



# Regulación electrostática del transporte iónico en el poro bacterial OmpF

Elena García Giménez

---

TESIS DOCTORAL UNIVERSITAT JAUME I / 2009

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals

Departament de Física

DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. Vicente M. Aguilera Fernández

Dr. Antonio D. Alcaraz González





Dr. VICENTE MANUEL AGUILELLA FERNÁNDEZ, catedrático del área de Física Aplicada en el departamento de Física de la Universitat Jaume I de Castellón, y Dr. ANTONIO DIEGO ALCARAZ GONZÁLEZ, profesor titular del área de Física Aplicada en el departamento de Física de la Universitat Jaume I de Castellón,

CERTIFICAN: Que ELENA GARCÍA GIMÉNEZ ha realizado la presente memoria, “Regulación electrostática del transporte iónico en el poro bacterial OmpF”, bajo nuestra dirección en el departamento de Física de la Universitat Jaume I y constituye su tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Castellón, a nueve de noviembre de dos mil nueve.

Fdo.: Vicente M. Aguilera Fernández

Fdo.: Antonio D. Alcaraz González



*A mi familia*



# Agradecimientos

A mi familia, por ser siempre un apoyo constante en todas las decisiones que he tomado en mi vida y por su inestimable ayuda en todo aquello que he necesitado.

A mis directores de tesis, por haberme guiado durante el desarrollo de este trabajo con tan afanoso empeño, por sus constantes muestras de atención y por haber sido, tanto personal como profesionalmente, todo un ejemplo.

A mis compañeros, incluido Javier, por su desinteresada colaboración en diversos aspectos de este trabajo. Destacar sobre todo la participación de Marcel, que ha empleado tiempo de paciencia y esfuerzo en explicarme los detalles de todo en cuanto a cálculo aparece en esta memoria. Su experiencia ha sido una valiosa ayuda para mí.

Me gustaría también expresar en estas líneas mi más sincero agradecimiento a Patricio, a cuyo entusiasmo y motivación le debo una gran parte de los contenidos de esta tesis.

Y por último, mi agradecimiento al Ministerio de Educación por financiar los proyectos “Selectividad y Estudio Electroestático del Canal Iónico OmpF” (FIS2004-03424) y “Asimetría y Rectificación en Canales Iónicos Mesoscópicos y su Regulación Electroestática” (FIS2007-60205), a los que debo mi participación en el grupo de investigación de Biofísica de la Universitat Jaume I y la investigación llevada a cabo durante la realización de esta tesis.





# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE CANALES IÓNICOS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.- GENERALIDADES.....</b>	<b>9</b>
1.1.1.- La membrana biológica .....	9
1.1.2.- Los canales iónicos.....	13
1.1.3.- Porinas.....	20
<b>1.2.- EL PORO BACTERIAL OMPF .....</b>	<b>22</b>
1.2.1.- Estructura del canal iónico OmpF.....	22
1.2.2.- Propiedades de transporte a través del canal iónico OmpF .....	25
<b>1.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE CANALES IÓNICOS EN BICAPAS DE LÍPIDO .....</b>	<b>29</b>
1.3.1.- Montaje experimental .....	29
1.3.2.- Preparación previa.....	29
1.3.3.- Formación de la bicapa lipídica .....	31
1.3.4.- Inserción de la proteína .....	32
1.3.5.- Dispositivo de medida: adquisición y tratamiento de los datos experimentales.....	32

<b>1.4.- MODELOS DE TRANSPORTE IÓNICO A TRAVÉS DE CANALES .....</b>	<b>34</b>
1.4.1.- Introducción a la modelización de canales iónicos.....	34
1.4.2.- Simulaciones de dinámica molecular y de dinámica browniana .....	35
1.4.3.- Modelos continuos.....	38
<b>2. REGULACIÓN ELECTROSTÁTICA DE LA CORRIENTE DEL CANAL IÓNICO OMPF MEDIANTE EL <i>pH</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.- REGULACIÓN DE LA CARGA DEL CANAL MEDIANTE EL <i>pH</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN EN LA RECTIFICACIÓN DE LA CORRIENTE .....</b>	<b>50</b>
<b>2.4.- ORIGEN MICROSCÓPICO DE LA RECTIFICACIÓN DE LA CORRIENTE .....</b>	<b>53</b>
<b>2.5.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>3. SELECTIVIDAD DIRECCIONAL DEL CANAL IÓNICO OMPF .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.- ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CARGA DEL CANAL IÓNICO OMPf EN CONDICIONES DE <i>pH</i> 3/12.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3.- SELECTIVIDAD DIRECCIONAL DEL CANAL OMPf BAJO UN GRADIENTE DE <i>pH</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>3.4.- SELECTIVIDAD DIRECCIONAL DEL CANAL OMPf EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS.....</b>	<b>70</b>
<b>3.5.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>

<b>4. ORIGEN DE LA SELECTIVIDAD DEL CANAL: DIFUSIÓN, EXCLUSIÓN Y <i>BINDING</i></b> .....	<b>75</b>
<b>4.1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>77</b>
<b>4.2.- INFLUENCIA DE LA DIFUSIÓN SOBRE LA SELECTIVIDAD DEL CANAL OMPF</b> .....	<b>78</b>
4.2.1.- Contribución del potencial de unión líquida de la interfase electrodos- disolución.....	78
4.2.2.- Contribución del potencial de difusión al RP en sales monovalentes .....	79
4.2.3.- Contribución del potencial de difusión al RP en sales divalentes.....	81
<b>4.3.- EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES <math>Ca^{2+}</math> Y <math>Mg^{2+}</math> SOBRE LA CARGA DEL CANAL</b> .....	<b>84</b>
<b>4.4.- AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO A OTROS CATIONES DIVALENTES</b> .....	<b>88</b>
<b>4.5.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>89</b>
<b>5. INVERSIÓN DE LA CARGA DE UN CANAL IÓNICO POR IONES MULTIVALENTES</b> .....	<b>91</b>
<b>5.1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>93</b>
<b>5.2.- INFLUENCIA DE LOS RESIDUOS D113 Y E117 SOBRE LA SELECTIVIDAD DEL CANAL OMPF</b> .....	<b>94</b>
<b>5.3.- INFLUENCIA DE LOS RESIDUOS D113 Y E117 SOBRE EL <i>BINDING</i> DE CATIONES DIVALENTES</b> .....	<b>98</b>
<b>5.4.- EFECTO DEL <i>BINDING</i> DE CATIONES DIVALENTES SOBRE LA SELECTIVIDAD</b> .....	<b>100</b>
<b>5.5.- AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO A OTRAS SALES MULTIVALENTES</b> .....	<b>102</b>

<b>5.6.- APLICACIÓN DE LAS TEORÍAS DE INVERSIÓN DE CARGA A UN CANAL IÓNICO .....</b>	<b>104</b>
<b>5.7.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>111</b>
<b>APÉNDICE 1. CONTRIBUCIÓN DEL POTENCIAL DE UNIÓN LÍQUIDA A LAS MEDIDAS DE SELECTIVIDAD .....</b>	<b>117</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>129</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>147</b>

# Lista de figuras

Figura 1.1.- Fragmento de membrana celular.....	9
Figura 1.2.- Composición de un fosfolípido.....	10
Figura 1.3.- Estructura de una hélice $\alpha$ .....	11
Figura 1.4.- Estructura de un lámina $\beta$ .....	12
Figura 1.5.- Técnica de <i>patch-clamp</i> .....	14
Figura 1.6.- Gating del canal CFTR extraído de dos especies diferentes.....	19
Figura 1.7.- Fragmento de una membrana externa bacterial.....	21
Figura 1.8.- Estructura de la maltoporina.....	21
Figura 1.9.- Diferentes vistas de la estructura del canal OmpF.....	23
Figura 1.10.- Monómero del canal OmpF lleno de agua.....	23
Figura 1.11.- Residuos ácidos y básicos en el estrechamiento del canal OmpF.....	24
Figura 1.12.- Gating del canal OmpF.....	27
Figura 1.13.- Reconstitución de un canal iónico en una bicapa de lípido.....	29
Figura 1.14.- Perforación de la lámina de teflón.....	30
Figura 1.15.- Instrumentación experimental para la toma de medidas en canales iónicos.....	33
Figura 2.1.- Curvas I-V del canal OmpF en 0,1 M KCl a <i>pH</i> 3, 7 y 12.....	47
Figura 2.2.- Curvas I-V del canal OmpF en 0,1 M KCl en condiciones de <i>pH</i> 3/7, 7/12 y 3/12.....	48
Figura 2.3.- Cociente $ I_- / I_+ $ frente al potencial aplicado $ V $ en condiciones de <i>pH</i> 3/7, 7/12 y 3/12.....	49

Figura 2.4.- Curvas I-V del canal OmpF en condiciones de <i>pH</i> 3/12 en varias concentraciones de KCl.....	51
Figura 2.5.- Cociente $ I_- / I_+ $ frente al potencial aplicado $ V $ en condiciones de <i>pH</i> 3/12 en varias concentraciones de KCl .....	52
Figura 2.6.- Ciclo termodinámico que relaciona el equilibrio de disociación de un residuo ionizable en disolución libre y en el entorno proteico .....	53
Figura 2.7.- Correlación cualitativa entre la densidad de carga efectiva calculada del canal OmpF y las medidas de RP en función del <i>pH</i> .....	55
Figura 2.8.- Representación del estado de carga de los residuos de un monómero del canal OmpF en condiciones de <i>pH</i> 3/12 .....	56
Figura 2.9.- Ilustración del funcionamiento de un monómero del canal OmpF con una distribución bipolar de carga .....	57
Figura 3.1.- RP y $t_+$ frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en KCl a <i>pH</i> 3/12, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M y 0,2 M .....	65
Figura 3.2.- Correlación cualitativa entre la densidad de carga efectiva calculada del canal OmpF y las medidas de RP en función del <i>pH</i> .....	66
Figura 3.3.- RP y $t_+$ frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en KCl a <i>pH</i> 2/12, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M .....	69
Figura 3.4.- RP y $t_+$ frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en KCl a <i>pH</i> 2/7 y 3/7, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M .....	71
Figura 4.1.- RP frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en KCl y NaCl a <i>pH</i> 6.....	79
Figura 4.2.- RP frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en KCl y NaCl a <i>pH</i> 6 en escala semilogarítmica .....	80
Figura 4.3.- RP frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en CaCl <sub>2</sub> y MgCl <sub>2</sub> a <i>pH</i> 6, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M .....	81
Figura 4.4.- RP frente a $V_{dif}$ en CaCl <sub>2</sub> y MgCl <sub>2</sub> a <i>pH</i> 6, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M.....	82

Figura 4.5.- RP frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en escala semilogarítmica en $\text{CaCl}_2$ y $\text{MgCl}_2$ a $\text{pH}$ 6, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M.....	83
Figura 4.6.- RP en función del $\text{pH}$ en 0,1/1 M de $\text{KCl}$ , $\text{CaCl}_2$ y $\text{MgCl}_2$ .....	85
Figura 4.7.- RP en función de $c_{cis}$ en $\text{CaCl}_2$ a $\text{pH}$ 6, manteniendo un gradiente de cocentración 10.....	86
Figura 4.8.- RP en función de $c_{cis}$ en $\text{CaCl}_2$ a $\text{pH}$ 6, manteniendo un gradiente de cocentración 1,5.....	87
Figura 4.9.- RP frente a $V_{dif}$ en 1/0,1 M para $\text{BaCl}_2$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{MgCl}_2$ y $\text{NiCl}_2$ .....	88
Figura 4.10.- RP frente a $V_{dif}$ en 15/10 mM para $\text{BaCl}_2$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{MgCl}_2$ y $\text{NiCl}_2$ .....	89
Figura 5.1.- Localización de un átomo de $\text{Mg}^{2+}$ en la estructura cristalográfica del canal OmpF resuelta en 1 M $\text{MgCl}_2$ .....	95
Figura 5.2.- Sección lateral de un monómero del canal y disposición de los residuos en el estrechamiento del canal OmpF y los mutantes CC y RR.....	96
Figura 5.3.- RP en función del $\text{pH}$ en 1/0,1 M de $\text{KCl}$ para el canal OmpF y el mutante CC.....	97
Figura 5.4.- RP del canal OmpF y del mutante CC frente a $c_{cis}/c_{trans}$ en $\text{CaCl}_2$ a $\text{pH}$ 6, manteniendo $c_{trans}$ a 0,1 M.....	99
Figura 5.5.- RP del canal OmpF y de los mutantes CC y RR en función de $c_{cis}$ en $\text{CaCl}_2$ a $\text{pH}$ 6, manteniendo un gradiente de cocentración 10.....	101
Figura 5.6.- RP del canal OmpF y del mutante CC en función de $c_{cis}$ en $\text{MgCl}_2$ a $\text{pH}$ 6, manteniendo un gradiente de cocentración 10.....	104
Figura 5.7.- Representación esquemática de las correlaciones laterales y transversales de contraiones en una superficie.....	106
Figura A1.1.- Interfases líquidas presentes al realizar medidas a través de canales iónicos.....	119

Figura A1.2.- Potencial de unión líquida total generado entre un puente salino 2 M KCl de unos electrodos en contacto con diversas disoluciones en función del gradiente de concentración.....	122
Figura A1.3.- Comparación entre la medida experimental del RP con y sin corregir en diversas sales.....	123
Figura A1.4.- Potencial de unión líquida total entre un puente salino 0,01 M KCl de unos electrodos en contacto con diversas disoluciones a 2/0,1 M.....	124



# Lista de tablas

Tabla 1.1.- Residuos aminoácidos ionizables en un monómero del canal OmpF.....	24
Tabla 3.1.- Selectividad del canal OmpF bajo la variación de $pH_{cis}$ de 2,50 a 3,00 manteniendo $pH_{trans} = 7$ .....	72
Tabla 5.1.- Comparación entre el $V_{dif}$ y el RP del canal a 1/0,1 M de diversas sales.....	94
Tabla 5.2.- RP del canal OmpF y los mutantes CC y RR en 1/0,1 M KCl a $pH$ 6 .....	97
Tabla 5.3.- RP del canal OmpF y los mutantes CC y RR en 1/0,1 M $CaCl_2$ a $pH$ 6.....	98
Tabla 5.4.- Comparación entre el RP del mutante RR en 1/0,1 M KCl y en 1/0,1 M $CaCl_2$ a $pH$ 6.....	100
Tabla 5.5.- RP del canal OmpF y el mutante CC en 1/0,1 M de diversas sales multivalentes a $pH$ 6 .....	103
Tabla A1.1.- Coeficientes de difusión en disolución libre de algunos iones.....	121
Tabla A1.2.- RP del canal OmpF obtenido mediante electrodos de diferentes concentraciones salinas.....	125
Tabla A1.3.- Potencial de unión líquida considerando concentraciones diferentes del puente salino de los electrodos y diferentes sales .....	126



# Objetivos

---



El objetivo principal de este trabajo es entender y caracterizar el comportamiento del canal iónico biológico OmpF. Este canal se encuentra formando un poro en la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli*, presente generalmente en el sistema digestivo de los mamíferos. Durante años, esta proteína ha sido ampliamente estudiada por diversas razones. Por una parte, el conocimiento de su estructura cristalográfica [Cowan 1995] hace posible establecer una relación estructura-función, importante para caracterizar lo más fielmente posible los rasgos más destacables de su comportamiento. En este contexto, se conoce que la regulación del transporte de iones monovalentes a través de él se debe principalmente a las interacciones electrostáticas entre sus cargas y los iones de la disolución [Schirmer 1998, Phale 2001, Nestorovich 2002b, Danelon 2003, Alcaraz 2004].

Por otra parte, el canal OmpF es un canal mesoscópico, con un tamaño de poro del orden de los nanómetros, y eso lo hace especialmente adecuado para estudiar sus propiedades macroscópicas desde un punto de vista electrostático continuo [Fulinski 2004].

Para introducir los fundamentos básicos de los canales iónicos se incluye en este trabajo una breve introducción teórica como capítulo 1. Conceptos tales como el de membrana biológica, lípido, proteína de membrana, etc, son introducidos muy ligeramente para situar el escenario en el que los canales iónicos realizan sus funciones en su medio natural. Más detalladamente se describen las porinas, poniendo especial atención en el poro bacteriano OmpF, objeto de estudio de la presente memoria.

En el capítulo 1 se presenta también el procedimiento experimental empleado para realizar medidas de corriente y potencial a través de canales. Éste está basado en la conocida técnica de *patch-clamp* [Neher 1976]. En este apartado se describe tanto la reconstitución de canales iónicos en bicapas de lípido artificiales como los pormenores del montaje experimental (la elaboración de electrodos, adquisición de datos, etc.).

En el capítulo 1 se incluye también una breve descripción de algunas herramientas de modelización del transporte iónico en canales (especialmente mesoscópicos). El objetivo final de estas herramientas es reproducir las propiedades macroscópicas del canal, obtenidas experimentalmente. Su uso proporciona

información del funcionamiento del canal y permite identificar los aspectos básicos por los que tiene lugar el transporte de iones.

Los capítulos 2 y 3 se incluyen en la memoria para mostrar el papel de las interacciones electrostáticas en la regulación del canal OmpF del transporte iónico. Para ello se tiene en cuenta el efecto del  $pH$  sobre la carga del canal [Aguilella-Arzo 2007] y se analiza el comportamiento del canal bajo un gradiente de  $pH$ .

En el capítulo 2 se realizan medidas de corriente bajo un gradiente de  $pH$ . El canal OmpF se comporta entonces como un sistema rectificador de la corriente. El origen microscópico de la rectificación se trata en este capítulo teniendo en cuenta los resultados del cálculo electrostático de los  $pK_a$ s de los residuos de la proteína. Estos resultados indican una distribución asimétrica de la carga del canal en las condiciones estudiadas [Alcaraz 2006].

Ante la posibilidad de regular la carga del canal mediante el  $pH$  de las disoluciones adyacentes, en el capítulo 3, se realizan medidas de selectividad bajo gradientes de  $pH$  para buscar una configuración bipolar de la carga del canal. La observación de una selectividad direccional en el canal OmpF será un indicio de una distribución de carga bipolar en el canal [García-Giménez 2009a].

La bacteria *Escherichia coli*, presente en el sistema digestivo de los mamíferos, se encuentra en un medio cuyo  $pH$  puede tener un valor entre 2 y 8. El medio intracelular está generalmente a 7,4 por lo que el canal OmpF puede encontrarse sometido a un gradiente de  $pH$  importante. Por sus repercusiones biológicas, esto hace especialmente importantes los resultados de los capítulos 2 y 3, puesto que muestran el comportamiento del canal OmpF en condiciones fisiológicas.

Los capítulos 4 y 5 se centran en examinar dos aspectos importantes del canal. Por una parte, el papel de la difusión iónica en la selectividad del canal, una contribución insignificante en condiciones fisiológicas pero que puede ser decisiva en otras situaciones. Por otra parte, la evidencia experimental de que en presencia de cationes multivalentes el canal no regula el transporte iónico de acuerdo con la existencia de una carga fija en la proteína. En estos capítulos, la existencia de interacciones no coulombicas se convierte en una explicación alternativa de los resultados experimentales obtenidos [Alcaraz 2009]. Sin embargo, las teorías al respecto sobre este tipo de interacciones entre iones multivalentes y grupos

superficiales cargados no resultan aplicables a los canales iónicos y, por ello, es necesario un análisis más profundo del sistema [García-Giménez 2009b].

La memoria incluye un apéndice que muestra la repercusión de los potenciales de unión líquida de las interfases electrodos-disolución en las medidas de selectividad de canales iónicos. Su lectura es recomendable, puesto que en algunos trabajos pueden no tenerse en cuenta las correcciones oportunas de las medidas dando lugar a una imagen errónea del sistema [Alcaraz 2009].

Por último, un breve apartado de conclusiones resume las ideas más relevantes obtenidas de los experimentos de la memoria. La discusión sobre algunas cuestiones sugeridas en los capítulos se recoge también en esta sección.

Los resultados obtenidos de algunos de los experimentos incluidos en este trabajo y las discusiones y conclusiones extraídas a partir de ellos, han dado lugar a lo largo de estos años de investigación a una serie de publicaciones que se incluyen al final de esta memoria [Alcaraz 2006, Alcaraz 2009, García-Giménez 2009a]. Algunos otros están en proceso de ser publicados [García-Giménez 2009b].





# Capítulo 1

---

## **Introducción al estudio de canales iónicos**



## 1.1.- Generalidades

### 1.1.1.- La membrana biológica

#### Composición

Las células de los organismos vivos están rodeadas de una membrana compuesta en una gran parte por una doble capa de lípidos que se conoce con el nombre de membrana plasmática. La formación espontánea de esta bicapa lipídica en disolución acuosa se produce como consecuencia del carácter anfipático de las moléculas de lípido que la constituyen (con un extremo hidrofílico o polar y otro extremo hidrofóbico o no polar): los extremos hidrofóbicos se unen entre sí dejando los extremos hidrofílicos en contacto con la disolución acuosa [Tanford 1991]. En la figura 1.1 se representa un fragmento de membrana celular compuesta por lípidos y unas estructuras proteicas que la cruzan [Alberts 1996].

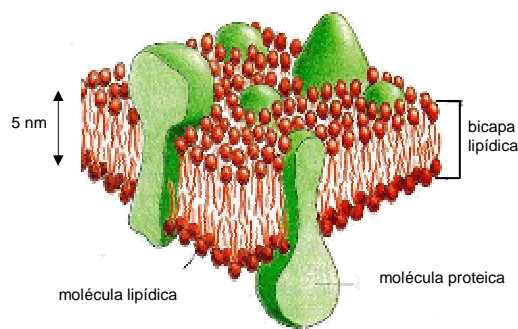


Fig. 1.1. Fragmento de una membrana celular compuesta por fosfolípidos y proteínas de membrana. Fuente: [Alberts 1996].

La bicapa lipídica de la membrana celular puede estar formada por diferentes tipos de lípidos. Los que más abundan son los fosfolípidos, que contienen dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas que forman el extremo no polar y una cabeza hidrofílica en el otro extremo. Tal y como se puede observar en la figura 1.1, al formar la bicapa, las cabezas hidrofílicas se orientan al entorno acuoso y las colas

de los lípidos se unen entre sí generando una zona altamente hidrofóbica en la bicapa.

En una de sus colas, el fosfolípido contiene uno o más enlaces dobles *cis* que provocan una ligera curvatura de la cadena, dotándole de una cierta flexibilidad. En la figura 1.2 se muestra claramente esta peculiaridad del fosfolípido, gracias a la cual la bicapa adquiere cierta fluidez bidimensional que posibilita que el agua y algunas partículas neutras pequeñas sean capaces de atravesarla [Finkelstein 1984, Walter 1986, Quinn 1992].

