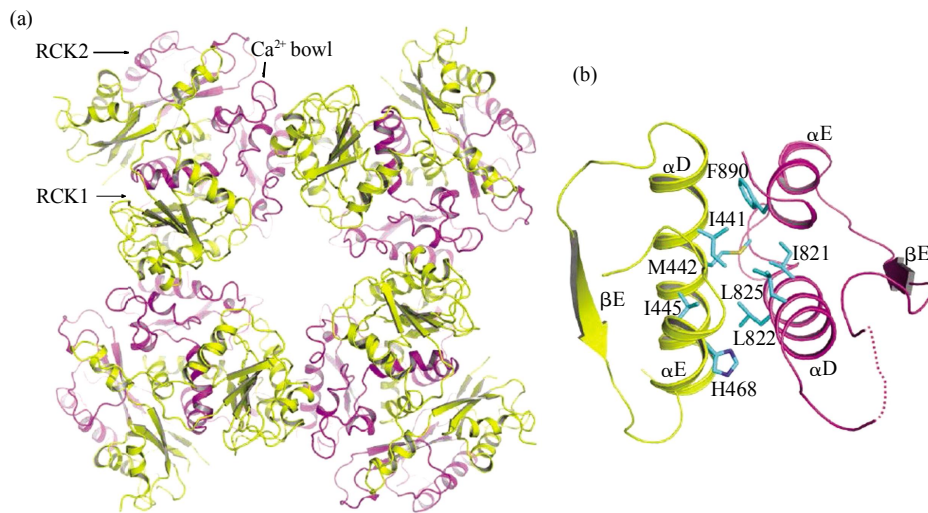


Fig. 3 Four BK intracellular subunits assemble into a gating ring

图 3 BK 通道 4 个亚基胞内区组装成门控环

(a) 从细胞外侧的四重对称轴观察 BK 通道门控环的立体结构. 黄色和紫色分别代表 RCK1 和 RCK2 功能域. 钙碗的位置用箭头指示. (b) RCK1 (黄色)与 RCK2(紫色)功能域的 α D、 α E 螺旋形成的亚基组装界面. 图示参与亚基相互作用的疏水残基侧链^[23].

将组成钙碗的氨基酸突变成中性氨基酸后, BK 通道仍保留部分 Ca^{2+} 敏感性, 这暗示了其他 Ca^{2+} 感受器的存在. 现已鉴定在 RCK1 功能域上还存在 2 个 Ca^{2+} 结合位点. 一个是 Asp367 位点, 具有较高的 Ca^{2+} 敏感性, 它位于 RCK1 N 端、C 端子功能域之间的凹槽区, 由 His365、Met513 以及 Glu535 的侧链构成^[23]. His365 在 pH 激活的 BK 通道中模拟 Ca^{2+} 效应, 与质子化的 Asp367 产生静电作用. Met513 虽然不能直接结合 Ca^{2+} , 但它可能维持了结合位点局部结构的完整性. 另一个 Ca^{2+} 结合位点(Glu374/Glu399)对 Ca^{2+} 的亲水性较弱, 它在生理学上也受 Mg^{2+} 调控. 该结合位点由 RCK1 功能域 β B 的 Glu374 以及相邻 β C 的 Glu399 组成, 另外, C-linker 的 Ser337 侧链也为此处 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的配位体^[23].

RCK1、RCK2 的 Ca^{2+} 感受器有不同的 Ca^{2+} 亲和性. Sweet 等^[31]测出 BK 通道在开放或关闭态时, RCK1 的 Ca^{2+} 解离常数 K_O 、 K_C 分别为 5.6 μ mol/L

和 26.8 μ mol/L, 钙碗的 K_O 、 K_C 分别为 0.88 μ mol/L 和 3.13 μ mol/L. 在通道变构模型中, 每个 Ca^{2+} 的结合对通道开放的影响以协同因子 $C(C = K_C / K_O)$ 表征^[31], 因此 RCK1 的 Ca^{2+} 感受器对通道激活效应($C = 4.75$)强于钙碗($C = 3.55$). 对应于 Ca^{2+} 亲和性差异, 钙碗主要在较低的 Ca^{2+} 浓度下促进通道激活, 而 Asp367 结合位点则需在 10~300 μ mol/L Ca^{2+} 浓度范围影响通道激活与去激活^[31]. 与钙碗不同, RCK1 的 Ca^{2+} 感受器对通道激活具有电压依赖性^[31]. 再考虑到两类 Ca^{2+} 结合位点空间位置的差异, 推测它们可能依靠不同机制与通道激活门偶联.