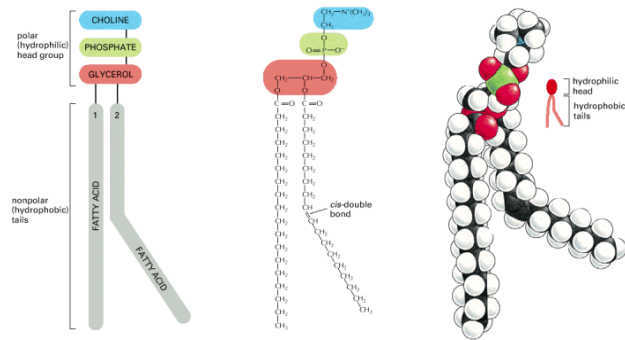


Fig. 1.2. Composición de un fosfolípido. Fuente: [Alberts 1996].

Los iones y moléculas cargadas, en cambio, no pueden atravesar la bicapa lipídica con facilidad. La carga y el elevado grado de hidratación de tales partículas impiden que penetren en la zona hidrofóbica de la bicapa [Tanford 1991, Coalson 2002]. Estas moléculas únicamente pueden atravesar la membrana a través de unas proteínas inmersas en ella como las que se representan en la figura 1.1 que se conocen como proteínas de membrana.

### Proteínas de membrana

La mayoría de las funciones específicas de la membrana celular está desempeñada por las proteínas de membrana. En general, en la mayoría de las células, las proteínas constituyen el 50 % aproximadamente de la masa total de su membrana [Gennis 1989]. Sin embargo, esta cantidad puede variar dependiendo de la función concreta de la célula. Por ejemplo, la vaina de mielina, cuya función es aislar

los axones nerviosos, contiene menos del 25 % en masa de contenido proteico mientras que las membranas de células dedicadas a la transducción energética (membranas internas de mitocondrias y cloroplastos) contienen aproximadamente un 75 % en masa de proteínas [Alberts 1996].

Las proteínas de membrana se adhieren a la bicapa lipídica de diferentes formas: atravesándola completamente (proteínas integrales o transmembrana), uniéndose covalentemente a ella mediante un ácido graso o un grupo prenil o uniéndose mediante interacciones no covalentes con otras proteínas de membrana (proteínas periféricas). De todas ellas, únicamente las proteínas integrales pueden transportar iones o moléculas de uno a otro lado de la membrana. Estas proteínas tienen un carácter anfipático que determina la forma en que la proteína queda plegada dentro de la bicapa de lípidos: las regiones hidrofóbicas se sitúan en el interior de la membrana junto a las colas hidrocarbonadas de la bicapa y las regiones hidrofílicas están expuestas al medio acuoso [Braden 1999].

Como los enlaces peptídicos tienen una naturaleza polar, dentro del medio hidrofóbico (en el interior de la bicapa lipídica) las uniones peptídicas forman puentes de hidrógeno entre sí que dan lugar a dos tipos de estructuras. Un tipo de estas estructuras es la hélice  $\alpha$ . Las hélices  $\alpha$  pueden cruzar la membrana una o más veces [Alberts 1996]. En la figura 1.3 se muestra la organización básica de los componentes aminoácidos de una hélice  $\alpha$ .

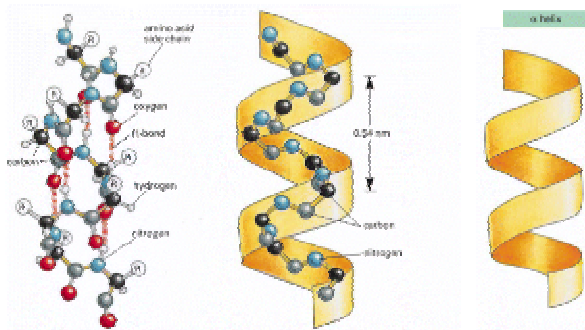


Fig. 1.3. Estructura de una hélice  $\alpha$ . Fuente: [Alberts 1996].

El otro tipo de estructuras de plegamiento de proteínas al cruzar la membrana se conoce por lámina  $\beta$ . Las láminas  $\beta$  pasan múltiples veces a través de la

membrana formando poros cilíndricos conocidos como barriles  $\beta$  [Alberts 1996]. En la figura 1.4 se muestra el ordenamiento de los residuos en la formación de láminas  $\beta$ .

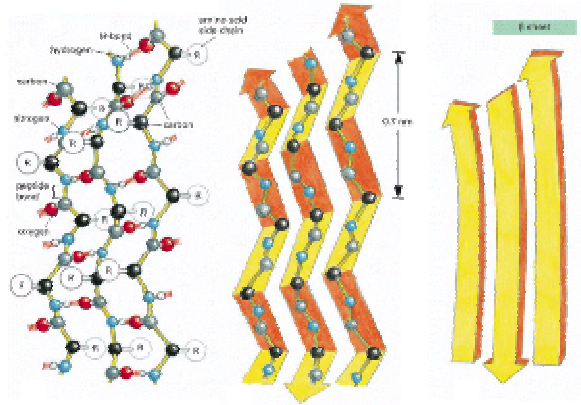


Fig. 1.4. Estructura de una lámina  $\beta$ . Fuente: [Alberts 1996].

### Tipos de transporte iónico a través de membranas

El transporte de iones a través de membranas se produce a través de las proteínas transmembrana y puede ser activo o pasivo. El transporte pasivo no requiere gasto de energía metabólica y, como consecuencia, se produce siempre a favor de su gradiente de potencial electroquímico. El transporte activo, en cambio, precisa de una fuente de energía adicional para bombear iones en contra de su potencial electroquímico.

Existen principalmente dos tipos de proteínas transmembrana: las conocidas como transportadores y las proteínas de canal o canales iónicos. El transporte de iones u otras sustancias mediante transportadores se produce como consecuencia de la asociación del soluto a la proteína. Esta asociación provoca cambios conformacionales en la estructura proteica que permiten la transferencia del soluto a través de la membrana, a veces incluso en contra de su gradiente de potencial electroquímico. El transporte de iones a través de este tipo de proteínas puede ser, por lo tanto, pasivo o activo. Para realizar transporte activo, los

transportadores precisan de energía metabólica para bombear los iones en contra de su potencial electroquímico [Stein 1990].

Los canales iónicos, por otra parte, se pliegan dentro de las membranas celulares formando poros llenos de agua. El transporte de solutos a través de los canales iónicos es un transporte únicamente pasivo y éstos permiten el flujo de iones con una rapidez mucho mayor que los transportadores (de más de  $10^6$  iones por segundo en los canales frente a unos cientos de iones por segundo en los transportadores) [Hille 2001].

### **1.1.2.- Canales iónicos**

#### **Breve historia de los canales iónicos**

El concepto de canal iónico apareció en 1952 cuando Alan Hodgkin y Andrew Huxley midieron la corriente que pasaba a través de una sección de la membrana del axón de una neurona gigante de calamar [Hodgkin 1952b]. La corriente eléctrica detectada era mucho mayor que la que una membrana lipídica biológica, dada su baja permitividad eléctrica, podía dejar pasar [Parsegian 1969], un indicio de que debía haber un mecanismo de transporte iónico a través de ella. Hodgkin y Huxley introdujeron por primera vez el concepto de canal iónico cuando declararon que la corriente medida era una consecuencia de la acción combinada de dos mecanismos diferentes para el paso de los iones potasio y sodio.

El trabajo de estos investigadores supuso el inicio de un amplio estudio sobre la repercusión de los canales iónicos regulados por voltaje de sodio y potasio en la excitabilidad eléctrica de las membranas [Hille 2001]. Por esa razón, en 1963, su trabajo fue merecidamente reconocido y ambos investigadores recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina.

En la década de los años 60 y 70 el estudio de los canales iónicos de sodio y potasio se comenzó a explorar desde diversas perspectivas. El descubrimiento de la tetrodotoxina, una toxina encontrada en el pez globo takifugu que bloquea los canales de sodio, propició el estudio de los canales de potasio de la membrana del axón gigante del calamar [Narahashi 1964]. El hallazgo de otros agentes bloqueadores de canales como el uso de iones amonio cuaternario para bloquear los

canales de potasio [Hille 1967, Armstrong 1971] permitió el estudio independiente de cada tipo de canal. Bertil Hille midió la permeabilidad de los canales de sodio a iones orgánicos y metálicos [Hille 1971, Hille 1972]. El estudio de la permeabilidad de los canales a iones de diferentes tamaños [Hille 1973] le permitió además estimar las dimensiones mínimas del poro proteico. No obstante, hasta entonces no había sido posible aislar los canales iónicos para estudiar su actividad individualmente. Una primera referencia al estudio individual de los canales se encuentra ubicada en 1972, cuando Stephen Hladky y Denis Haydon observaron fluctuaciones en la corriente eléctrica al introducir pequeñas cantidades de gramicidina en bicapas lipídicas artificiales [Hladky 1972] pero no fue hasta 1976 cuando Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron la técnica de *patch-clamp* [Neher 1976], que permitiría el estudio de canales aislados.

Originalmente, la técnica de *patch-clamp* consistía en succionar una pequeña porción de la membrana con una micropipeta y, mediante un electrodo introducido en ésta, registrar las propiedades eléctricas de los canales iónicos insertados en la membrana. En la figura 1.5 se ilustra esta técnica de medida más detalladamente.

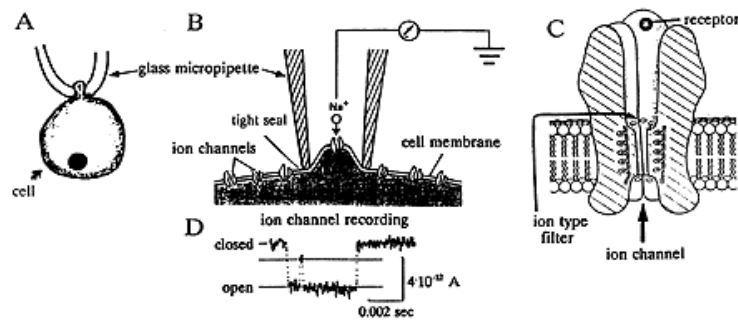


Fig. 1.5. Técnica de *patch-clamp* de Neher y Sackmann. (A) Una micropipeta de cristal en contacto con la membrana celular. (B) Caracterización de la corriente de un canal iónico mediante un amplificador eléctrico conectado al interior de la pipeta. (C) Ampliación de un canal iónico insertado en una membrana. (D) Registro de la corriente que pasa a través de un canal iónico. Fuente: [Neher 1976].

El desarrollo de la técnica de *patch-clamp* tuvo una gran repercusión científica ya que mediante esta técnica fue posible registrar por primera vez la corriente a través de un único canal proteico (del orden del picoAmperio) [Neher 1992b]. No es de



extrañar por lo tanto que, por esta importante contribución a la ciencia, Neher y Sakmann recibieran en 1991 el premio Nobel de Fisiología y Medicina.

Otro gran avance en el campo de los canales iónicos es la determinación de sus estructuras. El conocimiento de la estructura del canal es esencial para entender los mecanismos físicos y químicos responsables de su función en la célula [Braden 1999]. En 1982 se determinó por primera vez la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de un canal proteico, el canal receptor acetilcolina nicotínico [Noda 1982], tras la cual, sólo dos años más tarde, siguió la del canal de sodio regulado por voltaje [Noda 1984] y, a partir de entonces, la de muchos otros, mediante técnicas de clonado y secuenciación del ADN. Aunque a partir de la estructura primaria de la proteína nada se puede decir sobre la estructura tridimensional, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos permite realizar una clasificación de estas proteínas en base a sus similitudes no sólo respecto a sus propiedades funcionales, sino también a su composición. Además, a partir de un análisis de la estructura primaria es posible predecir qué secciones de la cadena polipeptídica atraviesan la bicapa lipídica en forma de hélices  $\alpha$  o formando láminas  $\beta$ , mediante un test de hidropatía [Eisenberg 1984].

La primera vez que se obtuvo una imagen tridimensional de un canal iónico fue mediante el microscopio electrónico. Para ello, los canales se congelaban en sus bicapas de lípido y se generaban imágenes electrónicas a diferentes ángulos y planos focales. Así se determinó la primera estructura tridimensional a baja resolución para los canales de uniones comunicantes (*gap junctions*) y para el receptor de acetilcolina [Hille 2001]. El inconveniente del uso de esta técnica es su baja resolución.

Actualmente, los métodos convencionales para obtener la estructura tridimensional de proteínas son la cristalografía de rayos X [Drenth 1999] y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) [Wagner 1990]. Para aplicar estas técnicas es necesario cristalizar una cierta cantidad de proteína. En el caso concreto de las proteínas transmembrana, el procedimiento de cristalización no resulta fácil porque estas proteínas requieren el entorno lipídico de una membrana para estabilizarse. Quizás por ello, la primera estructura de un canal iónico obtenida a alta resolución fue la de una proteína muy pequeña, el canal antibiótico gramicidina A, empleando espectroscopía RMN [Arseniev 1985]. Después de ella, se determinaron las primeras estructuras tridimensionales de otros canales iónicos

biológicos mediante difracción de rayos X a alta resolución. Entre ellos, los canales biológicos bacterianos fosfoporina y OmpF [Cowan 1992] y el canal de potasio KcsA [Doyle 1998].

Desde entonces, los avances en cristalografía han permitido obtener la estructura de una gran variedad de canales biológicos, disponibles todos ellos en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) [Protein Data Bank 2007].

### **Propiedades de transporte de los canales iónicos**

La forma en que se regula el transporte a través de los canales iónicos de la membrana le proporciona a cada tipo de célula una función concreta. Un ejemplo son las células nerviosas que a través de los canales iónicos son capaces de recibir, conducir y transmitir señales [Hille 2001].

A nivel individual, la regulación del transporte a través de un canal se refleja en una serie de propiedades generales de transporte que, gracias a la técnica de *patch-clamp*, es posible cuantificar. Estas propiedades son la selectividad, la conductancia y el *gating*.

#### Selectividad

El transporte de iones a través de un canal iónico está determinado por la difusión de los iones dado un gradiente de concentración y por la interacción de éstos con la proteína. Ambos factores contribuyen a que un tipo de iones sea favorecido frente a otro para cruzar el canal, propiedad que se conoce con el nombre de selectividad.

La selectividad es una medida del grado de discriminación iónica del canal. Éste depende sobre todo del tamaño del poro proteico. Un canal iónico estrecho (con un tamaño de diámetro del poro del orden de los  $\text{\AA}$ ) manifiesta generalmente una selectividad alta a una especie iónica en particular. Este es el caso, por ejemplo, de los canales de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , donde el transporte se lleva a cabo prácticamente de ión en ión. Estos canales se encuentran en membranas de células donde la proporción de nutrientes entre los lados extracelular y citoplásmico ha de estar controlada. Un canal iónico ancho (con tamaños del diámetro del orden de los

nanómetros) permite el paso de diversos iones y pequeños solutos sin una especificidad tan clara como la de los canales estrechos. Estos canales se encuentran en las membranas externas de bacterias, mitocondrias y cloroplastos y se conocen por el nombre de porinas [Alberts 1996].

Dado un gradiente de concentración, la selectividad de un canal iónico puede medirse experimentalmente. La técnica de *patch-clamp* permite aplicar el potencial eléctrico necesario entre los lados del canal para anular el flujo de corriente iónica que se genera. Este valor del potencial eléctrico se conoce como potencial de corriente cero o *reversal potential* (RP).

El RP proporciona una interpretación cuantitativa de la selectividad iónica de un canal en unas condiciones de gradiente de concentración dadas. Además, también proporciona una información cualitativa del sistema. El signo de esta magnitud indica si es favorecido el paso de cationes o de aniones a través del canal. Si el paso de cationes es preferente se dice que la selectividad es catiónica y si se observa justo lo contrario, se dice que la selectividad del canal es aniónica.

### Conductancia

La conductancia es un concepto eléctrico que proporciona información cuantitativa de la facilidad con la que un objeto conduce corriente. Es el concepto inverso de la resistencia eléctrica y suele calcularse mediante la expresión  $G = I/V$ . En el ámbito de los canales iónicos, esta magnitud es del orden del picoSiemens [Hille 2001].

A partir de las medidas de conductancia de un canal iónico se puede extraer información significativa sobre el canal. Por un lado, la comparación entre medidas de conductancia obtenidas en presencia de diferentes iones proporciona información sobre el grado de discriminación del canal a una especie iónica frente a otra [Gillespie 2002], lo que representa, en cierto modo, una medida de selectividad. Por otro lado, la diferencia entre la conductancia del canal medida a una u otra polaridad es un indicio de la asimetría estructural o eléctrica del poro proteico. Finalmente, la dependencia de la conductancia con la concentración puede proporcionar información de la existencia de procesos dependientes o cooperativos que pueden tener lugar en el interior del canal [Hille 2001].

### Gating

Como respuesta a un estímulo externo, los canales iónicos manifiestan cambios aleatorios en la corriente a intervalos cuantificados. Estos cambios se asocian generalmente con distintos estados del canal.

En algunos canales se observan tres estados de conducción iónica diferentes: un estado abierto o activo, un estado cerrado o en reposo y un estado inactivo. En el estado abierto se produce un flujo de corriente iónica a través de la proteína. En el estado cerrado, en cambio, no tiene lugar un transporte significativo de corriente, aunque el canal, en cualquier momento, puede ser activado. Finalmente, en el estado inactivo el canal no permite la activación y la corriente es prácticamente nula. La habilidad del canal para pasar de uno a otro estado se conoce como *gating*.

El *gating* de un canal iónico ejerce una influencia reguladora de la permeabilidad iónica bajo el efecto de un estímulo externo que puede ser eléctrico, mecánico, luminoso y químico [Alberts 1996, Hille 2001]. En ese contexto, los canales iónicos se pueden clasificar en canales regulados por voltaje, mecánicamente, por luz o por ligando (que puede ser un neurotransmisor, un ión o un nucleótido). Los canales regulados por voltaje presentan *gating* bajo la aplicación de un potencial eléctrico alto entre los lados del canal. En algunos de ellos el estado de inactivación puede ser provocado por una serie de cambios conformacionales de una región del canal orientada a la parte citoplásmica de la célula. Si se modifica esa región, la cinética del *gating* cambia y si se elimina, el *gating* no se produce. Es por ello que esta sección del canal se conoce con el nombre de sensor de voltaje [Armstrong 1992]. En los canales regulados por ligando el estado de inactivación del canal se produce por la exposición prolongada del receptor al ligando en el lado extracelular del poro [Hille 2001].

Prácticamente todo lo que se conoce sobre el *gating* proviene de las observaciones experimentales. Por ejemplo, muchos experimentos indican que canales iónicos homólogos pueden presentar distinta actividad *gating*. En la figura 1.6 se puede observar la manifestación de esta propiedad en un canal iónico selectivo al cloruro, el CFTR (siglas de su nombre en inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), extraído de dos especies diferentes.

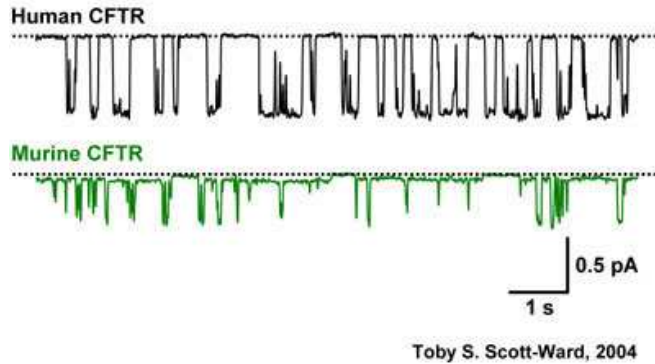


Fig. 1.6. *Gating* a -50 mV del canal CFTR extraído de dos especies diferentes cuando hay 147 mM de Cl<sup>-</sup> con 0,3 mM de ATP y 75 nM de PKA en el lado intracelular y 10 mM de Cl<sup>-</sup> en el lado extracelular. Temperatura: 37 °C. La línea de puntos indica el cierre del canal. Fuente: [Scott-ward 2004].

### Clasificación de los canales iónicos

La diversidad de los canales iónicos hace difícil una nomenclatura y una clasificación claras, puesto que todavía queda mucho por conocer sobre el transporte de iones a través de muchos de ellos.

Históricamente, la identificación de los canales iónicos mediante un nombre se imponía en función de su permeabilidad selectiva al ión. Los canales de sodio y potasio descubiertos por Hodgkin y Huxley son una prueba de ello [Hodgkin 1952a, Hodgkin 1955]. Pero algunos de los canales que se han ido descubriendo desde entonces no presentan una selectividad iónica marcada, por lo que su nomenclatura responde a otros criterios. Algunas porinas, por ejemplo, se nombran en función de su localización en la célula seguida por una letra del abecedario según se iban descubriendo, como los canales bacteriales OmpA, OmpB, OmpC, etc... de *Escherichia coli* [Koebnik 2000], acrónimos de *Outer membrane protein* y una letra del abecedario. Otros investigadores optan por nombrar los canales iónicos que van descubriendo en términos descriptivos como el canal de Na<sup>+</sup> sensible a la amilorida, los neurotransmisores (por ejemplo el receptor de glicina), o el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) [Hille 2001]. Lo ideal sería, por supuesto, nombrarlos de una manera sistemática, en función de su lugar

correspondiente dentro de una clasificación clara. Pero organizar los canales iónicos descubiertos hasta ahora de manera que los que vayan apareciendo se ajusten a un perfil determinado no es una tarea fácil. Una alternativa es diferenciarlos en función del estímulo que provoca la actividad *gating* del canal [Aidley 1996], como ya se ha apuntado en el apartado anterior. El conocimiento de la estructura molecular de algunos de ellos además permite hacer distinciones más finas. Por ejemplo, los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltaje presentan similitudes apreciables en sus secuencias de aminoácidos. Sin embargo, cada uno de estos tipos de canales presenta una gran diversidad estructural y funcional por haber sido codificados por diferentes genes, por haber sido expresados en diferentes tipos de células o en ciertos periodos de desarrollo y crecimiento de un organismo, lo que indica que todos ellos pertenecen a una gran superfamilia de proteínas relacionadas estructural y evolutivamente [Hille 2001]. En este contexto surge una nomenclatura que hace uso de un sistema de numeración para clasificar los canales de una misma familia, un criterio escogido por la IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) [International Union of Pharmacology 2009]. Por ejemplo, los canales de  $\text{K}^+$  de mamíferos regulados por voltaje ( $\text{K}_v1.1, 1.2, \dots, 8.1$ ) o los canales de  $\text{Na}^+$  cuya diversidad molecular se basa en la expresión de 9 subunidades  $\alpha$  diferentes en su estructura ( $\text{Na}_v1.1, 1.2, \dots, 1.9$ ). Evolutivamente, los canales de  $\text{K}^+$  se consideran los canales originarios de esta superfamilia puesto que son los más sencillos y se encuentran en organismos simples como levaduras y otros procariotas. A partir de ellos surgen los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que aparecen en protozoos más evolucionados, y los de  $\text{Na}^+$ , que se encuentran en organismos multicelulares [Armijo 1992].

### 1.1.3.- Porinas

Las porinas son canales iónicos que se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, de algunas bacterias Gram-positivas del grupo de Mycolata, de las mitocondrias y de los cloroplastos [Schirmer 1998]. A modo de ejemplo, en la figura 1.7 se representa una sección de la membrana de una bacteria Gram-negativa.

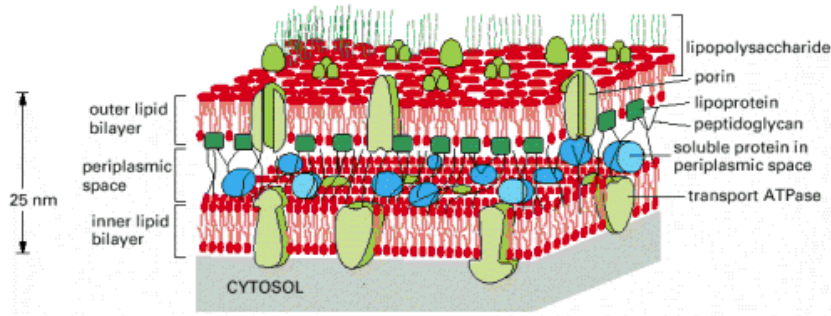


Fig. 1.7. Fragmento de una membrana de bacteria Gram-negativa. Fuente: [Alberts 1996].

Las porinas tienen un peso molecular entre 30.000 y 50.000 Da y sus cadenas polipeptídicas, de 300 a 420 aminoácidos, atraviesan la membrana múltiples veces formando barriles  $\beta$  de 16 o 18 láminas  $\beta$  antiparalelas. Los poros formados son anchos, con diámetros del orden del nanómetro, y permiten el paso de iones y metabolitos como azúcares y aminoácidos de gran peso molecular [Benz 1988, Cowan 1992, Cowan 1993, Nikaido 1993]. La pared de los poros acuosos de las porinas tiene un espesor de únicamente un aminoácido. Las láminas  $\beta$  están conectadas por pequeños bucles que giran en el lado citoplásmico y por bucles más grandes en el lado extracelular. En la figura 1.8 se muestra, a modo de ejemplo, la estructura de la maltoporina.

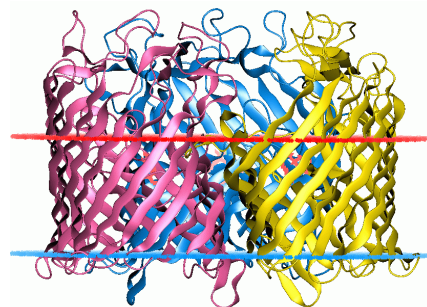


Fig. 1.8. Maltoporina. El lado de la proteína por encima de la línea roja corresponde al lado extracelular y por debajo de la línea azul al lado citoplásmico. Fuente: [Lomize 2005].

Generalmente, en todas las porinas existe un bucle particularmente importante que sobresale de la pared interna del poro bloqueando de forma parcial

cada monómero de la porina [Braden 1999]. El estrechamiento generado en el interior del canal por este bucle limita el tamaño del soluto que puede atravesarlo. Además, contiene residuos aminoácidos que le confieren un importante papel en la regulación del transporte a través del poro [Schirmer 1998]. Por todo ello, a esta región se la conoce en algunos trabajos como filtro de selectividad del canal [Benz 1985].

Las porinas pueden ser fuertemente selectivas a una especie iónica o a una molécula en particular. Estas porinas contienen generalmente un *binding site* para una o más sustancias (un lugar dentro de la proteína donde el soluto tiende a estabilizarse) que da lugar a esa alta especificidad. En cambio las porinas no específicas forman canales llenos de agua por donde se pueden llegar a transportar indistintamente diversas especies [Alberts 1996].

## 1.2.- El poro bacteriano OmpF

### 1.2.1.- Estructura del canal iónico OmpF

El canal iónico objeto de este estudio es una porina que se llama OmpF (acrónimo de su nombre en inglés *Outer membrane protein F*). Esta porina atraviesa la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli* [Delcour 2003, Nikaido 2003] formando un trímero, constituido por tres subunidades que son estructural y funcionalmente idénticas [Nestorovich 2002a, Rostovtseva 2002]. Su estructura cristalográfica, disponible en la base de datos PDB [Protein Data Bank 2007], se determinó en 1992 mediante difracción de rayos X con una resolución de 0,24 nm [Cowan 1995].

Cada monómero se pliega dentro de la membrana formando 16 láminas  $\beta$  antiparalelas y 3 hélices  $\alpha$ . En la figura 1.9 se muestran dos vistas diferentes del canal obtenidas con el programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) [VMD] a partir de su estructura cristalográfica.



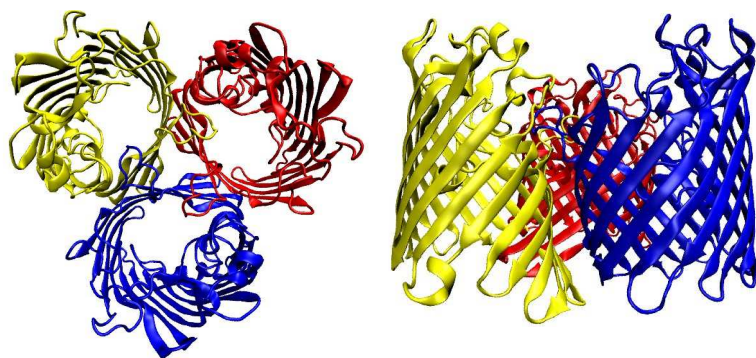


Fig. 1.9. Diferentes vistas del canal iónico OmpF en las que se distinguen por colores cada uno de los tres monómeros que lo constituyen. Las representaciones se han obtenido con el programa VMD.

La estructura cristalográfica de OmpF revela una geometría asimétrica con entradas relativamente anchas, de una sección transversal de unos 2,7 x 3,8 nm y unos 5 nm de longitud. Seis bucles que sobresalen de la pared interna del canal están expuestos hacia la zona interna del poro por donde pueden pasar solutos y moléculas de agua. El más largo es el bucle L3 y está situado aproximadamente a la mitad de la longitud del monómero. Este bucle sobresale de la pared del canal creando un estrechamiento de unos 0,7 x 1,1 nm de diámetro, lo que hace que la parte interna del poro tenga la forma de un reloj de arena, tal y como podemos apreciar en la representación de un monómero de OmpF lleno de agua en la figura 1.10.

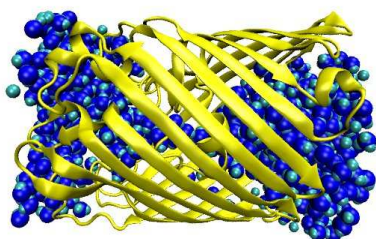


Fig. 1.10. Visualización de un monómero del canal OmpF con moléculas de agua en su interior.

Cada monómero del canal se compone de 340 residuos aminoácidos distribuidos heterogéneamente por toda su longitud, de los cuales 102 son ionizables [Karshikoff 1994, Alcaraz 2004, Varma 2004]. En la tabla 1.1 se muestran aquellos residuos del canal OmpF que por su localización concreta en la proteína son

accesibles a la disolución y tienen por ello un efecto importante sobre los iones [Alcaraz 2004].

<b>Lado citoplasmico</b>	D12	D221	E2	E48	E181	Y210	K10	K46	K89	K219	K305
<b>Estrechamiento</b>	D113	E117	Y40	Y102	Y106	K16	R42	R82	R132		
<b>Lado extracelular</b>	E29	Y22	Y32	K80	K243	R167	R168				
<b>Otros</b>	E296										

Tabla 1.1. Residuos ionizables de un monómero del canal OmpF accesibles al medio acuoso.

El canal OmpF permite el paso de iones y solutos pequeños neutros de hasta un peso molecular aproximado de 650 Da, como moléculas de agua, glucosa y otros nutrientes [Cowan 1995, Delcour 2003, Nikaido 2003]. El estrechamiento generado por el bucle L3 en cada monómero bloquea solutos y moléculas más grandes. En este bucle se hallan dos residuos ácidos (un aspartato (el D113) y un glutamato (el E117)) enfrentados a tres residuos básicos (tres argininas (R42, R82 y R132)) situadas en la pared opuesta al bucle. En la figura 1.11 se representa la disposición en el canal de esos residuos.

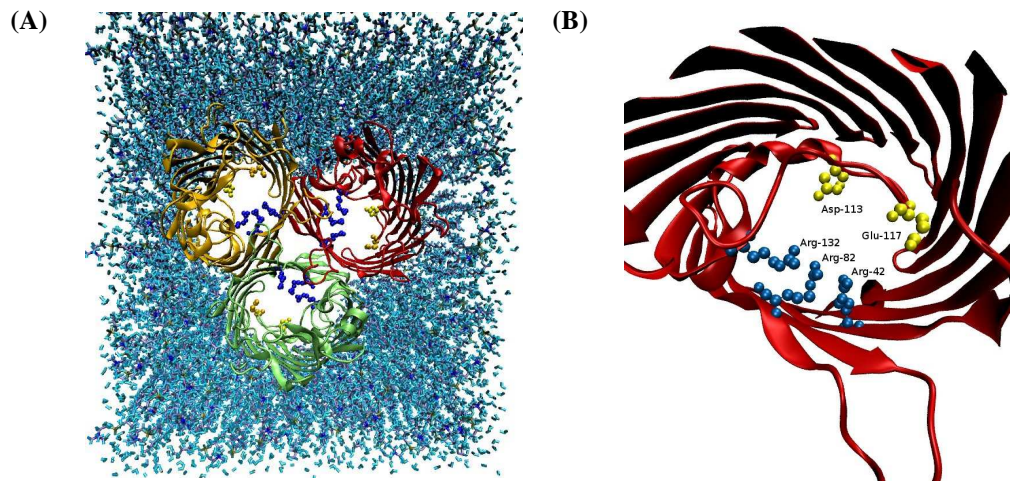


Fig. 1.11. (A) Canal OmpF insertado en una bicapa de lípido en el que aparecen los residuos ácidos (en amarillo) y básicos (en azul). (B) Ampliación del estrechamiento de un monómero del canal OmpF visto desde el exterior celular a lo largo del eje del poro.

Esta disposición de los residuos en el estrechamiento del canal da lugar a un campo eléctrico transversal lo bastante fuerte para orientar las moléculas de agua

[Karshikoff 1994, Tieleman 1998] e incluso para producir trayectorias iónicas diferentes para cationes y aniones, tal y como muestran resultados obtenidos a partir de simulaciones de dinámica molecular [Im 2002b] y de dinámica browniana [Schirmer 1998, Phale 2001].

### 1.2.2.- Propiedades de transporte a través del canal iónico OmpF

#### Selectividad

El canal OmpF se caracteriza por tener una ligera selectividad a cationes y casi ninguna especificidad iónica en disoluciones de iones monovalentes a  $pH$  neutro [Benz 1987, Nestorovich 2003, Nikaido 2003].

La selectividad del canal en KCl está casi totalmente determinada por los procesos de exclusión y acumulación electrostática generados por el canal (la difusión de los iones de la sal en disolución contribuye mínimamente). Las observaciones experimentales apuntan a que la carga es el origen principal de la selectividad [Alcaraz 2004]. Los experimentos variando el  $pH$  de la disolución [Nestorovich 2003, García-Giménez 2009a] y el cálculo electrostático del  $pK_a$  de los residuos del canal [Aguilella-Arzo 2007] así lo indican. No obstante, otros estudios sugieren la posibilidad de que exista un *binding site* de cationes en el canal [Benz 1978, Saint 1996, Suenaga 1998, López 2009], concretamente en las inmediaciones del residuo D113 [Danelon 2003].

Al contrario de lo que ocurre en disoluciones monovalentes a  $pH$  neutro, el canal OmpF manifiesta una selectividad aniónica en presencia de cationes divalentes [Miedema 2004, Miedema 2006, Vrouenraets 2006]. La difusión del electrolito divalente contribuye a la medida del RP de manera que puede cambiar la selectividad iónica del canal. La posible existencia de un *binding site* de cationes divalentes en el canal, avalada por la presencia de un catión  $Mg^{2+}$  en la estructura resuelta en 1M  $MgCl_2$  [Yamashita 2008], podría también contribuir a la medida del RP. Para determinar en qué medida ambos factores afectan a la selectividad del canal es necesario hacer un análisis detallado de las medidas de RP en disoluciones multivalentes [Alcaraz 2009]. Este es el objetivo de los capítulos 4 y 5 de esta memoria.

## Conductancia

La conductancia del canal iónico OmpF en 1M KCl a *pH* neutro es del orden del nanoSiemens [Schindler 1978], pero su valor depende de las condiciones concretas del experimento, influyendo factores como la concentración de sal y el *pH* [Nestorovich 2003, Alcaraz 2006]. Intuitivamente, tal y como apunta Bertil Hille, la conductancia de un poro ha de aumentar linealmente con la concentración [Hille 2001]. En el caso concreto del canal OmpF, la conductancia, efectivamente, aumenta a medida que se incrementa la concentración de la disolución [Danelon 2003]. Sin embargo, la divergencia de una dependencia lineal de la conductancia con la concentración es una cuestión que está todavía pendiente de ser analizada detalladamente y que puede dar indicios de una cierta cooperatividad entre diferentes procesos producidos en el interior del canal [Hille 2001].

La comparación entre medidas de conductancia en disoluciones de diversas sales proporciona información sobre la permeabilidad del canal a distintos iones [Gillespie 2002], de manera que pueden extraerse series de selectividad. Es de esta manera cómo, a partir de las medidas de conductancia en disoluciones de diferentes haluros alcalinos [Danelon 2003], se puede deducir una serie de selectividad en función de los distintos cationes monovalentes  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ . Si la serie de selectividad indica una permeabilidad preferente al catión con mayor coeficiente de difusión, el canal distingue los iones en función de sus movilidades. Una serie de selectividad diferente sugiere la presencia de *binding sites* en el canal [Eisenman 1962]. En particular, las medidas de la conductancia en disoluciones a distintas concentraciones en el rango de 0,01 M y 1 M sugieren que, efectivamente, es posible la presencia de interacciones específicas moderadas de la proteína con los distintos cationes monovalentes.

## Gating

El canal OmpF es un canal regulado por voltaje y, por lo tanto, presenta *gating* bajo la aplicación de un potencial elevado. La respuesta *gating* de este canal es el cierre parcial de su estructura trimérica y se manifiesta experimentalmente mediante una serie de saltos constantes en la corriente correspondientes al cierre de cada monómero del canal. En la figura 1.12 se puede observar este comportamiento al

aplicar un potencial eléctrico de  $-120$  mV a un canal OmpF aislado reconstituido en una bicapa de lípido artificial.

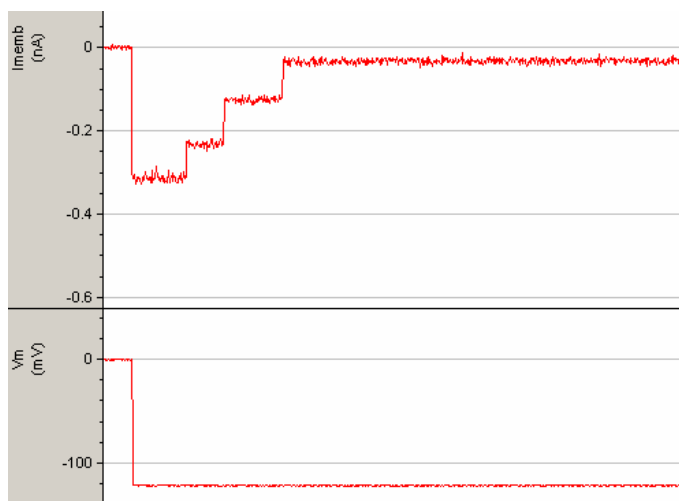


Fig. 1.12. La traza de corriente registrada al aplicar un potencial de  $-120$  mV entre los lados del canal OmpF en  $0,5$  M KCl, muestra el *gating* del canal.

En la práctica, esta propiedad del canal permite determinar el número de canales que se introducen en cada inserción a partir del número de saltos en la corriente producidos hasta que todos los canales insertados se encuentran en un estado cerrado o inactivo.

### Asimetría en la carga y la estructura del canal

La estructura cristalográfica del canal OmpF muestra una cierta asimetría estructural respecto a su longitud y una distribución de carga heterogénea a lo largo del poro. Esta asimetría se refleja en una rectificación de la corriente [Danelon 2003, Alcaraz 2004, Alcaraz 2006]. Las medidas de corriente rectifican en menos de un 1 % a una concentración 1 M de sal monovalente y hasta casi un 40 % a una concentración  $0,01$  M [Danelon 2003]. Estas medidas sugieren que el canal presenta una carga neta ligeramente asimétrica entre sus lados pues cuanto mayor es la concentración de sal, el efecto electrostático de dicha asimetría se anula. Asimismo, las medidas indican también que la asimetría estructural del canal tiene un efecto despreciable sobre la conducción iónica [Alcaraz 2004].

Los experimentos realizados bajo un gradiente de  $pH$  (distinto valor de  $pH$  en las disoluciones adyacentes al canal) muestran la gran sensibilidad de la carga del canal al  $pH$  de la disolución y cuán importantes son los efectos electrostáticos dentro del canal en disoluciones con iones monovalentes [Alcaraz 2006]. Poner en evidencia ambas circunstancias es el objetivo del capítulo 2 de esta memoria, donde se tratará de identificar las condiciones para las cuales el canal OmpF tiene un comportamiento similar al de un diodo bipolar.

En las medidas de selectividad, por otra parte, el efecto de la asimetría del canal es más notable. Los valores del RP difieren aproximadamente un 25 % de los medidos al cambiar el sentido del gradiente de concentración [Alcaraz 2004]. No obstante, en estos experimentos podrían muy bien entrar en juego factores como el apantallamiento electrostático de la carga eléctrica del canal por los iones de la disolución (más concentrada en un lado que en el otro). Experimentos realizados bajo un gradiente de  $pH$  muestran cómo una asimetría inducida en la carga del canal puede tener también un efecto crucial sobre su selectividad iónica [García-Giménez 2009a]. Este es el tema del capítulo 3 de esta memoria, en el cuál se elabora un detallado análisis de la selectividad del canal en las condiciones naturales del poro bacterial OmpF, un entorno en el que el medio extracelular y citoplásmico de la bacteria tienen distinto valor de  $pH$ .

### **Orientación del canal OmpF**

En el entorno celular, las porinas se orientan generalmente en un único sentido a través de la membrana. Esto sugiere que existe una cierta diferencia en la estructura y en la función de los dominios citoplásmico y extracelular de la proteína que determina la forma de inserción en la bicapa lipídica [Alberts 1996]. En el caso concreto del canal OmpF, se ha sugerido en alguna ocasión que el lado citoplásmico se introduce primero en la bicapa de lípido, dejando la parte extracelular en el lado de adición de la proteína [Im 2002b]. Sin embargo, hay muchos estudios que avalan la orientación contraria. Particularmente, experimentos realizados con colicina, una proteína con una fuerte afinidad al lado extracelular del canal OmpF, demuestran que la proteína se inserta en la bicapa a través de los bucles largos de la parte extracelular de la porina [Zakharov 2004].

## 1.3.- Procedimiento experimental para el estudio de canales iónicos en bicapas de lípido

### 1.3.1.- Montaje experimental

El procedimiento experimental empleado para realizar medidas de corriente y RP a través del canal iónico OmpF está basado en la metodología empleada por el grupo del Dr. Bezrukov [Bezrukov 1993]. Éste consiste en reconstituir el canal en una bicapa de lípido artificial. Para ello, se utiliza una celda dividida en dos partes, cada una de las cuales tiene una capacidad de aproximadamente 2 ml. Entre las dos partes se coloca, sellada con silicona, una lámina de teflón de 12 o 15  $\mu\text{m}$  de espesor a la que previamente se le ha realizado un orificio de entre unos 60-150  $\mu\text{m}$  de diámetro. En este agujero se formará la bicapa de lípido en la que posteriormente se reconstituirá el canal iónico. En la figura 1.13 se muestra una imagen esquemática del montaje y una foto de la celda.

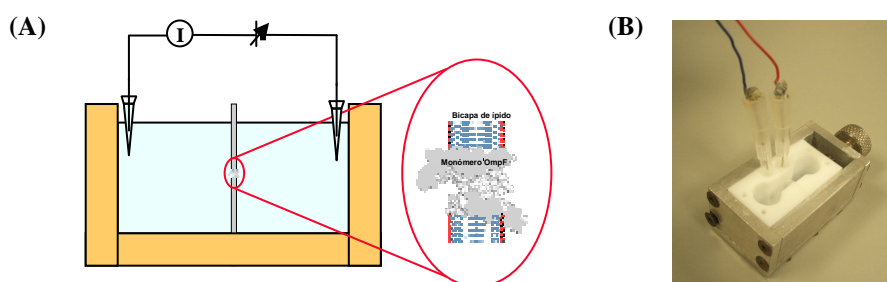


Fig. 1.13. (A) Reconstitución del canal iónico OmpF en una bicapa de lípido. (B) Celda de medida montada en el laboratorio.

### 1.3.2.- Preparación previa

#### Perforación del agujero en la lámina de teflón

La forma y las dimensiones del orificio de la lámina de teflón son decisivas en la formación de una bicapa lipídica estable. La formación del agujero en la lámina se realiza mediante una técnica que consiste en aproximar una punta de platino

incandescente de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro a la lámina de teflón hasta que se forme un agujero en su superficie. La formación del agujero puede visualizarse a través de un microscopio conectado a una cámara CCD (*Charge-Coupled Device*), tal y como se muestra en la figura 1.14.