最近, Budelli 等^[32]利用分子生物学技术移除 BK 通道胞内门控环, 用以探明通道跨膜区功能及其与门控环的变构相互作用. 跨膜区的尾部保留一段促进通道装配及转运的序列, 使 BK 通道在细胞质膜上表达, 记录的电流证实门控环结构对通道的门控调节非必须. 移除门控环的 BK 通道仍具有电

压激活特性,但失去 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 敏感性. BK 通道的 G-V 曲线右移,平均开放概率降低 83%. 他们的研究表明电压和 Ca^{2+} 依赖的通道激活过程相对独立,但跨膜区与门控环亦存在变构相互作用. Ca^{2+} 的结合可致电压感受器移动,反之,电压感受器的运动改变通道的 Ca^{2+} 亲和性.

4.3 BK 通道门控动力学模拟

计算机动力学模拟能够进行某些实验无法完成的生物物理学研究,它可用作阐明和预测在神经元兴奋中各通道之间复杂相互作用的方法. 最早由 Hodgkin 和 Huxley 基于动作电位,用简单的数学公式(即 H-H 模型)描述了 Kv 通道的门控动力学性质. 然而,经典的 H-H 模型只概括了通道的关闭和开放态. 实际上,离子通道有更复杂的门控状态,加之单个神经元中的多个通道存在相互作用,使得对各通道门控机制及其功能分析变得繁杂. Markov 模型将通道门控过程视作为若干可以相互转移的开放和关闭态组成,能较准确地预测、模拟或分析离子通道的动力学性质. 目前, H-H 和 Markov 模型成为模拟 BK 及其他离子通道门控动力学的主流.

传统的膜片钳记录系统存在两个问题:第一,低通滤波器导致数据相位延迟;第二,记录体系的串联电阻拉低了刺激电压值^[31]. 显然, H-H 或 Markov 模型忽略了上述问题,研究人员利用该模型进行数据拟合时,可能导致模型的仿真结果完全偏离离子通道本身的门控性质. 更严重的是,如果在细胞模型中并入多个离子通道,误差的累积致使细胞模型与真实神经元之间的生理学性质相距甚远.

为解决上述问题,华中科技大学丁久平教授自主研发了一种集离子通道动力学建模、仿真及数据分析于一体的综合性单细胞动力学仿真软件(CeL, 登记号 2010SR007023). 该软件使用的无偏差建模方法,可使研究人员通过实验数据得到准确的通道动力学模型. CeL 基于离子通道变构模型,它可以模拟任何电压钳和电流钳的实验过程,并进行非 H-H 模型的细胞动作电位仿真. Wang 等^[32]依据离子通道的 10 态 Markov 模型,比较无偏差建模与常规建模方法对 BK 通道宏观电流拟合情况,认为 CeL 的确提高了 BK 通道门控动力学模拟的准确性. 该方法为参与神经元兴奋的 BK 通道建立可靠的动力学模型, CeL 能利用遗传算法自动确定动力学模型参数,还可进行 BK 通道与其激动剂或抑制剂之间相互作用的动力学模拟.

5 BK 通道的功能调节机制

5.1 辅助亚基对 BK 通道的调节

BK 通道的辅助亚基主要包括两类: β 亚基($\beta 1 \sim \beta 4$)和富含亮氨酸重复序列的蛋白家族(LRRC 蛋白或 γ 亚基). β 亚基有 2 个跨膜片段和 1 个糖基化的胞外环, γ 亚基为单次跨膜蛋白,其胞外具有 6 个富含亮氨酸的重复结构单元(LRR1~6).