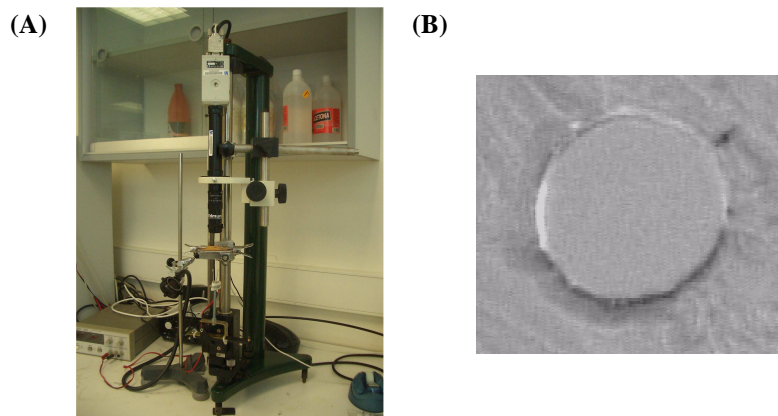


Fig. 1.14. (A) Dispositivo utilizado para perforar la lámina de teflón. (B) Ampliación de la imagen de un orificio de unos 60  $\mu\text{m}$  de diámetro realizado sobre una lámina de teflón.

### Elaboración de electrodos

La celda de medida se conecta a un amplificador de señal mediante unos electrodos que están en contacto con las disoluciones. Estos electrodos tienen que ser capaces de medir corrientes del orden de los picoAmperios con una precisión alta, y por lo tanto tienen que tener una baja capacidad eléctrica [Bockris 1970].

Algunos electrodos comerciales contienen materiales de vidrio o membranas porosas de gran capacidad eléctrica, lo que los hace inadecuados para el tipo de medidas que deseamos realizar. Por esta razón, los electrodos se elaboran en el laboratorio. Para ello, dos filamentos de plata de alta pureza (99,95 %), de 1 mm de diámetro y 2 cm de longitud, se conectan entre sí y se les somete a un proceso de electrolisis. Sumergidos en una disolución 0,1 M HCl y conectados al polo positivo de un generador de corriente, se les hace pasar una corriente de 5 mA/cm<sup>2</sup> durante unas 3 horas agitando suavemente para favorecer el depósito homogéneo de iones



cloruro sobre su superficie. El polo negativo del generador de corriente se coloca en un filamento de platino en contacto con la disolución.

El cloruro presente en la capa externa de los electrodos de Ag/AgCl es muy reactivo y extraordinariamente sensible a la concentración de cloruro de las disoluciones con las que tienen que permanecer en contacto en cada medida. Para evitar que se desgasten muy rápidamente se encapsulan en una disolución 2 M KCl en fase gel que actúa como puente salino. Para conseguir la fase gel del puente, se añade a la disolución un 1,5 % de agarosa y se calienta mientras se agita a una temperatura de 120 °C. Los electrodos elaborados de esta manera presentan una alta resolución (asimetría típica < 0,1 mV), son reversibles a las disoluciones de medida empleadas y carecen de elementos de gran capacidad eléctrica.

### **1.3.3.- Formación de la bicapa lipídica**

Para formar una bicapa de lípido estable en el orificio de la lámina de teflón se utiliza la técnica de Montal-Mueller [Mueller 1962, Montal 1972]. Tras depositar unos 10 µl de lípido disuelto en pentano en una pequeña cantidad de disolución en cada compartimento, esta técnica consiste en ir subiendo el nivel de la disolución de cada lado de la celda de manera que, al pasar por el agujero de la lámina de teflón, dos monocapas de lípido (una en cada lado) se ponen en contacto formando la bicapa. La naturaleza lipofóbica del teflón dificulta la formación de la bicapa de lípido sobre su superficie. Por eso, para facilitar la adherencia del lípido al teflón, el agujero se trata previamente con una disolución de un 1 % de hexadecano en pentano, que le confiere cierto carácter lipofílico.

El lípido utilizado en todos los experimentos reseñados en esta memoria es difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC), un lípido neutro que se presenta comercialmente en cloroformo [Avanti lipids 2009]. Es necesario extraer este disolvente orgánico mediante un proceso de evaporación (con la ayuda de la acción de un gas inerte como el argón) para posteriormente diluirlo en pentano (en una proporción de 5 mg/ml), un disolvente lo suficientemente volátil para que no interfiera en la función del lípido y menos tóxico que el cloroformo.

Después de introducir el lípido disuelto en pentano en las disoluciones y antes de iniciar el proceso de formación de la bicapa, se espera un tiempo prudencial de unos 10 minutos para dar lugar a la completa evaporación del pentano.

#### **1.3.4.- Inserción de la proteína**

Una vez se ha formado la bicapa de lípido se añade en uno de los compartimentos de la celda entre 0,1-0,3  $\mu$ l de una disolución 1 M KCl en la que hay 1  $\mu$ g/ml de proteína OmpF y 1 % (v/v) de un detergente (*Octyl POE*). La proteína utilizada en este trabajo es OmpF aislada y purificada de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* y ha sido proporcionada por el Dr. Mathias Winterhalter. En los experimentos realizados para este trabajo la proteína se añade siempre en el lado de la celda más cerca del experimentador, denominado lado *cis*. Al otro lado de la celda se le denomina lado *trans* y se conecta eléctricamente a tierra en los experimentos de esta memoria. La temperatura puede influir considerablemente sobre los elementos del sistema [Chimerel 2008], por lo que ésta se mantiene siempre a  $(23 \pm 1)$  °C.

#### **1.3.5.- Dispositivo de medida: adquisición y tratamiento de los datos experimentales**

El equipo de medida consta de un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) de alta resolución que, en modo de *voltage-clamp*, una vez el canal iónico está reconstituido en una bicapa de lípido, permite aplicar un potencial y medir la corriente que pasa a través de él. La figura 1.15A muestra una imagen del amplificador usado en el laboratorio, con el cual se obtienen medidas de corriente, conductancia y RP. El RP del canal se determina a partir de la medida del potencial eléctrico que anula la corriente generada en condiciones en las que existe un gradiente de concentración iónica [Neher 1976]. Este potencial contiene dos contribuciones diferenciadas: una es el RP y otra es el potencial de unión líquida total generado en las interfases de las disoluciones y los puentes salinos de los electrodos [Barry 1970, Bockris 1970, Barry 1991, Neher 1992a, Barry 1994]. Esta última contribución se introduce en la medida como consecuencia del protocolo experimental utilizado y no aporta información alguna sobre el transporte iónico a través del canal, por lo que ha de sustraerse del potencial experimental medido. Para mostrar la repercusión del

potencial de unión líquida en la realización de medidas de RP, se incluye como apéndice 1 de esta memoria un detallado estudio de su influencia sobre las medidas de selectividad del canal OmpF.

Los datos atraviesan un filtro pasa-baja a 15 kHz que elimina el ruido de alta frecuencia característico del cableado del propio sistema. Estos datos se graban directamente en el disco duro del ordenador con una frecuencia de muestreo de 50 kHz. Para aislar la celda de medida de señales de ruido externas, ésta se introduce en una jaula de Faraday de doble apantallamiento. En la figura 1.15B se muestra la foto de la jaula de Faraday utilizada en el laboratorio. Dicha jaula se sitúa sobre un soporte antivibratorio que minimiza las oscilaciones mecánicas de la celda, tal y como se puede apreciar en la figura 1.15C.

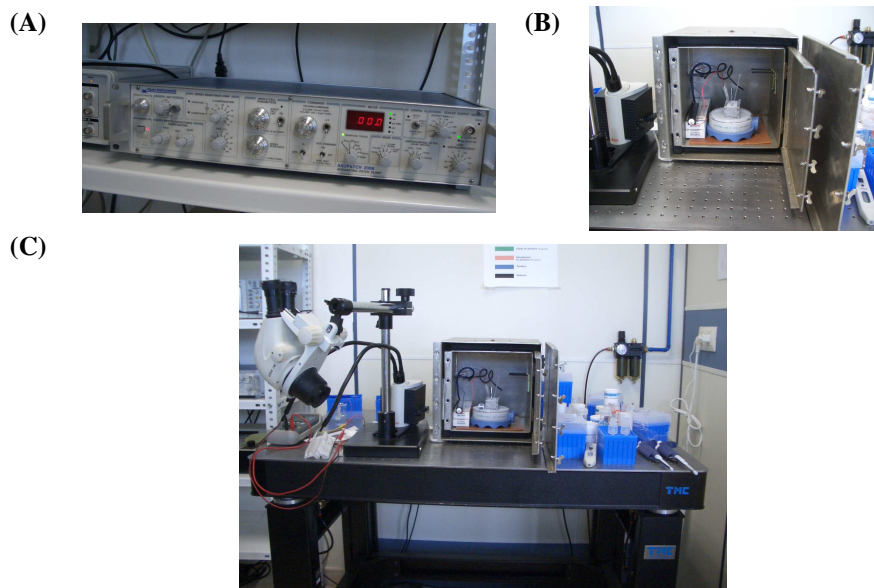


Fig. 1.15. (A) Axopatch 200B (Axon Instruments). (B) Jaula de Faraday de doble apantallamiento. (C) Mesa de aire antivibraciones.

El equipo cuenta con un Digidata Axon 1322A, que digitaliza la señal analógica recibida del amplificador y permite su almacenamiento para un análisis posterior. El software especializado Clampex 10 [Molecular Devices Corporation 2009] permite el tratamiento digital de los datos experimentales y el análisis estadísticos de la señal, desde la realización de histogramas para conocer cuáles son

las unidades elementales de la conductancia, hasta el tratamiento de series temporales mediante transformadas de Fourier.

## 1.4.- Modelos de transporte iónico a través de canales

### 1.4.1.- Introducción a la modelización de canales iónicos

Las técnicas de reconstitución de canales iónicos sobre bicapas de lípido proporcionan información de las propiedades macroscópicas del canal (curvas I-V, conductancia, RP) pero no aportan información directa sobre los mecanismos que regulan el transporte iónico. Es necesario el uso de modelos para establecer una relación entre la función del canal y sus propiedades microscópicas. En ese sentido, conocer la estructura atómica del canal supone una ventaja. A partir de ella, es posible determinar las interacciones más relevantes que actúan sobre los iones, identificar los residuos con una mayor influencia sobre el transporte iónico y describir las interacciones específicas que puedan tener lugar entre los iones y los residuos del canal. Para ello, existen diferentes modelos que utilizan la información estructural de la proteína para tener en cuenta tales interacciones [Eisenberg 1996b, Eisenberg 1999]. Dichos modelos se distinguen por tener un mayor o menor grado de detalle microscópico, pero su objetivo es el mismo: reproducir datos experimentales y predecir el comportamiento del canal en función de diferentes variables físicas. Las ventajas de unos se imponen a las de los otros dependiendo de las magnitudes que se deseen estudiar o de si son tendencias o valores lo que se pretende predecir.

Las simulaciones de dinámica molecular son los modelos de canales iónicos con un mayor nivel de detalle estructural. Permiten simular a escala microscópica los procesos físicos que tienen lugar en el interior de un canal proteico teniendo en cuenta las interacciones entre los átomos del canal y los iones. Sin embargo, la simulación del elevado número de átomos e iones que constituye el sistema requiere una gran potencia computacional y tiempos muy largos de cálculo. Para reducir esas limitaciones se pueden hacer determinadas simplificaciones del modelo. En ese contexto, surgen las simulaciones de dinámica browniana en las que la proteína y el agua se consideran medios con una permitividad eléctrica constante [Corry 2002].

En un nivel de detalle microscópico mucho menor que las simulaciones, los modelos electrostáticos continuos resultan ser apropiados para predecir órdenes de magnitud y tendencias cualitativas en canales iónicos anchos. Estos modelos aparecen como una alternativa a la complejidad de cálculo de las simulaciones.

A continuación se describirán brevemente los fundamentos físicos en los que se basan las herramientas teóricas descritas a lo largo de esta introducción.

### 1.4.2.- Simulaciones de dinámica molecular y de dinámica browniana

#### Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular tratan explícitamente todos los átomos del sistema. Para canales iónicos, esto implica simular el movimiento de todos los átomos del lípido y la proteína, las moléculas de agua y los iones. Para ello, se calculan las trayectorias de cada partícula del sistema mediante la segunda ley de Newton del movimiento, que viene dada por la expresión 1.1.

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i \quad (1.1)$$

donde  $m_i$  y  $\vec{r}_i$  son la masa y la posición de la partícula  $i$  y  $\vec{F}_i$  es la fuerza experimentada por la partícula.

La posición de las partículas a lo largo del tiempo se calcula mediante el algoritmo de Verlet [Verlet 1967], conocidas las posiciones de las partículas en un instante de tiempo,  $t$  y en un instante de tiempo anterior,  $t - \Delta t$ . El algoritmo de Verlet viene dado por la ecuación 1.2.

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \Delta t^2 \quad (1.2)$$

Las ecuaciones 1.1 y 1.2 se iteran a intervalos de tiempo determinados hasta obtener una serie de trayectorias. Las fuerzas en esos intervalos temporales se consideran constantes y, por lo tanto, han de ser muy cortos. Como el movimiento

rotacional del agua es muy rápido, suelen usarse pasos de tiempo del orden del femtosegundo.

El análisis de las trayectorias obtenidas mediante las simulaciones de dinámica molecular permite determinar magnitudes tales como la energía libre de los iones, el desplazamiento cuadrático medio, la distribución iónica radial y otras funciones de correlación. Asimismo, también se pueden estimar algunos parámetros macroscópicos del sistema, como los coeficientes de difusión de los iones al cruzar el canal y la permitividad eléctrica del agua dentro de la proteína. Algunos estudios realizados en canales iónicos estrechos sugieren que tanto la permitividad eléctrica como los coeficientes de difusión de los iones [Smith 1999, Allen 2000, Roux 2004] son considerablemente más bajos dentro del poro que en disolución libre.

La determinación de la corriente y la selectividad del canal iónico es, sin embargo, una tarea difícil de realizar mediante estas simulaciones, dado el enorme potencial de cálculo que se requiere para ello. Por ejemplo, un ión puede tardar en cruzar un canal iónico estrecho como la gramicidina hasta unos 10 ns en condiciones fisiológicas. Para obtener una medida fiable de corriente iónica en ese caso, necesitaríamos simular el movimiento de las partículas durante 1  $\mu$ s [Crozier 2001]. Eso supone muchos meses de cálculo computacional con los recursos informáticos actuales. Aunque los iones tardan menos tiempo en cruzar otros canales iónicos y porinas, los tiempos de cálculo necesarios son todavía demasiado elevados. Afortunadamente, gracias a la rápida evolución de la informática, éstos se van reduciendo considerablemente [Aksimentiev 2005] y la posibilidad de obtener mucha más información a partir de ellas en el futuro se va incrementando día a día.

El RP de un canal tampoco es fácil de obtener mediante estos métodos de cálculo. Sin embargo, es posible determinar en canales iónicos estrechos series de selectividad de iones mediante el cálculo de perturbaciones de energía libre. Para ello se estima la diferencia de energía libre al transformar un tipo de ión en una posición determinada dentro del canal en otro tipo de ión. La especie iónica con menor energía libre es más probable que cruce el canal [Allen 2000].

A pesar de su complejidad de cálculo, las simulaciones de dinámica molecular son una herramienta interesante para estudiar la dinámica implicada en el transporte iónico en canales iónicos. De hecho, se han aplicado con éxito a una variedad de canales, entre los que se incluye la porina OmpF [Im 2002b, Pezeshki

2009]. Las trayectorias de los iones calculadas mediante estos métodos pueden ser incluso observadas de manera gráfica mediante programas de visualización especializados, como el VMD [VMD]. Además, la simulación de dinámica molecular es una herramienta accesible a los investigadores gracias a paquetes informáticos desarrollados especialmente para aplicar este tipo de técnicas. Entre ellos, cabe destacar los paquetes AMBER [Weiner 1984], CHARMM [Brooks 1983], GROMACS [Lindahl 2001] y NAMD [Phillips 2005].

### Simulaciones de dinámica browniana

Las simulaciones de dinámica browniana son un método de cálculo en el que se tratan discretamente los iones de la disolución durante cortos periodos de tiempo en un entorno continuo (en canales iónicos, la proteína y el agua se representan como medios dieléctricos continuos). El modelo parte de una situación inicial en la que los iones tienen una posición y una velocidad térmica. Las fuerzas que actúan sobre los iones se calculan entonces mediante la ecuación 1.3, llamada ecuación de Langevin [Reif 1965].

$$m_i \frac{d\vec{v}_i}{dt} = -m_i \gamma_i \vec{v}_i + \vec{F}_R(t) + q_i \vec{E}_i + \vec{F}_S \quad (1.3)$$

donde  $m_i$ ,  $q_i$ ,  $v_i$  y  $\gamma_i$  son la masa, la carga, la velocidad y el coeficiente de fricción del ión  $i$ , respectivamente.

El primer término de la ecuación 1.3 representa la fuerza de fricción de los iones en el disolvente. El segundo término, dado por  $\vec{F}_R(t)$ , representa las fuerzas producidas por colisiones aleatorias. Este término se introduce en la ecuación para simular el movimiento browniano de los iones y, así, el efecto del agua de la disolución. Estas fuerzas están relacionadas con las de fricción mediante el teorema de disipación-fluctuación [Zwanzig 2001]. La fuerza eléctrica total que actúa sobre el ión  $i$  viene dada por el tercer término de la ecuación, donde  $\vec{E}_i$  es el campo eléctrico. Finalmente,  $\vec{F}_S$  representa otras fuerzas de corto alcance que simulan las interacciones entre iones y entre iones y proteína.

La simulación de dinámica browniana consiste en iterar la ecuación de Langevin en pasos de tiempo determinados y calcular la posición del ión en cada

paso hasta obtener una trayectoria. A partir del análisis de las trayectorias de todos los iones puede determinarse la concentración promedio de los iones a lo largo del poro. Esto proporciona información de los posibles *binding sites* en ciertas regiones de la proteína y del número medio de iones que pasan a través del canal. La corriente iónica es, por lo tanto, una magnitud que puede predecirse mediante esta técnica.

Las simulaciones de dinámica browniana tienen una serie de limitaciones como consecuencia de las aproximaciones del modelo. Por una parte, la permitividad eléctrica considerada para la proteína y el agua son parámetros libres que han de ser determinados mediante otro tipo de teorías o a partir de las medidas experimentales. Por otra parte, al suponer constante la permitividad eléctrica de la proteína, las simulaciones no consideran una posible flexibilidad al paso de los iones. Finalmente, al considerar el agua como un continuo, las restricciones en cuanto a la polarización de las moléculas de agua en la interfase entre la proteína y la disolución no se tienen en cuenta. Esto puede ser un problema a la hora de intentar predecir magnitudes relacionadas con la selectividad del canal, ya que, probablemente, éstas están relacionadas con este tipo de interacciones entre los iones, el agua y las paredes del canal.

La primera aplicación de las simulaciones de dinámica browniana a canales iónicos se hizo en una dimensión para el canal de la gramicidina A [Chiu 1989]. A partir de entonces se ha aplicado en tres dimensiones a otros canales [Chung 1998, Li 1998] entre los que se incluyen algunas porinas [Schirmer 1999, Im 2000, Phale 2001].

### **1.4.3.- Modelos continuos.**

#### **Formalismo Poisson-Nernst-Planck**

El formalismo Poisson-Nernst-Planck o PNP es un modelo continuo electrostático que se utiliza para caracterizar el transporte de iones a través de membranas. Este modelo considera la proteína como un medio continuo y consta de un sistema de ecuaciones diferenciales acopladas. Por una parte, la ecuación de Nernst-Planck proporciona el valor de la densidad de flujo de corriente iónica debido



a un gradiente de concentración y a un gradiente de potencial eléctrico. Su expresión viene dada por la ecuación 1.4.

$$\vec{J}_i(\vec{r}) = -D_i \left[ \nabla c_i(\vec{r}) + \frac{F}{RT} z_i c_i(\vec{r}) \nabla V(\vec{r}) \right] \quad (1.4)$$

donde  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura absoluta en el sistema,  $D_i$  es el coeficiente de difusión del ión  $i$ ,  $c_i$  es la concentración iónica,  $z_i$  es la valencia del ión  $i$  y  $V$  es el potencial eléctrico ejercido sobre los iones [Lakshminarayanaiah 1984].

Por otra parte, para calcular el valor del potencial eléctrico generado a lo largo del canal se utiliza la ecuación de Poisson, que viene dada por la expresión 1.5.

$$\nabla^2 V(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon} \left( \rho_{fija}(\vec{r}) + F \sum_i z_i c_i(\vec{r}) \right) \quad (1.5)$$

donde  $\epsilon$  es la permitividad eléctrica (con un valor distinto en la proteína y en la disolución).

El formalismo PNP describe los procesos físicos del transporte de iones en disoluciones con electrolitos [Bockris 1970] y ha sido aplicado con cierto éxito en sistemas de membranas sintéticas y nanoporos sintéticos [Chen 1997, B. Eisenberg 2000, Ramírez 2003a]. Por una parte, la ecuación de Nernst-Planck es una expresión fenomenológica que refleja la contribución de dos efectos importantes de la electrodifusión iónica: la difusión y la migración iónica. Por otra parte, la ecuación de Poisson proporciona información del potencial eléctrico a lo largo del canal considerando la influencia de la concentración iónica. Su aplicación a espacios confinados, como es el caso de los poros o los canales iónicos, ha sido un tema ampliamente debatido en lo referente a si es válido usar concentraciones promedio dentro del canal o si es necesario tener en cuenta el comportamiento discreto de los iones dentro del canal [Corry 2000]. En ese sentido, cuanto menor es el tamaño del poro, el carácter individual de los iones adquiere mayor significado y, por lo tanto, no es adecuado asociar su comportamiento al promedio de las concentraciones iónicas. En poros y canales anchos, sin embargo, su uso está más justificado. De hecho, el modelo proporciona valiosa información sobre el papel de las interacciones

electrostáticas en el transporte iónico de algunos canales [Kato 1995, Eisenberg 1996a, Kurnikova 1999, Hille 2001].

### **Aproximaciones del modelo PNP**

El uso del formalismo PNP para caracterizar un canal iónico proporciona información interesante sobre el mecanismo mediante el cual el canal conduce iones en función de un gradiente de potencial eléctrico y de un gradiente de concentración. Para ello, el modelo tiene en cuenta aspectos físicos del canal tales como su forma y la carga de los átomos que componen su estructura tridimensional aunque se puede adaptar a una dimensión usando la información del promedio axial del potencial que ejerce cada sección transversal de la proteína [Chen 1997]. De hecho, el modelo PNP en una dimensión ha resultado muy útil para interpretar algunos resultados experimentales de la porina OmpF [Aguilella-Arzo 2007]. Sin embargo, el formalismo PNP no proporciona una ecuación analítica que permita calcular de forma directa magnitudes macroscópicas del sistema sin antes realizar algunas aproximaciones. A continuación se describen las dos aproximaciones del modelo más relevantes en el campo de los canales iónicos: la aproximación de Goldman o de campo constante y la aproximación de electroneutralidad local.

#### Aproximación de Goldman

La aproximación de Goldman supone que el campo eléctrico dentro de un canal es constante. Considerando la situación de estado estacionario para el flujo iónico e introduciendo esta aproximación en la ecuación 1.4 se obtiene la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) [Goldman 1944, Hodgkin 1949, Mafé 1986, Pellicer 1986]. Para un electrolito cuyos componentes iónicos tienen la misma valencia,  $z$ , la ecuación GHK en función de las permeabilidades del canal a los cationes y aniones de la disolución,  $P_+$  y  $P_-$  respectivamente, tiene la forma de la ecuación 1.6 [Lakshminarayanaiah 1984]:

$$V_{cis} - V_{trans} = -\frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{P_+ c_{cis} + P_- c_{trans}}{P_+ c_{trans} + P_- c_{cis}} \right) \quad (1.6)$$

En el ámbito de los canales iónicos el uso de la ecuación GHK para cuantificar la selectividad iónica del canal es habitual. Para ello, esta ecuación se suele expresar como muestra la ecuación 1.7, que proporciona la relativa permeabilidad del canal a los distintos iones en función del RP experimental ( $V_{cis}-V_{trans}$ ).

$$\frac{P_+}{P_-} = \frac{1 - re^{\left(\frac{-zF}{RT}RP\right)}}{e^{\left(\frac{-zF}{RT}RP\right)} - r} \quad (1.7)$$

donde  $r = c_{cis}/c_{trans}$ .

El valor de  $P_+/P_-$  es una medida cualitativa de la selectividad del poro. Si  $P_+/P_- > 1$ , el catión es más permeable que el anión y se dice que el canal es selectivo a cationes. Si  $P_+/P_- < 1$ , el anión es más permeable que el catión y se dice que el canal es selectivo a aniones.

### Aproximación de electroneutralidad

La aproximación de electroneutralidad supone que el interior del canal ha de ser eléctricamente neutro, con lo que se cumple la condición dada por la ecuación 1.8.

$$F \sum_i z_i c_i(\vec{r}) + \rho_{fija}(\vec{r}) = 0 \quad (1.8)$$

donde  $\rho_{fija}(\vec{r})$  es la densidad de carga fija del entorno proteico, y la expresión  $F \sum_i z_i c_i(\vec{r})$  es la densidad de carga debida a los iones en movimiento.

Si se introduce la condición dada por la ecuación 1.8 en la ecuación 1.4 se obtiene la ecuación de la difusión de Planck, que, para un electrolito  $z_+:z_-$ , tiene la expresión de la ecuación 1.9.

$$V_{cis} - V_{trans} = -\frac{RT}{F} \frac{D_+ - D_-}{z_+ D_+ - z_- D_-} \ln \left( \frac{c_{cis}}{c_{trans}} \right) \quad (1.9)$$

donde  $V_{cis}-V_{trans}$  es el RP.

La ecuación de Planck proporciona la diferencia de potencial eléctrico que aparece como consecuencia de la separación de carga generada al moverse los iones del electrolito con movilidades distintas. Este potencial trata de frenar el ión más rápido y acelerar el más lento para alcanzar el equilibrio [Helfferich 1962b, Bockris 1970, Hille 2001].

## Capítulo 2

---

# **Regulación electrostática de la corriente del canal iónico OmpF mediante el *pH***



## 2.1.- Introducción

El papel predominante de las interacciones electrostáticas en el transporte de iones monovalentes a través del canal iónico OmpF se manifiesta en una amplia variedad de experimentos [Schirmer 1998, Phale 2001, Nestorovich 2002b, Danelon 2003, Alcaraz 2004]. Entre ellos, los que muestran la influencia del *pH* sobre el RP y la conductancia son quizás los más reveladores [Nestorovich 2002b, Alcaraz 2004, Alcaraz 2006, Aguilera-Arzo 2007]. Las medidas del RP en KCl indican que la selectividad del canal a *pH* neutro y básico es catiónica y a *pH* ácido es aniónica [Alcaraz 2004]. Tal dependencia con el *pH* muestra una cierta correspondencia con la carga total de la proteína calculada mediante teorías continuas electroestáticas en función del *pH* [Aguilera-Arzo 2007]. Ésta resulta ser negativa a *pH* neutro y básico, y positiva a *pH* ácido. Esta correlación demuestra que la carga del canal y, por lo tanto, las interacciones electrostáticas entre ésta y los iones, son la principal causa del transporte iónico en el canal OmpF [Alcaraz 2009].

Respecto a las medidas de conductancia, se distinguen tres regímenes característicos en función del *pH*: en un rango de *pH* de 4 a 10, la conductancia del canal se mantiene constante, a valores altos de *pH* (de *pH* 10 a 12) la conductancia aumenta ligeramente con el *pH* y a valores bajos de *pH* (de *pH* 4 a 1) la conductancia se reduce drásticamente al disminuir el *pH* [Nestorovich 2003]. Una primera hipótesis para explicar esa dependencia es un posible cambio de tamaño del poro tras producirse la protonación o deprotonación de algunos residuos ionizables del canal [Todt 1992a, Todt 1992b]. Sin embargo, experimentos en los que se estudia el transporte de polímeros neutros polyethyleneglycol (PEG) de distinto peso molecular a través del canal OmpF [Rostovtseva 2002] indican que la variación del *pH* no afecta drásticamente el tamaño del poro [Nestorovich 2003]. Descartada esa posibilidad, el origen de la variación de la conductancia con el *pH* puede deberse a un cambio del perfil de potencial eléctrico a lo largo del canal como consecuencia de la modificación del estado de carga de sus residuos ionizables por efecto del *pH*.

De estos experimentos se pueden extraer dos conclusiones. En primer lugar, a gradientes moderados de concentración, las interacciones electrostáticas entre los residuos ionizables y los iones de la disolución regulan el transporte a través del canal OmpF y, en segundo lugar, el efecto del *pH* parece ser únicamente cambiar el estado de carga de los residuos ionizables del canal. Suponiendo que el transporte

iónico a través del canal OmpF responde a estas premisas, se analizan los experimentos expuestos en este capítulo. El objetivo de este capítulo es explorar las propiedades del canal OmpF mediante la manipulación del  $pH$  de las disoluciones adyacentes para confirmar las hipótesis de partida y estudiar el comportamiento del canal en su medio natural, donde el  $pH$  es diferente en los lados extracelular e intracelular de la bacteria [Alcaraz 2006].

## 2.2.- Regulación de la carga del canal mediante el $pH$

Las curvas I-V de un canal proporcionan información cualitativa de su asimetría, bien sea estructural o bien sea respecto a la distribución de la carga fija, en función del grado de rectificación de las curvas. Una curva I-V lineal significa que el valor absoluto de la corriente no depende de la polaridad aplicada sino únicamente de la magnitud del potencial aplicado. Esto es propio de un sistema simétrico. Al contrario, una curva I-V rectificadora indica que la corriente depende de la polaridad del canal y, por lo tanto, una parte del canal influye sobre los iones de una forma diferente a la otra parte. Tal comportamiento es propio de un sistema asimétrico.

La ligera asimetría estructural del canal OmpF tiene un efecto insignificante sobre la corriente a  $pH$  neutro [Alcaraz 2004]. Para comprobar si esta característica depende del estado de ionización de los residuos del canal, se realizan medidas de curvas I-V en 0,1 M KCl a tres valores diferentes de  $pH$  ( $pH$  3, 7 y 12). Para ello, se preparan las disoluciones 0,1 M KCl con aproximadamente 5 mM de buffer para mantener constante el  $pH$ .

Una vez preparadas, las disoluciones tienen un valor del  $pH$  de aproximadamente 5,5, por lo que es necesario ajustarlo. La disolución a  $pH$  3 se consigue añadiendo una pequeña cantidad de 0,1 M HCl y las disoluciones a  $pH$  7 y 12 añadiendo pequeñas cantidades de 0,1 M KOH. En todos los casos, el valor del  $pH$  se controla mediante un pH-metro. El buffer usado en cada caso es CAPS para mantener el  $pH$  básico, HEPES para mantener el  $pH$  neutro y MES para mantener el  $pH$  ácido. La figura 2.1 contiene las tres curvas I-V obtenidas.



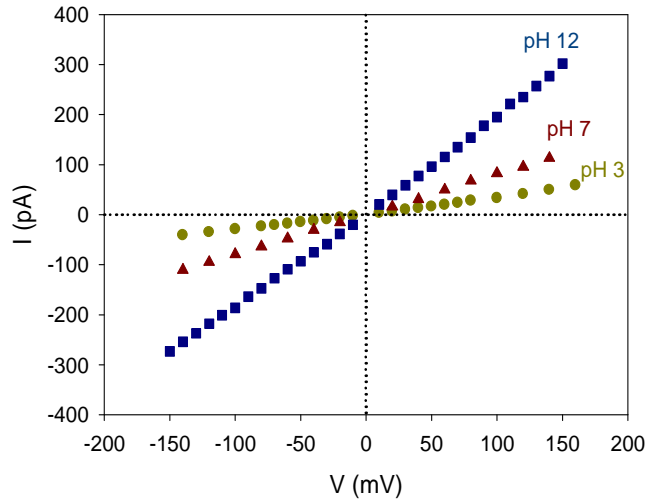


Fig. 2.1. Curvas I-V del canal OmpF en 0,1 M KCl a  $pH$  3, 7 y 12.

Independientemente del  $pH$  de la disolución, el efecto de la leve asimetría estructural del canal sobre la corriente es insignificante ya que, como vemos en la figura 2.1, las curvas I-V obtenidas son prácticamente lineales. Esto indica que hay un cierto balance entre residuos ácidos y básicos a ambos lados del canal, de manera que tras los procesos de protonación o deprotonación a los que son sometidos en medios ácidos o básicos, la carga fija está homogéneamente distribuida a lo largo del canal con independencia de la acidez o alcalinidad del medio.

Comparando las curvas I-V de la figura 2.1 se deduce también que la conductancia del canal crece con el valor del  $pH$  del medio. Estos resultados coinciden con los previamente obtenidos en otros trabajos, donde la dependencia de la conductancia con el  $pH$  se explica como consecuencia de la alteración de la carga fija de la proteína por el efecto del  $pH$  (como consecuencia de los procesos de protonación o deprotonación de algunos residuos ionizables de la proteína) [Nestorovich 2003]. Para comprobar esta hipótesis, se realizan medidas de curvas I-V bajo un gradiente de  $pH$  (un  $pH$  distinto a cada lado del canal). El objetivo es exponer los residuos ionizables de cada uno de los lados del canal a un  $pH$  distinto para alterar sus estados de carga de una forma diferente. La figura 2.2 muestra las curvas I-V medidas en 0,1 M KCl en distintas condiciones asimétricas de  $pH$ .

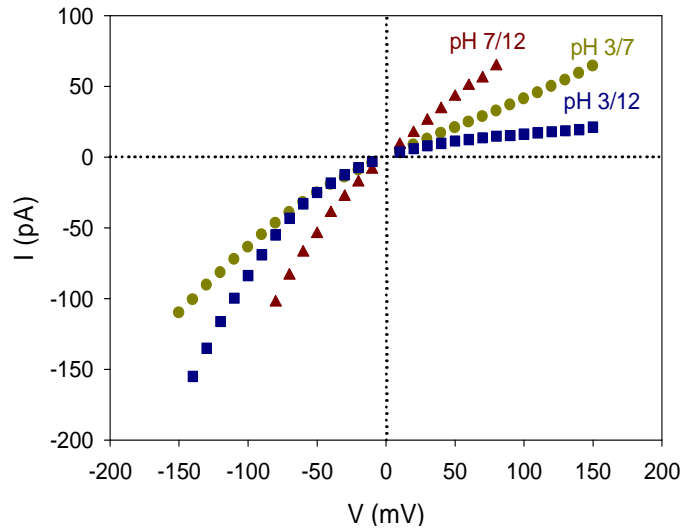


Fig. 2.2. Curvas I-V del canal OmpF en 0,1 M KCl en condiciones asimétricas de  $pH$ . El convenio empleado para señalar el  $pH$  en cada disolución es  $pH_{cis}/pH_{trans}$ .

La rectificación de las curvas I-V de la figura 2.2 sugiere, en primer lugar, que existe una cierta asimetría a lo largo del canal cuando el  $pH$  de las disoluciones adyacentes es diferente. Descartado el hecho de que se produzcan cambios estructurales en el poro proteico por efecto del  $pH$  [Nestorovich 2003], la asimetría insinuada por las curvas es probablemente debida a una distribución asimétrica de la carga fija a lo largo del canal, como consecuencia de la alteración del estado de carga de sus residuos ionizables. Las causas por las cuales la corriente del canal OmpF rectifica en las tres condiciones asimétricas de  $pH$  expuestas pueden ser las siguientes:

- En condiciones de  $pH$  3/7, la curva I-V proporciona a potenciales positivos un valor de la conductancia muy similar a la de la curva I-V a  $pH$  3 de la figura 2.1 (valores de las pendientes de 0,42 nS frente a 0,33 nS respectivamente). A potenciales negativos, en cambio, la linealidad de la curva se pierde. Esto sugiere que existe una cierta asimetría en la distribución de la carga fija del canal, originada probablemente por la neutralización de algunos residuos ácidos del lado del canal que está orientado al medio ácido (en este caso al lado *cis* del canal).
- De la misma forma que en el caso anterior, en condiciones de  $pH$  7/12, la causa de la rectificación de la corriente observada podría ser la

asimetría en la distribución de la carga fija del canal originada a partir de la neutralización de algunos residuos básicos del lado del canal que está orientado al medio básico (en este caso lado *trans* del canal).

- En condiciones de *pH* 3/12, ambos lados del canal están expuestos a un valor de *pH* extremo. La curva I-V presenta un rápido incremento de la corriente a potenciales negativos y una gran resistencia a potenciales positivos donde la corriente casi alcanza un valor límite. En este caso se produce la neutralización de algunos residuos ácidos del lado *cis* del canal por efecto del *pH* ácido al que están expuestos y la de algunos residuos básicos del lado *trans* por efecto del *pH* básico. Esta circunstancia sugiere una mayor asimetría de la distribución de carga fija entre los lados del canal que en los casos anteriores.

El grado de asimetría en la distribución de la carga fija se refleja en el grado de rectificación de las curvas I-V. La figura 2.3 refleja ese aspecto de las curvas I-V representadas en la figura 2.2

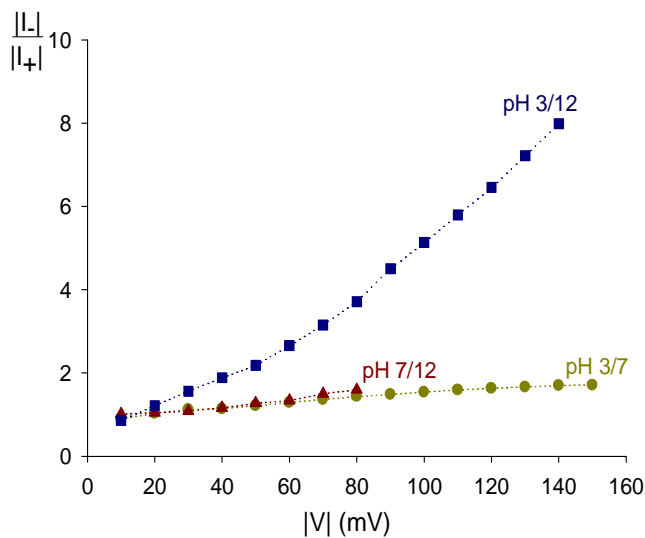


Fig. 2.3. Rectificación de la corriente,  $|I_-|/|I_+|$ , frente al valor absoluto del potencial aplicado,  $|V|$ , siendo  $I_-$  y  $I_+$  los valores de la corriente a un potencial aplicado de  $-V$  y  $+V$  respectivamente (datos experimentales de la figura 2.2).

Para apreciar la rectificación de las curvas de la figura 2.2, se representa en la figura 2.3 el cociente entre el valor absoluto de la corriente medida bajo las polaridades negativa y positiva en función del valor absoluto del potencial aplicado. La información gráfica que esta nueva representación de los datos experimentales proporciona permite extraer las siguientes conclusiones:

- En condiciones de  $pH$  3/7 y 7/12, el canal manifiesta una rectificación moderada de la corriente. El hecho de que sólo una de las disoluciones tenga un  $pH$  distinto del neutro proporciona una ligera asimetría en la carga del canal, probablemente ocasionada por la protonación o deprotonación de los residuos expuestos al medio ácido o básico según el caso. Además, el grado de rectificación de ambas curvas es muy similar entre sí. Esto puede estar indicando que el número de residuos ácidos del lado *cis* y el número de residuos básicos del lado *trans* no es muy diferente.
- En condiciones de  $pH$  3/12 la rectificación de la corriente es muy pronunciada (hay una corriente unas 8 veces mayor a -140 mV que a 140 mV). En este caso, los dos lados del canal están expuestos a condiciones extremas de  $pH$ . La asimetría de la carga fija del canal es mayor que en los casos anteriores puesto que hay más residuos ionizables que cambian su estado de carga por efecto del  $pH$  de las disoluciones adyacentes.

### 2.3.- Efecto de la concentración en la rectificación de la corriente

De los experimentos realizados bajo gradiente de  $pH$  se deduce que la carga fija del canal se encuentra distribuida de una manera irregular por toda su longitud. Esa distribución se manifiesta mediante la rectificación de las curvas I-V obtenidas del canal. Una manera de probar si el origen del comportamiento del canal en esas condiciones es electrostático es analizando el efecto de la concentración de la sal. Para ello, se realizan medidas de curvas I-V en condiciones de  $pH$  3/12 en varias concentraciones de KCl y se analizan los resultados. En la figura 2.4 se exponen dichas medidas.

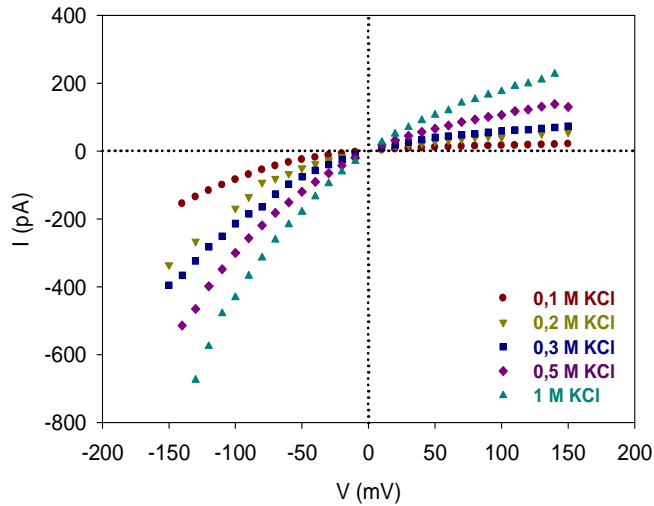


Fig. 2.4. Curvas I-V del canal OmpF en condiciones de  $pH$  3/12 con concentraciones 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,5 M y 1 M KCl.

Como se puede observar en la figura 2.4, el canal conduce más en disoluciones más concentradas (puesto que la cantidad de iones en disolución es mayor) y, cualitativamente, la rectificación de las curvas en todos los casos se mantiene. La rectificación observada en todas ellas puede estar causada por la distribución asimétrica de la carga fija, originada por las condiciones de  $pH$  impuestas, pero ¿cuál es el efecto de la concentración sobre esa rectificación y, por lo tanto, sobre la distribución de la carga fija a lo largo del canal? Para responder a esta pregunta se analiza el grado de rectificación de las curvas de la figura 2.4 mediante los datos representados en la figura 2.5.

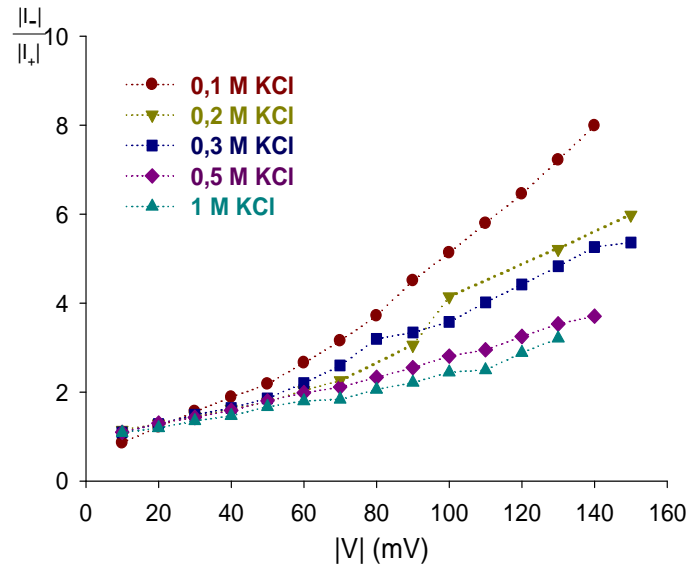


Fig. 2.5. Rectificación de la corriente,  $|I_-|/|I_+|$ , frente al valor absoluto del potencial aplicado,  $|V|$  (datos experimentales de la figura 2.4).

Como se observa en la figura 2.5, cuanto mayor es la concentración de la disolución, la rectificación de la curva I-V es menor. Esto indica que, al aumentar la concentración, el efecto de la carga fija del canal sobre los iones se atenúa, un comportamiento característico de un fenómeno de apantallamiento electrostático. Dicho fenómeno es predicho por la teoría de Gouy-Chapman-Stern de la doble capa eléctrica [Helfferich 1962a, Lakshminarayanaiah 1969, Lakshminarayanaiah 1984]. Su interpretación en el caso que nos ocupa (el transporte de iones a través de un poro con una distribución de carga) se basa en que las cargas fijas del poro inducen acumulación de portadores de signo opuesto (contraiones) y excluyen a su vez a los iones de su mismo signo (coiones). El apantallamiento electrostático se produce como consecuencia de la acumulación de los contraiones sobre la superficie del canal, compensando de esta forma el potencial generado por la carga fija de la interfase. Por eso, la influencia de la carga fija del canal sobre los iones es menos efectiva al aumentar la concentración de sal y la corriente, por lo tanto, es más parecida bajo las polaridades positiva y negativa (rectificación menor). Estos experimentos confirman el papel dominante de las interacciones electrostáticas en la conducción iónica a través del canal OmpF.

## 2.4.- Origen microscópico de la rectificación de la corriente

Los experimentos realizados a diferente *pH* demuestran que el estado de carga de los residuos ionizables del canal tiene una influencia decisiva sobre la corriente de los iones a través del canal. Para analizar detalladamente el papel de cada uno de los residuos ionizables del canal a un *pH* dado, es necesario conocer su estado de carga a ese *pH*. El valor del estado de carga a cada *pH* puede calcularse mediante un modelo de electrostática continua, tal y como proponen Bashford [Bashford 1990], Ian Antosiewicz [Antosiewicz 1994, Antosiewicz 1996], y Ullmann [Ullmann 1999] y colaboradores, que consiste en calcular el  $pK_a$  de cada uno de los residuos ionizables de la proteína. En base a estos trabajos, Aguilera-Arzo obtuvo los  $pK_a$ s de los residuos ionizables del canal OmpF [Aguilera-Arzo 2007]. Para ello se parte del ciclo termodinámico que se muestra en la figura 2.6.