辅助亚基与 $\text{BK}\alpha$ 共表达,通过改变通道 Ca^{2+} 、电压和毒素敏感性或赋予其激活、去激活等动力学特性增加通道多样性. 动物毒素多肽特异作用于离子通道,它们常用来确定通道的结构和组成. 例如,与其他 β 亚基不同, $\beta 4$ 亚基赋予 BK 通道对 iberiotoxin、charybdotoxin 两类毒素的抵抗性. 但最新发现的一种芋螺毒素 Vt3.1,通过静电作用却优先阻断 α 与 $\beta 4$ 亚基形成的 BK 通道. 利用该毒素的作用还证实 $\beta 4$ 亚基胞外环调节 $\text{BK}\alpha$ 的电压门控机制^[34]. $\beta 2$ 与 $\beta 3b$ 亚基使 BK 通道具有外向整流特性,这源于亚基胞外碱性氨基酸组成的正电荷环^[35]. $\beta 2$ 亚基 NH2 端的一段包含疏水头部 Phe-Ile-Trp(FIW)的失活功能域,与 BK 通道胞质侧的结合位点作用,引起通道 N 型失活. 该类失活包含两步过程,用简单的动力学模型描述为 $\text{C} \longleftrightarrow \text{O} \longleftrightarrow \text{O}^* \longleftrightarrow \text{I}$. 其中 C、O、 O^* 、I 分别代表通道关闭、开放、预失活和失活态. 最近, Hou 等^[36]确定了 mSlo1 与 $\beta 2$ 亚基上对应的预失活位点(PI site)、增强 Ca^{2+} 敏感性的结合位点(E site)以及钙碗与通道门偶联的 ECaB 位点. 他们提出 $\beta 2$ 亚基增强通道 Ca^{2+} 敏感性的机制是:钙碗对 BK 通道门 S6 施加一个拉力, E site 在此路径中类似于定滑轮,它依靠改变门控拉力方向,使通道在 Ca^{2+} 条件下更易开放. 2014 年, Liu 等^[37]鉴定出 $\beta 1$ 亚基增强 BK 通道 Ca^{2+} 敏感性的结合位点及在钙碗门控调节途径中起重要作用的疏水结合位点. 动态结合这些位点还影响胞质功能域与 VSD 的相互作用,使通道对 Mg^{2+} 的敏感性下降.

5.2 翻译后修饰对 BK 通道的调节

许多离子通道的门控特性通过细胞内激酶和磷酸酶作用的动态平衡调节. 这些激酶包括环腺苷酸依赖型蛋白激酶 A(cAMP-dependent protein kinase, PKA)、环鸟苷酸依赖型蛋白激酶 G(cAMP-dependent protein kinase, PKG)、磷脂/ Ca^{2+} 依赖型蛋白激酶 C(PKC)等. 它们对 BK 通道活性的影响不尽相同. PKA 和 PKG 使通道磷酸化而激活, PKC 在通道活

性调节中扮演双重角色^[38]. PKC 介导 BK α 的 Ser695、Ser1151 磷酸化, 减少通道开放几率. Ser1151 的磷酸化使 BK 通道响应 PKG 的激活, 抑制 PKA 的刺激作用. Ser695 磷酸化使通道对 PKG 和 PKA 的刺激效应均不敏感^[38]. 可见激酶对 BK 通道活性的调节依赖磷酸化修饰位点的生理环境, 甚至受到通道组成型磷酸化位点的影响. 在血管平滑肌细胞中, 可溶性鸟苷环化酶(sGC)中亚铁血红素结合位点受 NO 或 CO 调节, sGC 活化, 细胞内 cGMP 含量增加, 激活 PKG 并促进 BK 通道活性. Kyle 等^[39]证实 NO/cGMP/PKG 途径使 BK α C 端 3 个 Ser 磷酸化, 与通道活性增强直接相关, 单个的磷酸化 Ser/Thr 可以协同激活 BK 通道. Leo 等^[40]在人和小鼠动脉肌细胞中发现 95% 的 BK α 和仅 10% 的 β 1 亚基定位于细胞质膜, 胞内 β 1 亚基储存于 Rab11A 调控的再循环内体中. NO/cGMP/PKG 信号途径促进 β 1 亚基快速转运到质膜与 BK α 结合, 增强通道 Ca²⁺ 敏感性, 导致血管舒张.