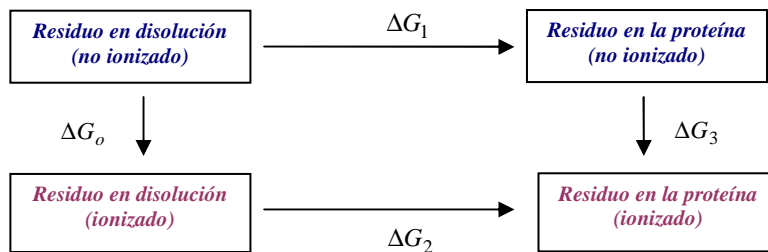


Fig. 2.6. Ciclo termodinámico del equilibrio de disociación de un residuo ionizable en disolución libre y en el entorno de la proteína.  $\Delta G_i$  es el cambio de energía generado en pasar un residuo de un estado a otro del ciclo.

Mediante el ciclo termodinámico de la figura 2.6 los cambios de energía generados en el proceso de ionización de un residuo ionizable se relacionan con la variación de energía necesaria para llevarlo desde su situación en disolución libre hasta una posición determinada dentro de la proteína. El ciclo termodinámico propone que el cambio de energía total experimentado por el residuo ionizable al llevarlo al entorno proteico e ionizarlo viene dado por la expresión 2.1.

$$\Delta\Delta G = \Delta G_3 - \Delta G_o = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (2.1)$$

Las variaciones de energía libre por ionización en función del  $pK_a$  vienen dadas por las expresiones termodinámicas 2.2 y 2.3, en las que  $pK_a^{mod}$  es el  $pK_a$  modelo del residuo, que es el valor del  $pK_a$  en disolución libre (habitualmente tabulado para cada residuo aminoácido ionizable) y  $pK_a^{app}$  es el  $pK_a$  aparente del residuo, que es el valor del  $pK_a$  en el entorno proteico, distinto del  $pK_a^{mod}$  por el hecho de encontrarse en un entorno distinto que el de disolución libre.

$$\Delta G_o = -2,303RTpK_a^{mod} \quad (2.2)$$

$$\Delta G_3 = -2,303RTpK_a^{app} \quad (2.3)$$

Las ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3 dan lugar a la ecuación 2.4 [C. Tanford 1957], mediante la cual se puede calcular el valor del  $pK_a^{app}$  a partir del  $pK_a^{mod}$  y del cambio de energía libre experimentado por el residuo ionizable.

$$pK_a^{app} = pK_a^{mod} - \frac{\Delta\Delta G}{2,303RT} \quad (2.4)$$

La variación de energía libre  $\Delta\Delta G$  puede desglosarse en tres contribuciones:

1.- La energía de Born, que es la energía necesaria para llevar el residuo ionizable desde unas condiciones en disolución libre, un entorno cuya permitividad eléctrica es alta, hasta una posición determinada en el entorno proteico cuya permitividad eléctrica es baja.

2.- Un término de fondo o *background*, que comprende la interacción del grupo ionizable con las cargas parciales que existen en la proteína cuando ésta está neutralizada.

3.- Un término de interacción del residuo con los demás grupos cargados de la proteína.

El cálculo de las dos primeras contribuciones se realiza mediante la ecuación de Poisson-Boltzmann linealizada, dada por la ecuación 2.5, usando el programa UHBD (*University of Houston Brownian Dynamics*) [Davis 1991, Madura 1995].

$$\Delta V(\vec{r}) = -\frac{\rho_{fija}(\vec{r})}{\epsilon} + \kappa^2 V(\vec{r}) \quad (2.5)$$



donde  $\epsilon$  es la permitividad eléctrica del medio,  $\rho_{fija}$  es la densidad de carga fija de la proteína y  $\kappa$  es la inversa de la longitud de Debye.

Para calcular la tercera contribución a la energía se utiliza el método de Monte Carlo. Mediante este método, partiendo de una configuración inicial en la que los residuos de la proteína tienen un estado de ionización determinado, se busca una distribución de la carga de los residuos ionizables en la proteína de máxima probabilidad termodinámica.

Una vez realizados todos esos cálculos a cada  $pH$  se calcula el potencial resultante y se promedia sobre cada sección transversal del canal. Un nuevo promedio del potencial eléctrico en la dirección axial,  $\bar{V}$ , proporciona una densidad de carga fija efectiva,  $\rho$ , que viene dada mediante la expresión 2.6.

$$\rho = \epsilon \kappa^2 \bar{V} \quad (2.6)$$

Haciendo todos estos cálculos para un amplio rango de  $pH$  se obtienen los resultados de la figura 2.7, en la que además se realiza una comparación entre la densidad de carga calculada y el RP del canal en un gradiente de concentración 0,1/1 M KCl.

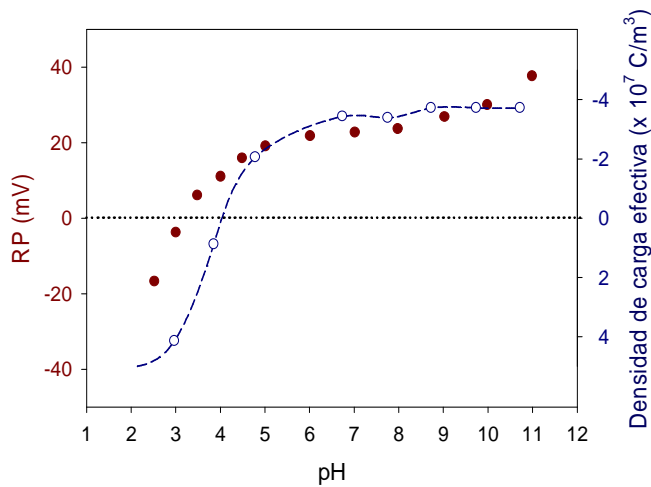


Fig. 2.7. Correlación cualitativa entre la densidad de carga efectiva calculada en el canal OmpF (círculos huecos unidos por una línea discontinua) y el RP medido en un 0,1/1 M KCl (círculos rojos) en un amplio rango de  $pH$ .

A la vista de los resultados de la figura 2.7, la selectividad del canal parece estar determinada por la carga efectiva de la proteína, de manera que cuando el canal manifiesta una selectividad a cationes ( $RP > 0$ ), su carga efectiva es negativa y cuando el canal manifiesta una selectividad a aniones ( $RP < 0$ ), su carga efectiva es positiva. Estos resultados demuestran el importante papel de la electrostática en el transporte iónico a través del canal OmpF en KCl y permite especular sobre el origen del comportamiento del canal en condiciones de  $pH$  asimétricas. Así que, considerando el estado de carga calculado a  $pH$  3 para los residuos ionizables del lado izquierdo del canal (lado intracelular) y el estado de carga calculado a  $pH$  12 para los residuos situados en el lado derecho (lado extracelular), se construye la imagen de un monómero del canal OmpF en condiciones de  $pH$  3/12. Ésta se muestra en la figura 2.8.

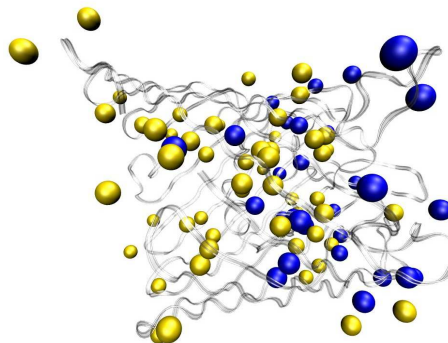


Fig. 2.8. Representación del estado de carga de los residuos ionizables de un monómero del canal OmpF en condiciones de  $pH$  3/12 (positivo para las bolas amarillas y negativo para las azules). El estado de carga se ha obtenido del cálculo electrostático del  $pK_a$  de los residuos correspondientes.

Como se puede observar en la figura 2.8, la asignación de la carga de los residuos ionizables del canal OmpF, basada en el cálculo de  $pK_a$ s, proporciona una imagen bipolar del poro proteico, con una carga efectiva positiva en el lado *cis* y una carga efectiva negativa en el lado *trans*. De hecho, la rectificación de la corriente del canal OmpF, observada en condiciones asimétricas de  $pH$  3/12 es una curva típica de las uniones p-n de estado sólido, de membranas poliméricas bipolares de

intercambio iónico [Alcaraz 2000] y de numerosos rectificadores moleculares [Mafé 1997].

El funcionamiento de un monómero de OmpF bajo dos polaridades distintas, suponiendo una distribución bipolar de carga, se ilustra en la figura 2.9.

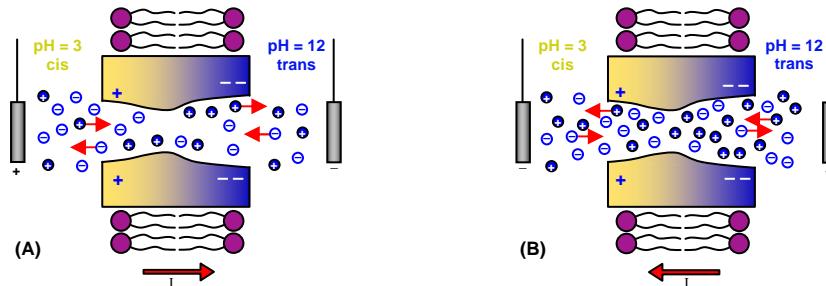


Fig. 2.9. Ilustración del comportamiento de la corriente a través de un monómero de OmpF con una distribución de la carga bipolar en dos casos: (A) bajo una polaridad positiva y (B) bajo una polaridad negativa.

La figura 2.9 explica la rectificación de la corriente del canal en términos de una distribución de carga bipolar. Bajo la aplicación de un potencial  $V_{cis} - V_{trans}$  positivo (figura 2.9A), los cationes presentes en el lado *cis* tienden a migrar hacia el lado *trans*, donde se encuentra el cátodo, pero la carga neta positiva de la parte del canal orientada al lado *cis* introduce una barrera de potencial que dificulta la entrada de los cationes al canal y, por lo tanto, reduce la corriente. Los aniones del lado *trans*, por otra parte, bajo el potencial aplicado tienden a migrar hacia el lado *cis*, donde se encuentra el ánodo. En su recorrido, los aniones sufren la acción de una barrera de potencial generada por la carga neta negativa de la parte del canal orientada al lado *trans* que obstaculiza su entrada al canal. En esas condiciones, la zona central del canal tiene pocos iones y se genera una gran resistencia eléctrica.

Bajo un potencial negativo (figura 2.9B), la entrada al canal de un flujo de cationes que, en principio, va del lado *trans* al lado *cis*, está favorecido por el pozo de potencial creado por la carga neta negativa de la parte del canal orientada al lado *trans*. Asimismo, la entrada del flujo de los aniones al canal, que se mueve del lado *cis* al lado *trans*, también está facilitada por la carga positiva de la parte del canal orientada al lado *cis*. El resultado es que se produce una acumulación de iones de ambos signos en la zona central que se manifiesta en una conductancia mayor [Daiguji 2005].

## 2.5.- Discusión y conclusiones

Los experimentos realizados en este capítulo ponen de manifiesto las propiedades eléctricas de un sistema biológico, el canal iónico OmpF, cuyo comportamiento se puede entender por su analogía con algunos dispositivos empleados en el campo de la electrónica. Más concretamente, los resultados de este estudio sugieren que, cuando se manipula el *pH* de las disoluciones adyacentes del canal OmpF, éste adquiere una configuración asimétrica de su carga que causa una rectificación en la corriente. En estas condiciones, el canal OmpF funciona como un diodo líquido biológico rectificador de la corriente y se especula sobre la posibilidad de que, en condiciones de *pH* 3/12, este canal adquiera una estructura de tipo bipolar. El funcionamiento de OmpF en estos casos es similar al observado en uniones moleculares que contienen moléculas bipolares, electrodos modificados químicamente, monocapas redox [Gasyna 2006, Hwang 2006] y nanoporos sintéticos [Schiedt 2005, Siwy 2005].

Existen numerosos canales iónicos rectificantes de corriente. Los canales de potasio rectificantes que se encuentran en células cardiacas y neuronales [Oliver 2000] son un ejemplo de ello. Como en el poro OmpF, la rectificación de la corriente observada en estas proteínas tiene también un origen electrostático. Otro ejemplo es el canal iónico  $\alpha$ -hemolysin. Este poro rectifica la corriente independientemente del valor del *pH*. A diferencia con el canal OmpF, el origen de la rectificación de la corriente en  $\alpha$ -hemolysin es la asimetría estructural del poro [Krasilnikov 1997].

Independientemente de las aplicaciones químicas, farmacéuticas y biológicas de las membranas y los canales iónicos [Shenoy 2005, Miedema 2007, Malek 2008], la analogía entre el comportamiento de un sistema biológico y un dispositivo electrónico puede tratarse desde dos perspectivas diferentes. Por una parte, imitando las propiedades de las membranas biológicas y los canales iónicos, surgen nuevos dispositivos electrónicos. Es el caso de los nanoporos sintéticos en los que se ha logrado reproducir algunas funciones biológicas, como el transporte selectivo de determinados iones inorgánicos o de metabolitos u otros solutos pequeños [Nishizawa 1995, Siwy 2002, Cervera 2005, Cervera 2006, Siwy 2006, Dekker 2007, Healy 2007, Sexton 2007, Striemer 2007, Van den Berg 2007, Vlassiouk 2007, Griffiths 2008, Kalman 2008, Ramirez 2008, Schoch 2008, Aguilera 2009]. En este contexto, una aplicación del estudio en concreto realizado en este capítulo, en el que

se manipula mediante el *pH* el estado de carga de los lados del canal OmpF, es el desarrollo de dispositivos moleculares bipolares basados en nanoporos sintéticos que, después de una modificación química, pueden cambiar su carga fija local en respuesta a la variación del *pH* [Fulinski 2004]. De hecho, estos experimentos podrían representar la parte experimental que complementa los análisis teóricos existentes de diodos nanofluídicos [Daiguji 2005].

Por otra parte, surgen las aplicaciones tecnológicas de las membranas biológicas y los canales iónicos a la industria. Las membranas variables con el *pH*, por ejemplo, han permitido el desarrollo de sistemas de filtraciones, separaciones y bioseparaciones y de sistemas sensores [Ramírez 2003b, Park 2004]. A un nivel más pequeño, las aplicaciones de los sistemas que rectifican la corriente son el desarrollo de sistemas que mejoran la velocidad de la electrónica, de dispositivos de almacenamiento de datos de alta densidad y de métodos de diseño de drogas y de análisis molecular [Daiguji 2005, Schiedt 2005]. Respecto a los canales iónicos, el desarrollo de estructuras sintéticas robustas utilizadas como membranas sólidas para reconstituirlos [Shenoy 2005] posibilitan las aplicaciones tecnológicas de estos elementos biológicos, condicionadas antaño por su reconstitución artificial en membranas de fosfolípidos altamente inestables.



## **Capítulo 3**

---

### **Selectividad direccional del canal iónico OmpF**





### 3.1.- Introducción

Como se concluía en el capítulo anterior la carga fija del canal OmpF puede regularse mediante el  $pH$  de las disoluciones adyacentes. La rectificación de la corriente del canal bajo un gradiente de  $pH$  externo es un indicio de una distribución asimétrica de carga, tal y como sugiere el cálculo de  $pK_a$ s de los residuos de la proteína [Alcaraz 2006]. Sin embargo, las curvas I-V del canal no son concluyentes en cuanto al balance de carga entre ambos lados, puesto que se pueden encontrar comportamientos similares en sistemas de transporte iónico con distribuciones de carga muy diversas. Así, la rectificación de la corriente por causas electrostáticas se observa en membranas sintéticas con cargas fijas [Jimbo 2000, Ramírez 2002], nanoporos sintéticos con grupos ionizables [Ramírez 2003b, Ramírez 2003a, Chun 2006, Ku 2007, Ramírez 2007], membranas anfóteras [Ramírez 1997a, Ramírez 1997c] y membranas bipolares [Mafé 1997].

La teoría de Teorell-Meyer-Sievers (TMS) predice que los sistemas bipolares, con un balance de carga equilibrado entre la carga positiva y negativa del sistema, tienen una selectividad que se caracteriza por ser catiónica en un sentido del gradiente de concentración y por ser aniónica en el sentido opuesto (selectividad direccional). Esto lo confirman diversos estudios sobre la selectividad de membranas bipolares [Simons 1993, Ramírez 1996, Li 2008, Mier 2008]. Estos resultados son la motivación de los experimentos recogidos en este capítulo, cuyo objetivo es identificar mediante medidas de RP las condiciones de  $pH$  en las que el canal OmpF presenta una distribución bipolar inequívoca de su carga fija [García-Giménez 2009a].

### 3.2.- Estudio de la distribución de carga del canal iónico OmpF en condiciones de $pH$ 3/12

En el capítulo anterior se sugería la posibilidad de que el canal en condiciones de  $pH$  3/12 tuviera una distribución de carga bipolar. El cálculo electrostático de  $pK_a$ s avalaba esa posibilidad pero sin ser concluyente al respecto ya que no se realizaba sobre un sistema sometido a un gradiente de  $pH$ . La distribución bipolar de la carga del canal se obtenía combinando los cálculos hechos en

condiciones simétricas de  $pH$  [Alcaraz 2006]. Las medidas experimentales de corriente, por otra parte, tampoco proporcionan una información evidente sobre el balance de la carga del canal en ambos lados en condiciones de  $pH$  3/12.

La observación directa de una selectividad direccional en el canal OmpF, en cambio, podría confirmar o descartar una distribución bipolar, con un equilibrio entre la carga positiva y negativa del canal. Para evaluar si esa circunstancia es posible se realizan medidas del RP del canal en un amplio rango de gradientes de concentración de KCl bajo gradiente de  $pH$ . Estas medidas están expuestas en la figura 3.1A y, a partir de ellas, es posible analizar la selectividad iónica del canal en ambos sentidos del gradiente de concentración. Para ello, se representa en la figura 3.1B el número de transporte de cationes,  $t_+$ , que proporciona la fracción de cationes que lleva la corriente iónica del canal. Su valor se deduce a partir del RP mediante la ecuación 3.1 [Lakshminarayanaiah 1984].

$$t_+ = \frac{1}{2} \left( 1 - \frac{F}{RT} \frac{RP}{\ln(c_{cis}/c_{trans})} \right) \quad (3.1)$$

La interpretación de la selectividad iónica a partir del número de transporte de cationes en KCl es inmediata, pues este valor muestra de una manera fácil y directa la naturaleza catiónica o aniónica de la selectividad según los siguientes criterios: si  $t_+ > 0,5$ , la selectividad del canal es catiónica, y si  $t_+ < 0,5$ , la selectividad es aniónica [Cervera 2007].

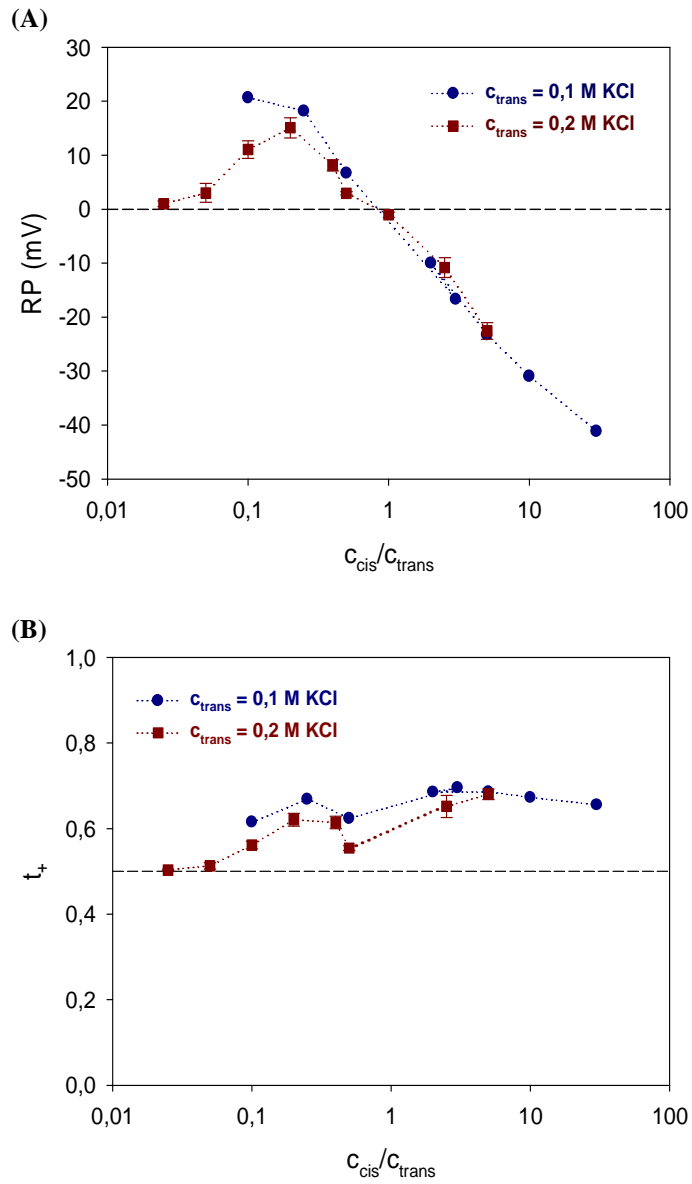


Fig. 3.1. (A) Medidas de RP en función del gradiente de concentración manteniendo una concentración en el lado *trans* 0,1 M y 0,2 M KCl y en condiciones de *pH* 3/12. (B) Número de transporte de cationes.

Las medidas de RP de la figura 3.1A experimentan un cambio de signo al invertir el gradiente de concentración. En términos del número de transporte de cationes, expresado en la figura 3.1B, esto se traduce a una selectividad a cationes ( $t_+ > 0,5$ ), independientemente del sentido del gradiente de concentración. Estos resultados descartan que el canal tenga una distribución de carga bipolar compensada (con un balance equilibrado entre la carga positiva y negativa del poro) ya que la selectividad del canal no es direccional. De hecho, los datos no permiten afirmar de manera concluyente si la distribución de la carga en esas condiciones es monopolar o bipolar. No obstante, se puede intuir dicha distribución examinando las medidas de RP en función del  $pH$  y su comparación con la densidad de carga neta del canal calculada a cada  $pH$ . Esos datos, originalmente expuestos en el capítulo anterior, han sido reproducidos en la figura 3.2 para facilitar la exposición de los argumentos de este apartado.