除了磷酸化作用, S 型棕榈酰化作为一种可逆的翻译后修饰机制, 调节离子通道特性及其功能. S 型棕榈酰化指含有 16 个碳原子的饱和棕榈酸与半胱氨酸共价结合, 形成不稳定硫酯键的过程. 最新研究表明, BK α 的 N 端和 C 端可分别由棕榈酰酰基转移酶(zDHHCs)和酰基硫脂酶(APTs)进行酰化修饰^[41]. N 端的 S 型酰化调控通道蛋白的转运及质膜表达水平, C 端的酰化修饰决定了蛋白激酶对 BK 通道活性的调节作用. 前文提到, PKC 可抑制 BK 通道活性, 但 BK-STREX 剪接突变体发生棕榈酰化后, 将 BK α C 端锚定于质膜, 使通道对 PKC 具有耐受作用^[42]. 此外, 由 BK 通道组成的多分子信号复合物亦受 S 型棕榈酰化的动态调节, 该修饰可能作为鉴别通道疾病的重要决定因素^[41].

泛素化在蛋白质定位、代谢和降解中具有重要作用. 它参与细胞周期、增殖分化、基因表达、损伤修复等几乎一切生命活动的调控. 泛素化与肿瘤、心血管疾病的发生密切相关, 因此它成为目前研究开发新药物的热点. 在人类基因组中有超过 600 个基因编码 E3 泛素连接酶, 这些酶将泛素连接于底物上, 被标记底物即成为蛋白酶体的靶标. 近来研究表明泛素化对 BK 通道的功能具有重要影响. 2014 年, Liu 等^[43]报道, 在中枢神经系统中, cereblon(CRBN)蛋白与 BK 通道相互作用, CRBN 是 CRL4A E3 连接酶的受体, 介导 BK α 泛素化并

滞留于内质网. 通过药物或遗传干扰 CRL4A 连接酶活性, 抑制 BK 通道泛素化, 使小鼠神经细胞膜上 BK 通道表达量增加, 导致癫痫高频发生. 说明泛素化作为限制 BK 通道在神经元上表达的重要调控机制, 影响细胞膜的兴奋性. 此外, Yi 等^[44]报道在暴露于高浓度葡萄糖环境的肌细胞或糖尿病小鼠动脉细胞中, 检测到 BK β 1 亚基的泛素化. 在糖尿病小鼠细胞内, NF- κ B 的转录活性增强, 肌细胞特异性泛素蛋白连接酶表达量上升, 致使 BK β 1 亚基泛素化水平和蛋白水解作用增强. 由于质膜上的 BK β 1 亚基与 BK α 存在动态组装过程^[40], 所以 BK β 1 的泛素化不一定引起细胞内 BK α 水平的下降.

5.3 剪接突变体对 BK 通道的调节

大多数 Kv 通道超家族由不同基因产生多种通道类型, 但 BK α 仅由一个基因(*Slo1*)编码, 通道的多样性源于其 mRNA 的选择性剪接. 目前在 *Slo1* 上鉴定出 10 个剪接突变位点, 使产生的 BK α 具有不同的表型或功能特征, 包括 Ca²⁺ 和电压敏感性、磷酸化、蛋白转运、信号级联反应、质膜表达量差异等^[45]. BK 通道 STREX 外显子具有力敏感性, 它包含 59 个氨基酸, 其序列富含半胱氨酸. STREX 插入 RCK1 与 RCK2 功能域之间的 linker 区, 使 BK 通道对 Ca²⁺ 和电压的敏感性显著提高. 通常, PKA 磷酸化 BK α 而激活通道, 但 STREX 的插入引入额外的 PKA 磷酸化位点, 使 BK-STREX 表现阻断特性. 其分子机制是: STREX 中保守的半胱氨酸发生棕榈酰化, 介导通道的胞质 C 端锚定于细胞质膜, 当 STREX 中酰化半胱氨酸上游的丝氨酸经 PKA 磷酸化后, C 端即从质膜上分离并抑制 BK 通道活性^[45].