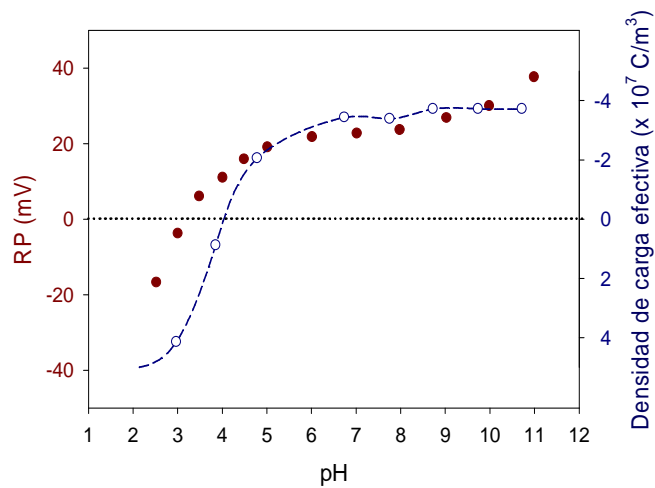


Fig. 3.2. Correlación cualitativa entre la densidad de carga efectiva calculada en el canal OmpF (círculos huecos unidos por una línea discontinua) y el RP medido en 0,1/1 M KCl (círculos rojos), en función del  $pH$ .

Para analizar las condiciones de  $pH$  3/12, se examinan los casos concretos de  $pH$  3 y 12 en la figura 3.2. Como se puede apreciar en ella, el cálculo de la densidad de carga del canal indica que a  $pH$  3 el canal posee, en conjunto, una carga efectiva positiva y a  $pH$  12 una carga efectiva negativa de aproximadamente la misma magnitud. Los cálculos indican, por lo tanto, la posibilidad de que el canal adquiriera a

$pH$  3/12 una distribución de carga bipolar, incluso con un equilibrio de carga positiva y negativa entre sus lados. Sin embargo, aunque cualitativamente la correlación entre los cálculos y el RP medido en el canal es bastante buena, no lo es tanto cuantitativamente, como vemos sobre todo para valores de  $pH < 4$ . En ese rango de  $pH$  el cálculo electrostático sobreestima el valor de la carga fija del canal. Las medidas experimentales sugieren que el canal a  $pH$  3/12 puede tener una carga de menor magnitud en el lado *cis* que en el lado *trans* (las medidas del RP son de apenas -1 mV a  $pH$  3 y de unos 40 mV a  $pH$  12). Aunque este razonamiento no descarta una distribución de carga tipo bipolar a  $pH$  3/12, el exceso de carga fija del lado *trans* del canal, que es negativa, se impone frente a la carga fija concentrada en el lado *cis* del canal, lo que explicaría que, en conjunto, el poro manifieste una selectividad a cationes, como realmente ocurre a la vista de los resultados de la figura 3.1.

En un escenario así, se puede intentar apantallar la parte del canal orientada al lado *trans* (a  $pH$  12) con un aumento de la concentración de sal en ese lado (de 0,1 M a 0,2 M KCl). De esta forma se pretende disminuir la magnitud de la carga negativa efectiva del canal y equilibrarla con la carga fija positiva del otro lado. El resultado, sin embargo, no satisface el objetivo buscado. El comportamiento cualitativo de la selectividad de la proteína es en ambos casos prácticamente el mismo y el canal sigue manifestando una selectividad a cationes independientemente del sentido del gradiente de concentración. No obstante, de la comparación de ambas series de medidas se desprende que el apantallamiento de la carga del canal al aumentar la concentración tiene lugar, en base a la disminución del RP, y por lo tanto de la selectividad a cationes.

### 3.3.- Selectividad direccional del canal OmpF bajo un gradiente de $pH$

La forma más efectiva de conseguir equilibrar la carga positiva y negativa del canal es modificando directamente la carga de uno de sus lados cambiando el  $pH$  [Alcaraz 2006]. Partiendo de la configuración del canal en condiciones de  $pH$  3/12, se puede bajar el  $pH$  del lado *cis* del canal (haciendo su carga más positiva) o el  $pH$  del lado *trans* (haciéndolo menos negativo) para equilibrar la magnitud de la carga de ambos lados y conseguir una distribución de carga bipolar equilibrada. Puesto que, a la vista de las medidas de la figura 3.2, la parte *cis* del canal (a  $pH$  3) podría tener una carga efectiva muy pequeña (la medida del RP es de apenas -1 mV), se opta por

disminuir el  $pH$  de ese lado, aumentando de este modo la carga positiva en esa parte del canal. Las medidas del RP realizadas en condiciones de  $pH$  2/12 para un amplio rango de gradientes de concentración y la representación del número de transporte de cationes correspondiente a esas medidas se exponen en la figura 3.3.

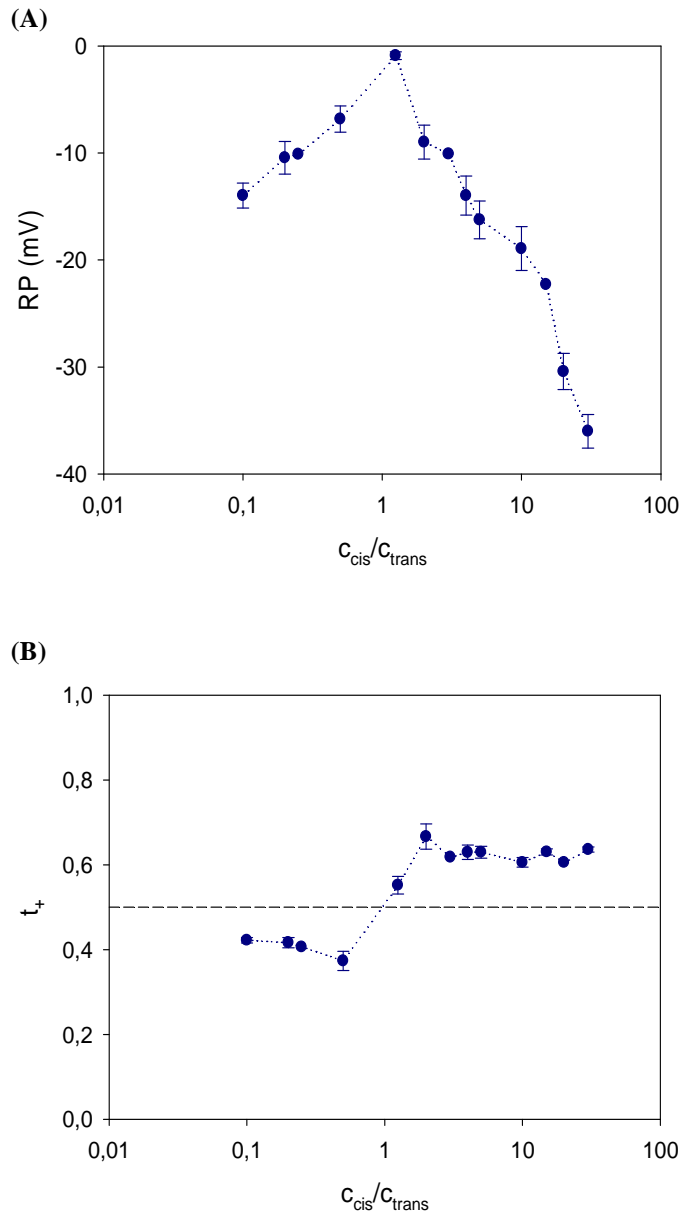


Fig. 3.3. (A) Medidas de RP en función del gradiente de concentración con  $c_{trans} = 0,1$  M KCl y condiciones de  $pH$  2/12. (B) Número de transporte de cationes.

Como se observa en la figura 3.3A, el signo del RP permanece invariable al invertir el gradiente de concentración. En términos del número de transporte de cationes, como se aprecia en la figura 3.3B, esto significa que el canal manifiesta una selectividad a aniones en las medidas en las que  $c_{cis} < c_{trans}$  ( $t_+ < 0,5$ ) y una selectividad a cationes en las que  $c_{cis} > c_{trans}$  ( $t_+ > 0,5$ ). La selectividad del canal en esas condiciones de  $pH$  es direccional.

La selectividad direccional de un sistema de transporte iónico pasivo implica un hecho que puede parecer singular: que en uno de los sentidos del gradiente de concentración, el sistema parece conducir corriente en contra del gradiente de concentración iónico. La teoría TMS es capaz de explicar ese fenómeno mediante el efecto del apantallamiento electrostático de la carga del canal. Ante una magnitud idéntica de la carga positiva y negativa de un sistema bipolar, aumentar la concentración de un lado del sistema respecto del otro provoca el apantallamiento de la carga de ese lado y, como consecuencia, la selectividad del sistema queda dominada por la carga del otro lado. En el caso concreto del canal OmpF en condiciones de  $pH$  2/12, cuando  $c_{cis} < c_{trans}$ , la carga fija negativa del lado *trans* del canal está más apantallada que la carga fija positiva del lado *cis*. El exceso de carga fija positiva (respecto a la negativa) es el origen de la selectividad a aniones. Cuando  $c_{cis} > c_{trans}$ , la carga fija positiva del lado *cis* del canal está más apantallada que la carga fija negativa del lado *trans*. El exceso de la carga fija negativa del sistema provoca la selectividad a cationes.

### 3.4.- Selectividad direccional del canal OmpF en condiciones fisiológicas

La bacteria *Escherichia Coli* se suele encontrar en el tracto gastrointestinal de mamíferos, donde el  $pH$  del medio puede tomar un valor ácido [Jordan 1999]. El medio intracelular de la bacteria, sin embargo, permanece a un  $pH$  neutro. El canal OmpF, situado en la membrana externa de la bacteria, puede estar entonces sometido a un gradiente de  $pH$  entre sus lados. Para explorar el comportamiento del canal en su medio natural, se realizan medidas del RP en dos condiciones biológicamente relevantes: a  $pH$  3/7 y a  $pH$  2/7. La figura 3.4 contiene tales medidas y la representación del número de transporte de cationes.



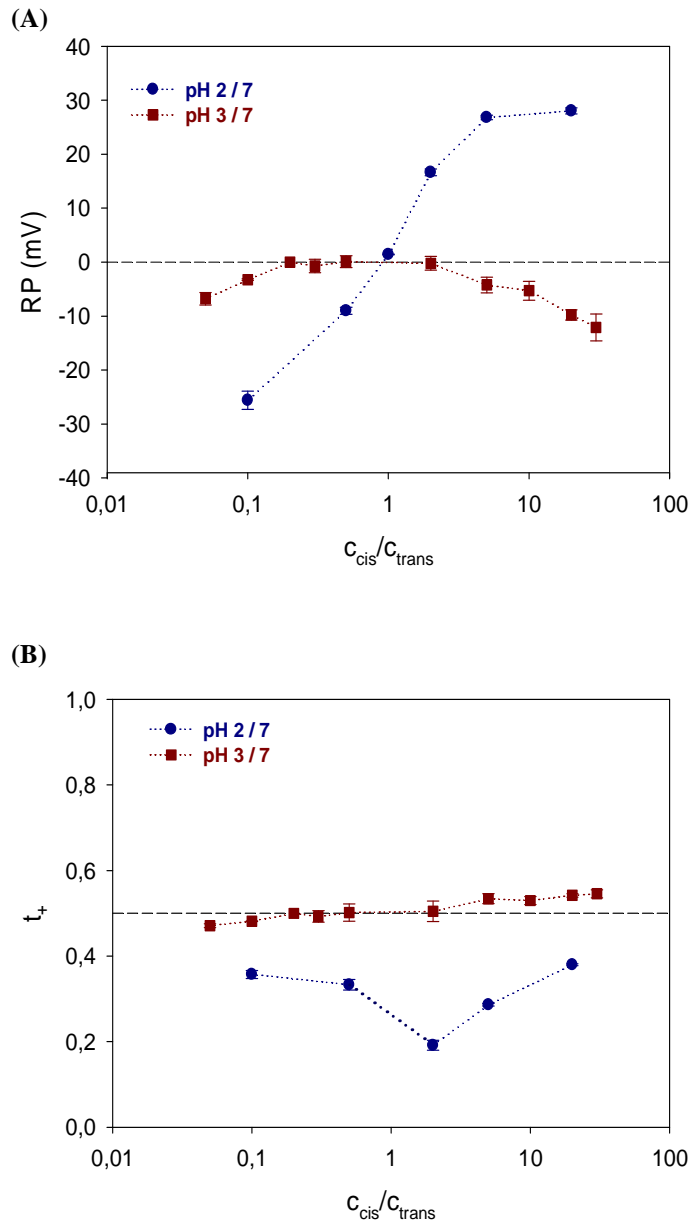


Fig. 3.4. (A) Medidas de RP en función del gradiente de concentración con  $c_{trans} = 0,1$  M KCl y condiciones de  $pH$  2/7 y 3/7. (B) Número de transporte de cationes.

En la figura 3.4 se pueden apreciar dos comportamientos diferentes de la selectividad del canal, dependiendo del gradiente de  $pH$  impuesto. Las medidas de RP realizadas a  $pH$  2/7 no permiten discriminar entre ninguna distribución de carga en particular. El signo del RP cambia al invertir el gradiente de concentración y el número de transporte de cationes toma valores menores que 0,5 en todo el rango de gradientes de concentración, indicando una selectividad a aniones. Se puede entender este comportamiento a partir de los resultados obtenidos en la configuración de  $pH$  2/12, en la que el canal tiene una distribución de carga bipolar compensada. Al bajar el  $pH$  de la disolución del lado *trans* del canal para obtener la configuración de  $pH$  2/7, algunas cargas negativas de la parte del canal orientada al lado *trans* se neutralizan. De este modo, el balance entre la concentración de carga positiva y negativa del canal se desequilibra y hay un exceso de carga positiva que se manifiesta en una selectividad a aniones. Este exceso de carga se podría compensar aumentando el  $pH$  de la disolución del lado *cis* y, por lo tanto, también la carga negativa de ese lado del canal. El resultado es la curva del RP que se muestra en la figura 3.4 en condiciones de  $pH$  3/7. En esta curva se puede apreciar que el signo del RP no cambia al invertir el gradiente de concentración. Como se refleja en el número de transporte, esto indica una selectividad direccional. Cuando  $c_{cis} < c_{trans}$  el canal manifiesta una selectividad a aniones ( $t_+ < 0,5$ ) y cuando  $c_{cis} > c_{trans}$ , la selectividad del canal es catiónica ( $t_+ > 0,5$ ), apuntando a una distribución bipolar en la que hay un equilibrio entre la carga positiva y negativa. La transición entre el comportamiento del canal a  $pH$  2/7 y a  $pH$  3/7 se muestra con detalle en la tabla 3.1.

$pH_{cis}$	RP (mV)	$t_+$	Selectividad
2,50	-22,0	0,31	Aniones
2,75	-9,8	0,42	Aniones
3,00	5,3	0,55	Cationes

Tabla 3.1. Valor del RP medido y del  $t_+$  calculado en condiciones asimétricas de  $pH$ , manteniendo  $pH_{trans} = 7$ , en 1/0,1 M KCl.

Como se deduce de los datos de la tabla 3.1, al disminuir el  $pH$  de la disolución del lado *cis*, la selectividad del canal pasa de ser aniónica a ser catiónica. Además, el cambio en el RP es muy brusco: se produce un aumento de unos 30 mV

al incrementar  $pH_{cis}$  en sólo 0,5 unidades (de  $pH_{cis}$  2,5 a 3,0). La transición de la selectividad del canal se produce a un valor de  $pH_{cis} \simeq 2,9$ , cuando no hay corriente iónica neta a través del canal OmpF.

La situación del canal OmpF en condiciones de  $pH$  3/7 podría ser especialmente importante para la regulación de la concentración iónica y del potencial de membrana de la bacteria, ya que su comportamiento implica que pasen cationes a un gradiente de concentración dado y aniones si el gradiente de concentración tiene el sentido opuesto. En uno de los dos casos, el canal estaría conduciendo iones en contra de su gradiente de concentración y esto, en un canal iónico biológico, donde en principio el transporte de iones es pasivo, es una situación especial que viene determinada por una distribución de carga bipolar concreta en el canal.

### 3.5.- Discusión y conclusiones

La naturaleza electrostática del transporte de iones a través del canal OmpF y la manipulación de su carga mediante la variación del  $pH$  de las disoluciones adyacentes ha permitido obtener las condiciones de  $pH$  óptimas en las que el canal manifiesta una selectividad direccional y, por lo tanto, una distribución de carga bipolar caracterizada por tener la misma magnitud de carga positiva y negativa. Las configuraciones en las que esto sucede se han encontrado en las condiciones de  $pH$  3/7 y 2/12. La única diferencia de ambas configuraciones es la magnitud del RP medido. Mientras que en el caso más extremo de gradiente de concentración estudiado (3/0,1 M KCl), el valor del RP del canal es de unos 12 mV en la configuración de  $pH$  3/7, en la configuración de  $pH$  2/12 el RP es de unos 36 mV, sugiriendo una magnitud y una asimetría de la carga mayor en este último caso.

La selectividad direccional implica la conducción de iones monovalentes a través del canal iónico OmpF en contra del gradiente de concentración. Esta situación es propia de membranas biológicas donde el transporte de iones es activo [Higuchi 1987, Ramírez 1996, Alcaraz 2000] pero, en el caso que nos ocupa, se puede explicar mediante la teoría electrostática TMS para sistemas bipolares de intercambio iónico con igual concentración de carga fija positiva y negativa, y es ampliamente estudiada en aplicaciones tecnológicas de las membranas sintéticas [Ramírez 1997b].

Este comportamiento pone de manifiesto la gran influencia del  $pH$  sobre la selectividad del canal [Alcaraz 2004, García-Giménez 2009a].

El análisis de la corriente y la selectividad del canal en condiciones asimétricas de  $pH$  abre un amplio abanico de posibles aplicaciones físicas, químicas y tecnológicas [Alcaraz 2006, García-Giménez 2009a], sobre todo, como es el caso, si el comportamiento del canal es análogo a la de otros dispositivos electrónicos. Pero quizás lo más relevante es haber adquirido un conocimiento más profundo de la selectividad del canal en su medio natural donde un gradiente de  $pH$  a través de la membrana es habitual. No se pueden sacar conclusiones precipitadas sobre la función de la célula sin conocer el comportamiento de otros canales de la bacteria en condiciones de  $pH$  asimétricas pero a partir de este estudio se puede concluir que, teniendo en cuenta el medio ácido en el que esta bacteria suele sobrevivir, una pequeña variación del  $pH$  extracelular determina el tipo de iones (cationes o aniones) que pueden entrar y salir de la célula a través del canal iónico OmpF.

## Capítulo 4

---

### **Origen de la selectividad del canal OmpF: Difusión, exclusión y *binding***



## 4.1.- Introducción

Al poner en contacto dos disoluciones con distinta concentración iónica mediante una membrana permeable se produce un movimiento neto de los iones desde la disolución más concentrada a la disolución menos concentrada. Ese fenómeno se conoce con el nombre de difusión. Como consecuencia de la distinta movilidad de aniones y cationes, la difusión de iones a través de una membrana da lugar a un potencial eléctrico conocido como potencial de difusión, que evita la separación macroscópica de carga. Este potencial puede calcularse mediante la ecuación de Planck (ecuación 1.9) si se conocen los coeficientes de difusión de los iones.

Si además los iones estuvieran sometidos a un campo eléctrico, éstos adquirirían un movimiento adicional que se sumaría al movimiento difusivo. En cualquier caso, el sentido del movimiento de los iones está determinado por el gradiente del potencial electroquímico. La proporción de iones que atraviesa un canal en la membrana depende, pues, de la naturaleza de los iones y las características del poro. El movimiento de los iones debido a un gradiente de concentración y de potencial eléctrico se conoce como electrodifusión [Helfferich 1962b, Bockris 1970].

La selectividad de un canal iónico se suele asociar a su capacidad de excluir o acumular iones de un signo como consecuencia de las interacciones de éstos con las cargas fijas del canal [Barry 2006]. La selectividad así definida es relativamente fácil de interpretar en canales iónicos estrechos. Sin embargo, la medida del RP de un canal iónico ancho, como es el canal OmpF, incluye tanto las características intrínsecas del poro (forma, cargas, dimensiones) como las de los iones de la disolución (movilidad, carga, tamaño) [Hille 2001]. Separar las contribuciones de la difusión y la exclusión de la medida del RP no es una tarea sencilla desde un punto de vista teórico, pues ambas contribuciones son mutuamente dependientes. Por eso, a lo largo de esta memoria el concepto de la selectividad de un canal iónico se asocia a una propiedad del sistema conjunto (incluyendo al canal y al electrolito), que es directamente medible a través del RP. En estudios previos se pone de manifiesto esta percepción de la selectividad al comprobar como influyen en ella factores como el *pH* [Aguilella-Arzo 2007, García-Giménez 2009a], la concentración de electrolito [Alcaraz 2004] y el tipo de electrolito [Danelon 2003, Miedema 2004, Miedema 2006, Vrouenraets 2006].

Los coeficientes de difusión del  $K^+$  y del  $Cl^-$  son muy parecidos (ver tabla A1.1 del apéndice 1). Como consecuencia, la contribución del potencial de difusión a la selectividad del canal OmpF en KCl se puede despreciar ( $\sim 1$  mV). Por eso, en KCl los efectos de la exclusión electrostática se consideran la principal causa de la selectividad del canal OmpF [Schirmer 1998, Phale 2001, Nestorovich 2002b, Danelon 2003, Alcaraz 2004, Alcaraz 2006, Aguilera-Arzo 2007, García-Giménez 2009a]. En ese contexto, puesto que la carga de la proteína depende del *pH* del medio, la selectividad del canal en KCl varía también, siendo catiónica a *pH* bajo y neutro, y aniónica a *pH* alto [Aguilera-Arzo 2007]. En concreto, a *pH* neutro la selectividad del canal procede de una carga fija neta negativa [Aguilera-Arzo 2007].

En electrolitos distintos del KCl la movilidad de los dos iones puede ser muy diferente, con lo cual la conexión entre el RP y la carga fija del canal no es tan directa. Es objeto de este capítulo analizar el papel de la difusión iónica sobre la selectividad del canal en presencia de diferentes cationes (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>,...) [Alcaraz 2009].