另一个研究较多的剪接突变体是 SV1, 该序列包含 33 个氨基酸. 它插入通道 S0 与 S1 之间的 linker 区, 其中一段氨基酸可作为 S1 跨膜螺旋的一部分进入细胞膜中. SV1 突变体包含一个新颖的内质网滞留信号(CVLF), 它与野生型 BK α 或 β 1 亚基共表达时能显著降低后者的质膜表达量, 这种现象称为 Dominant-Negative 效应. 除了内质网信号外, Zarei 等^[46]发现在靠近 BK β 2、 β 3 亚基 C 端的两个交叠的酪氨酸和双亮氨酸分选信号, 使 BK α 在质膜上的稳态表达水平下降 40%~50%. 最新研究发现, BK β 4 亚基 C 端碱性氨基酸模序中的两个残基(KR)作为内质网滞留信号, 调控神经元的兴奋性^[47]. 当滞留信号被隐藏, β 4 亚基的质膜表达水平增加. β 4 亚基拓宽动作电位并阻碍 BK

通道在膜复极化中的作用,从而减慢动作电位发放速率,抑制神经过度兴奋。相反, $\beta 4$ 亚基较强的滞留信号导致BK α 出现功能获得性表型,细胞兴奋性增强。与SV1的滞留信号不同, $\beta 4$ 亚基的滞留信号不具有Dominant-Negative效应,BK α 能被轻易地转运至细胞膜,并选择与其他辅助亚基如 $\beta 2$ 在大脑中表达。此外, $\beta 4$ 亚基C端半胱氨酸的棕榈酰化对于其转运是必须的。酰化修饰的 $\beta 4$ 亚基抵抗BK通道剪接突变体的滞留信号(VEDEC),增加该突变体的质膜表达量^[48]。由于各类神经元中棕榈酰化水平、BK通道剪接位点存在差异,使得在大脑中的 $\beta 4$ mRNA水平虽然较高,但不同神经元却有着不同的毒素敏感性^[48]。

6 结 论

BK通道广泛分布于人体神经系统、平滑肌、骨骼肌及内分泌细胞中,它们参与多种细胞生理过程并具有重要的生理学意义。人体BK通道的功能紊乱将导致一系列病理后果,如高频听力失聪、高血压、小便失禁和神经障碍性疾病等。研究发现,精神分裂症患者前额皮质中BK通道的mRNA表达水平明显低于对照组,通常使用的抗精神病药物是增强K⁺电导^[9]。类似地,孤独症和智力迟钝也与Slo1基因单倍剂量不足,致使通道表达量下降有关^[9]。现今市场上还没有靶向BK通道的特效药,目前仅有一种安多司特抗过敏药物(andolast)仍处在临床研究阶段。

针对BK通道的研究已开展了30多年,除了阐明钾通道高效的离子选择性基础外,还发展了配体和电压变构调节BK通道门控机制的模型。最新获得的BK通道电镜结构及其胞质功能域的X射线晶体结构第一次展示了BK通道4个亚基的装配。此外,近年来在BK通道功能性调节及其门控动力学模拟研究中取得进展。这些成果有利于更好地理解BK通道的门控机制,从而揭示各种BK通道相关疾病的病理生理学基础,对药物研发具有重要的理论参考价值和实际应用意义。

参 考 文 献

- [1] Mackinnon R. Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. *Biosci Rep*, 2004, **24**(2): 75-100
- [2] Jiang Y, Ruta V, Chen J, *et al.* The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 2003, **423**(6935): 42-48
- [3] Ye S, Li Y, Jiang Y. Novel insights into K⁺ selectivity from high-resolution structures of an open K⁺ channel pore. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(8): 1019-1023
- [4] Ge L, Hoa N T, Wilson Z, *et al.* Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy. *Int Immunopharmacol*, 2014, **22**(2): 427-443
- [5] Hoshi T, Pantazis A, Olcese R. Transduction of voltage and Ca²⁺ signals by Slo1 BK channels. *Physiology (Bethesda)*, 2013, **28**(3): 172-189
- [6] Bettinger J C, Davies A G. The role of the BK channel in ethanol response behaviors: evidence from model organism and human studies. *Front Physiol*, 2014, **5**: 346
- [7] Tomas M, Vazquez E, Fernandez-Fernandez J M, *et al.* Genetic variation in the KCNMA1 potassium channel alpha subunit as risk factor for severe essential hypertension and myocardial infarction. *J Hypertens*, 2008, **26**(11): 2147-2153
- [8] Kawakubo T, Naruse K, Matsubara T, *et al.* Characterization of a newly found stretch-activated KCa, ATP channel in cultured chick ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1999, **276**(6 Pt 2): H1827-1838
- [9] Zhao H C, Agula H, Zhang W, *et al.* Membrane stretch and cytoplasmic Ca²⁺ independently modulate stretch-activated BK channel activity. *J Biomech*, 2010, **43**(15): 3015-3019
- [10] Naruse K, Tang Q Y, Sokabe M. Stress-Axis Regulated Exon (STREX) in the C terminus of BK(Ca) channels is responsible for the stretch sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **385**(4): 634-639
- [11] Wang W, Huang H, Hou D, *et al.* Mechanosensitivity of STREX-lacking BKCa channels in the colonic smooth muscle of the mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, **299**(6): G1231-1240
- [12] Ko J H, Ibrahim M A, Park W S, *et al.* Cloning of large-conductance Ca (2+)-activated K (+) channel alpha-subunits in mouse cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **389**(1): 74-79
- [13] Poulsen A N, Wulf H, Hay-Schmidt A, *et al.* Differential expression of BK channel isoforms and beta-subunits in rat neuro-vascular tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1788**(2): 380-389
- [14] Bentzen B H, Osadchii O, Jespersen T, *et al.* Activation of big conductance Ca (2+)-activated K (+) channels (BK) protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Pflugers Arch*, 2009, **457**(5): 979-988
- [15] Xu W, Liu Y, Wang S, *et al.* Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science*, 2002, **298**(5595): 1029-1033
- [16] Wang Y J, Sung R J, Lin M W, *et al.* Contribution of BK(Ca)-channel activity in human cardiac fibroblasts to electrical coupling of cardiomyocytes-fibroblasts. *J Membr Biol*, 2006, **213**(3): 175-185
- [17] Atkinson N S, Robertson G A, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science*, 1991, **253**(5019): 551-555
- [18] Lu R, Alioua A, Kumar Y, *et al.* MaxiK channel partners:

- physiological impact. *J Physiol*, 2006, **570**(Pt 1): 65–72
- [19] Lee U S, Cui J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci*, 2010, **33**(9): 415–423
- [20] Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, *et al.* Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther*, 2006, **110**(1): 103–116
- [21] Lee S Y, Banerjee A, Mackinnon R. Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS Biol*, 2009, **7**(3): e47
- [22] Jiang Y, Lee A, Chen J, *et al.* Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 2002, **417**(6888): 515–522
- [23] Wu Y, Yang Y, Ye S, *et al.* Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca (2+)-gated K (+) channel. *Nature*, 2010, **466**(7304): 393–397
- [24] Wang L, Sigworth F J. Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature*, 2009, **461**(7261): 292–295
- [25] Liu G, Zakharov S I, Yang L, *et al.* Position and role of the BK channel alpha subunit S0 helix inferred from disulfide crosslinking. *J Gen Physiol*, 2008, **131**(6): 537–548
- [26] Yang H, Hu L, Shi J, *et al.* Mg²⁺ mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(46): 18270–18275
- [27] Zhao H, Sokabe M. Tuning the mechanosensitivity of a BK channel by changing the linker length. *Cell Res*, 2008, **18**(8): 871–878
- [28] Wu Y, Xiong Y, Wang S, *et al.* Intersubunit coupling in the pore of BK channels. *J Biol Chem*, 2009, **284**(35): 23353–23363
- [29] Chen X, Yan J, Aldrich R W. BK channel opening involves side-chain reorientation of multiple deep-pore residues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(1): E79–88
- [30] Zhao H C, Wang F. Exercise training changes the gating properties of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat thoracic aorta smooth muscle cells. *J Biomech*, 2010, **43**(2): 263–267
- [31] Sweet T B, Cox D H. Measurements of the BKCa channel's high-affinity Ca²⁺ binding constants: effects of membrane voltage. *J Gen Physiol*, 2008, **132**(5): 491–505
- [32] Budelli G, Geng Y, Butler A, *et al.* Properties of Slo1 K⁺ channels with and without the gating ring. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(41): 16657–16662
- [33] Wang W, Luo J, Hou P, *et al.* Native gating behavior of ion channels in neurons with null-deviation modeling. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e77105
- [34] Li M, Chang S, Yang L, *et al.* Conopeptide Vt3.1 preferentially inhibits BK potassium channels containing $\beta 4$ subunits *via* electrostatic interactions. *J Biol Chem*, 2014, **289**(8): 4735–4742
- [35] Chen M, Gan G, Wu Y, *et al.* Lysine-rich extracellular rings formed by $\beta 2$ subunits confer the outward rectification of BK channels. *PLoS One*, 2008, **3**(5): e2114
- [36] Hou P, Zeng W, Gan G, *et al.* Inter- α/β subunits coupling mediating pre-inactivation and augmented activation of BKCa($\beta 2$). *Sci Rep*, 2013, **3**: 1666
- [37] Liu H W, Hou P P, Guo X Y, *et al.* Structural basis for calcium and magnesium regulation of a large conductance calcium-activated potassium channel with $\beta 1$ subunits. *J Biol Chem*, 2014, **289**(24): 16914–16923
- [38] Zhou X B, Wulfsen I, Utku E, *et al.* Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(17): 8005–8010
- [39] Kyle B D, Hurst S, Swayze R D, *et al.* Specific phosphorylation sites underlie the stimulation of a large conductance, Ca (2+)-activated K(+) channel by cGMP-dependent protein kinase. *FASEB J*, 2013, **27**(5): 2027–2038
- [40] Leo M D, Bannister J P, Narayanan D, *et al.* Dynamic regulation of $\beta 1$ subunit trafficking controls vascular contractility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(6): 2361–2366
- [41] Shipston M J. S-acylation dependent post-translational cross-talk regulates large conductance calcium- and voltage- activated potassium (BK) channels. *Front Physiol*, 2014, **5**: 281
- [42] Zhou X, Wulfsen I, Korth M, *et al.* Palmitoylation and membrane association of the stress axis regulated insert (STREX) controls BK channel regulation by protein kinase C. *J Biol Chem*, 2012, **287**(38): 32161–32171
- [43] Liu J, Ye J, Zou X, *et al.* CRL4A (CRBN) E3 ubiquitin ligase restricts BK channel activity and prevents epileptogenesis. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3924
- [44] Yi F, Wang H, Chai Q, *et al.* Regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel $\beta 1$ subunit expression by muscle RING finger protein 1 in diabetic vessels. *J Biol Chem*, 2014, **289**(15): 10853–10864
- [45] Tian L, Jeffries O, Mcclafferty H, *et al.* Palmitoylation gates phosphorylation-dependent regulation of BK potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(52): 21006–21011
- [46] Zarei M M, Song M, Wilson R J, *et al.* Endocytic trafficking signals in KCNMB2 regulate surface expression of a large conductance voltage and Ca (2+)-activated K⁺ channel. *Neuroscience*, 2007, **147**(1): 80–89
- [47] Cox N, Toro B, Pacheco-Otalora L F, *et al.* An endoplasmic reticulum trafficking signal regulates surface expression of $\beta 4$ subunit of a voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Brain Res*, 2014, **1553**: 12–23
- [48] Wang B, Jaffe D B, Brenner R. Current understanding of iberiotoxin-resistant BK channels in the nervous system. *Front Physiol*, 2014, **5**: 382

Research Progresses of The Structure and Function of The Large Conductance Potassium Channels (BK)*

WANG Yan-Ting, GUO Xi-Ying, HUANG Zhi-Gang, WANG Sheng**

(Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science and Technology,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Large conductance Ca^{2+} activated potassium channel (BK) is the only ion channel which is regulated by intracellular Ca^{2+} and membrane potential in the cell membrane. Recently the structure of BK determined by cryo-electron microscopy (cryo-EM) shed the first light on the assembly of the whole channel, as well as the crystal structure of the cytosolic domain by x-ray single crystal diffraction. In addition, these 3D structures corroborate many close interactions among these domains during channel gating. More recently, great advancements have been made in the research on functional regulation and gating kinetics simulation of BK channels, these contribute to understand the gating mechanism of the BK channel and the pathophysiological basis of BK-related ion channel diseases.

Key words BK channel, big conductance, voltage sensor domain, gating ring, kinetics simulation, auxiliary subunit, splice variant

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0347

* This work was supported by grants from the National Basic Research Program of China (2010CB529804) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2014TS087).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-87793053, E-mail: shengwang@hust.edu.cn

Received: November 19, 2014 Accepted: February 16, 2015