## 4.2.- Influencia de la difusión sobre la selectividad del canal

### 4.2.1.- Contribución del potencial de unión líquida de la interfase electrodos-disolución

El protocolo experimental utilizado para la realización de las medidas del RP incluye el uso de electrodos reversibles de Ag/AgCl inmersos en un puente salino 2 M KCl. Al poner estos electrodos en contacto con la disolución se forma una unión líquida en la interfase puente-disolución. En esa interfase aparece un potencial de unión líquida como consecuencia de la diferente movilidad de los cationes y aniones. La medida experimental del potencial de corriente cero incluye ese potencial de unión líquida [Barry 1970, Bockris 1970, Barry 1991, Neher 1992a, Barry 1994]. En disoluciones de KCl, el potencial de unión líquida que incluye la medida experimental es muy pequeño, de apenas del orden del milivoltio, despreciable frente a las medidas de RP [Alcaraz 2004]. Sin embargo, usando el citado puente salino en disoluciones con otros electrolitos (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>,...) la contribución puede ser considerablemente mayor. Por eso, para obtener un valor correcto del RP del canal



es necesario sustraer el potencial de unión líquida de la medida, tal y como se apuntaba en el capítulo introductorio de esta memoria. En el apéndice 1 se incluye un detallado estudio de la importancia y repercusión del potencial de unión líquida en las medidas de selectividad de los canales iónicos.

#### 4.2.2.- Contribución del potencial de difusión al RP en sales monovalentes

En la figura 4.1 se presentan medidas del RP del canal OmpF en función del gradiente de concentración dado por  $c_{cis}/c_{trans}$  en dos cloruros alcalinos: KCl y NaCl. Como se trata de analizar la contribución del potencial de difusión a la medida, en dicha figura se incluye también el potencial de difusión libre en función del gradiente de concentración, calculado mediante la ecuación de Planck (ecuación 1.9) empleando los coeficientes de difusión en disolución libre tabulados (tabla A1.1).

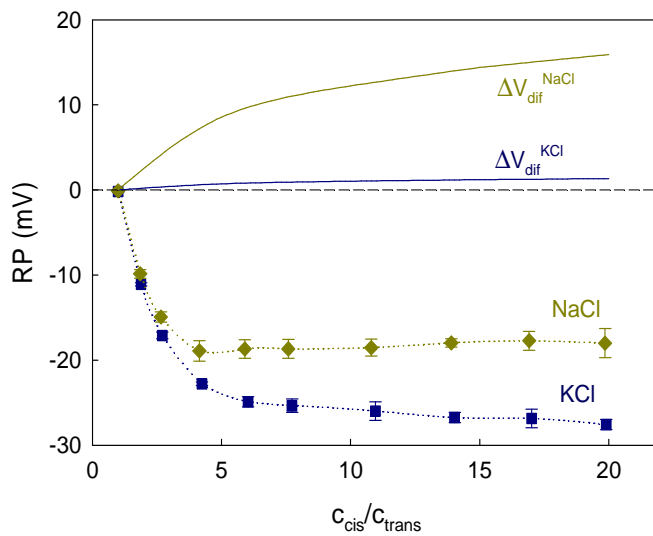


Fig. 4.1. Medidas del RP del canal OmpF en KCl y NaCl a  $pH$  6 en función del gradiente de concentración manteniendo  $c_{trans} = 0,1$  M en todas las medidas. En la figura aparece también el potencial de difusión calculado para ambos electrolitos mediante la ecuación de Planck.

El fenómeno de la exclusión electrostática de iones en una superficie cargada no distingue entre dos iones de la misma valencia [Lakshminarayanaiah 1984]. Por lo tanto, en ausencia de cualquier otro tipo de fuerzas no coulombicas, a la

vista de las medidas expuestas en la figura 4.1, la discriminación de los diferentes cationes ha de proceder de las distintas movilidades con las que éstos difunden. En ese caso, la disminución de la selectividad del canal en NaCl respecto al KCl podría ser debida al exceso del potencial de difusión del primer electrolito respecto al segundo (nótese la diferente movilidad del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{K}^+$  en la tabla A1.1). Para probar esta hipótesis se calcula la diferencia entre los potenciales de difusión libre de ambos electrolitos a partir de la ecuación de Planck (la ecuación 4.1 proporciona los valores de esa diferencia) y se compara con los resultados experimentales.

$$\Delta V_{dif}^{NaCl} - \Delta V_{dif}^{KCl} = -\frac{k_B T}{e} \left( \frac{D_{Na^+} - D_{Cl^-}}{D_{Na^+} + D_{Cl^-}} - \frac{D_{K^+} - D_{Cl^-}}{D_{K^+} + D_{Cl^-}} \right) \ln \left( \frac{c_{cis}}{c_{trans}} \right) \quad (4.1)$$

La ecuación 4.1 tiene una dependencia lineal característica con el logaritmo neperiano del gradiente de concentración. Para examinar si los datos experimentales siguen una dependencia así se representan en escala semilogarítmica en la figura 4.2.

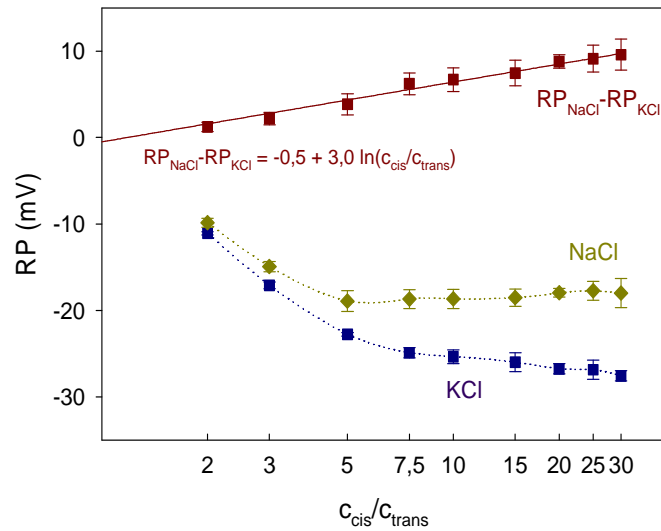


Fig. 4.2. Escala semilogarítmica de los datos de la figura 4.1 y diferencia entre el RP en KCl y NaCl. Los cuadrados rojos representan la diferencia entre los valores del RP en NaCl y KCl de los cuales se obtiene un ajuste lineal con un coeficiente de correlación  $R = 0,9918$ .

La tendencia lineal observada en la figura 4.2 de  $RP_{NaCl}-RP_{KCl}$  con el logaritmo neperiano del gradiente de concentración es un indicio de que la discriminación del canal a los cationes  $K^+$  y  $Na^+$  proviene principalmente de la distinta movilidad de éstos en disolución, tal y como predice la ecuación 4.1. Hay sin embargo una diferencia en los valores de las pendientes teórica y experimental. Mientras que la pendiente resultante del ajuste lineal de los datos experimentales tiene un valor de 3,0, el valor de la que predice la ecuación 4.1 para disolución libre es 4,8. No obstante, esta diferencia puede provenir del hecho de que los coeficientes de difusión de los iones dentro del canal pueden ser distintos de los tabulados para disolución libre [Hille 2001]. En el canal OmpF, en concreto, estudios previos indican que el cociente de movilidades catión-anión podría estar ligeramente reducido respecto a su valor en disolución libre [López 2009], lo que explicaría la reducción de la pendiente experimental frente a la teórica.

#### 4.2.3.- Contribución del potencial de difusión al RP en sales divalentes

En la figura 4.3 se exponen medidas del RP del canal OmpF en función del gradiente de concentración en  $CaCl_2$  y  $MgCl_2$ .

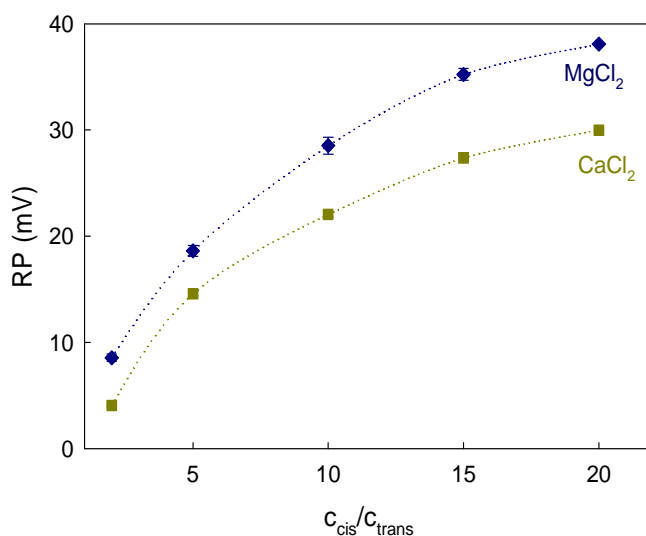


Fig. 4.3. Medidas del RP del canal OmpF en función del gradiente de concentración en  $CaCl_2$  y  $MgCl_2$  a  $pH$  6, manteniendo  $c_{trans} = 0,1$  M en todas las medidas.

En general, los cloruros de cationes divalentes tienen un potencial de difusión mayor que los cloruros de cationes monovalentes en disolución libre. Por lo tanto, el uso de estos electrolitos es especialmente interesante para estudiar la contribución del potencial de difusión a la medida del RP. Con ese fin se analizan a continuación los datos del RP del canal expuestos en la figura 4.3.

El signo de las medidas de RP de la figura 4.3 indica que el canal en esas condiciones favorece el paso de los aniones frente al de los cationes divalentes. La selectividad catiónica del canal en NaCl y KCl se invierte y pasa a ser aniónica en presencia de cationes divalentes. La cuestión es si el origen de esta inversión de la selectividad puede ser asociado al efecto de la difusión de los iones de las sales divalentes al cruzar el canal. Para contestar a esta cuestión, se comparan los valores del potencial de difusión libre con los valores experimentales del RP en la figura 4.4.

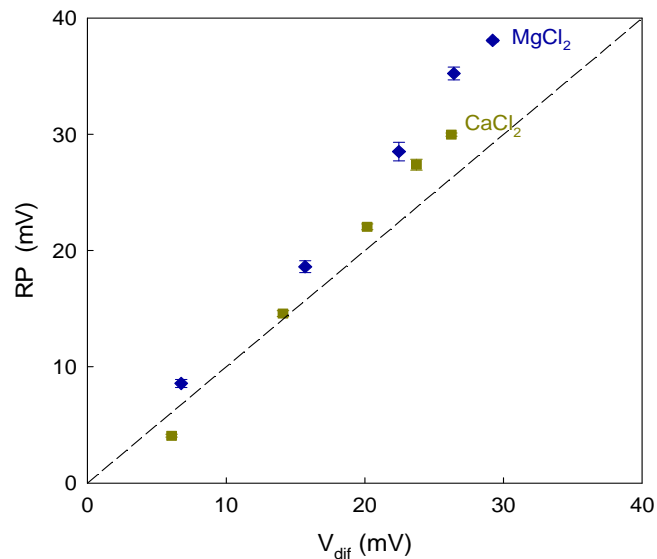


Fig. 4.4. Medidas del RP del canal OmpF en CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> a *pH* 6 frente al potencial de difusión libre de los respectivos electrolitos, correspondientes a cada par de concentraciones *cis* y *trans*. La línea discontinua es una referencia visual para señalar cuando el RP es mayor o menor que el potencial de difusión para ese par de concentraciones.

En la figura 4.4 ambos potenciales casi coinciden, sugiriendo que los efectos de exclusión electrostática no son apenas relevantes. Esto contrasta con lo que

indican los estudios en disoluciones de cationes monovalentes, donde la selectividad medida se asociaba únicamente a la acción de las cargas del canal. La carga negativa se debería oponer a la difusión de los aniones de manera que el valor del RP esperado sería inferior al potencial de difusión de la sal. El RP medido, sin embargo, no sólo no refleja esa tendencia si no que además es algo mayor que el potencial de difusión libre calculado. Una representación alternativa de los datos de la figura 4.4 se realiza en la figura 4.5 en escala semilogarítmica, de manera que permite obtener más información de los mecanismos de transporte implicados.

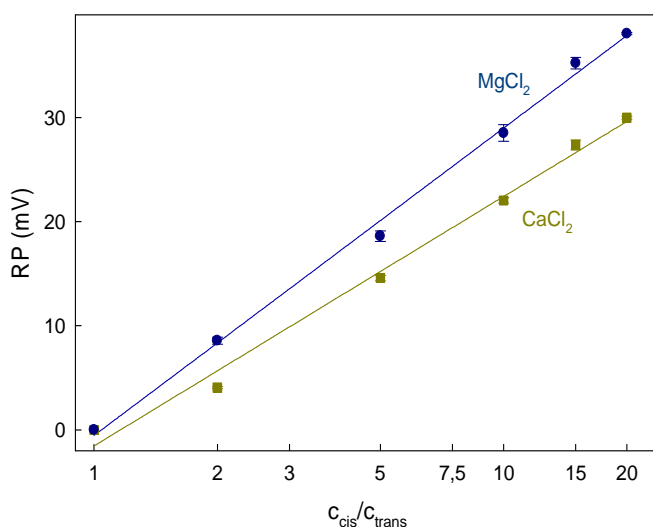


Fig. 4.5. Medidas del RP del canal OmpF en sales divalentes a *pH* 6 en función del gradiente de concentración en escala semilogarítmica. En la figura se incluye el ajuste lineal de las medidas de RP. El índice de correlación de los ajustes supera en ambos casos el valor de 0,99.

En la figura 4.5, la linealidad de los datos experimentales con el logaritmo del gradiente de concentración indica que el transporte de iones a través del canal en disoluciones con cationes divalentes es compatible con un proceso difusivo. No se observan efectos apreciables de exclusión electrostática, lo que sugiere que la carga del canal en este tipo de disoluciones ha dejado de ser negativa para ser prácticamente neutra.

Los ajustes lineales de los datos experimentales proporcionan un valor del RP que viene dado por  $0,54 + 12,8 \ln(c_{cis}/c_{trans})$  para el caso del  $MgCl_2$  y por  $-1,54 +$

$10,4 \ln(c_{cis}/c_{trans})$  para el caso del  $\text{CaCl}_2$ . Estos valores contrastan con los predichos por la ecuación de Planck para el potencial de difusión libre que viene dado por  $9,8 \ln(c_{cis}/c_{trans})$  en el caso del  $\text{MgCl}_2$  y  $8,8 \ln(c_{cis}/c_{trans})$  en el caso del  $\text{CaCl}_2$ .

En ambos casos se obtienen pendientes experimentales mayores que las del potencial de difusión libre. Esto tiene dos interpretaciones distintas. Una de ellas es considerar que el potencial de difusión real de la sal puede ser diferente del potencial de difusión libre [Hille 2001, López 2009]. La otra interpretación es considerar que el potencial de difusión real generado por los iones de la sal al cruzar el canal es exactamente el calculado para disolución libre. En ese caso, un valor del RP mayor que el potencial de difusión indica que existe una exclusión electrostática de cationes cuyo origen sería una carga neta positiva en el canal. Esta última interpretación conduce a especular sobre si puede tener lugar un fenómeno de inversión de carga en el canal OmpF [Grosberg 2002, Van der Heyden 2006, Faraudo 2007].

No obstante, en cualquier caso debe existir un mecanismo mediante el cual, en presencia de cationes divalentes, la carga neta del canal cambia, neutralizándose o invirtiendo su signo.

#### 4.3.- Efecto de los cationes divalentes $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Mg}^{2+}$ sobre la carga del canal

Para obtener información sobre la contribución electrostática de la carga presente en el canal a las medidas de RP, en la figura 4.6 se representan las medidas del RP del canal OmpF en función del  $pH$  en 0,1/1 M de KCl,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ . En ella se incluyen los correspondientes potenciales de difusión libre calculados mediante la ecuación de Planck para las sales consideradas.

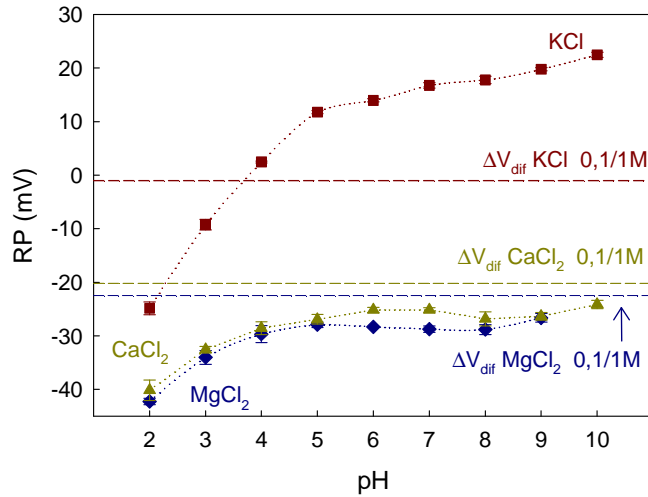


Fig. 4.6. Medidas del RP de OmpF en función del *pH* en 0,1/1 M de KCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. Se incluye mediante líneas horizontales el potencial de difusión libre de cada electrolito, calculado mediante la ecuación de Planck.

En general el canal es mucho menos sensible a la variación de *pH* en sales divalentes que en KCl. A bajo *pH*, el canal manifiesta una exclusión electrostática de cationes que se traduce en una carga neta positiva en ambos tipos de electrolitos. En el rango de *pH* de 5 a 10 el canal manifiesta en KCl una alta exclusión electrostática de aniones (una carga neta negativa) que en sales de cationes divalentes no se aprecia, ya que el valor del RP está muy próximo al del potencial de difusión libre (incluso lo supera ligeramente sugiriendo la posibilidad de que el canal tenga una carga neta positiva).

En este punto, surge la siguiente cuestión: ¿cuál es el efecto de los cationes divalentes sobre la carga del canal para anular a *pH* neutro la exclusión electrostática de aniones? Para responder a esta cuestión se representa en la figura 4.7 el RP en función de la concentración de sal manteniendo un gradiente de concentración constante  $c_{cis}/c_{trans} = 10$ . En estas condiciones el potencial de difusión es constante y se puede estudiar la influencia electrostática de la carga en función de la concentración absoluta.

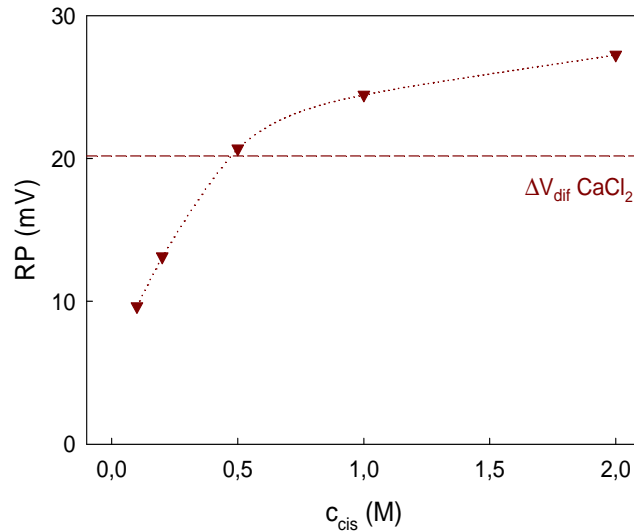


Fig. 4.7. Medidas del RP del canal OmpF en  $\text{CaCl}_2$  en función de la concentración absoluta en el lado *cis*, manteniendo un gradiente de concentración  $c_{cis}/c_{trans} = 10$ . El potencial de difusión libre se incluye mediante una línea horizontal.

En la figura 4.7 se observa un incremento del RP con la concentración absoluta. Si la medida del RP estuviera únicamente asociada a una hipotética carga fija, ésta tendría que ser positiva. El efecto de aumentar la concentración sería un apantallamiento de la citada carga y una disminución del RP, lo cual no se observa. Del mismo modo, esta figura descarta que la selectividad se deba a efectos estéricos o entrópicos ya que estos efectos se atenúan con el aumento de la concentración [Lanteri 2008].

Una vez que se considera el potencial de difusión libre, la figura 4.7 sugiere una cierta exclusión electrostática de aniones a baja concentración absoluta de sal, pues el RP está por debajo del potencial de difusión. El canal mantiene, por lo tanto, el signo negativo de su carga original. A medida que aumenta la concentración absoluta de sal, el RP tiende al potencial de difusión, lo que se traduce en una neutralización progresiva de la exclusión de aniones. A partir del gradiente de concentración dado por 0,5/0,05 M surge la duda de si el RP supera el potencial de difusión real del electrolito o de si lo iguala, como se apuntaba anteriormente.

La tendencia de los datos experimentales de la figura 4.7 revela que, al reducir lo suficiente la concentración absoluta de sal en ambos lados del canal, los



cationes divalentes podrían no ser capaces de anular lo suficiente la exclusión electrostática generada por la carga negativa del canal para invertir su selectividad. Con el objetivo de recuperar la selectividad a cationes del canal en disoluciones divalentes se realizan medidas de RP a bajas concentraciones de sal manteniendo un gradiente de concentración pequeño,  $c_{cis}/c_{trans} = 1,5$ . En la figura 4.8 se exponen los resultados experimentales obtenidos.

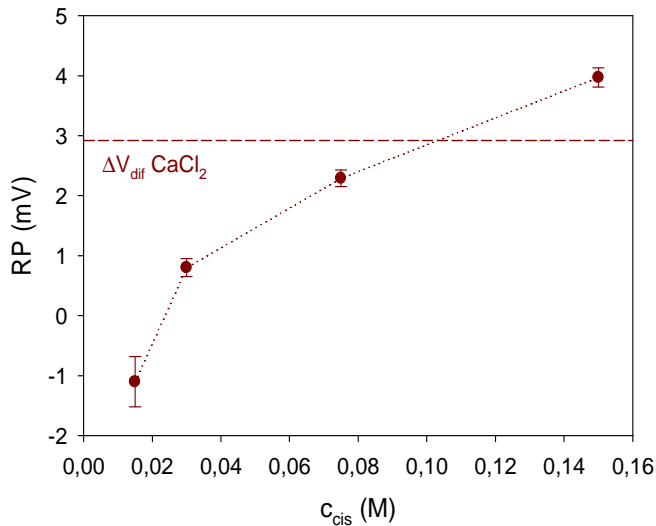


Fig. 4.8. Medidas del RP del canal OmpF en  $\text{CaCl}_2$  en función de la concentración absoluta en el lado *cis*, manteniendo un gradiente de concentración  $c_{cis}/c_{trans} = 1,5$ . La línea horizontal indica el potencial de difusión libre del electrolito.

La tendencia de las medidas del RP de la figura 4.8 es la misma que la que se observaba a altas concentraciones de sal: un incremento del RP a medida que aumenta la concentración absoluta de sal. Además, se aprecia que, a muy bajas concentraciones, el canal recupera la selectividad a cationes.

A la vista de los resultados, se puede afirmar que los cationes divalentes modifican la carga original negativa del canal, neutralizándola o incluso invirtiéndola, sugiriendo la existencia de interacciones específicas (de origen no culombico) entre los cationes divalentes y el canal, un fenómeno conocido como *binding* de cationes divalentes en la proteína.

#### 4.4.- Ampliación del estudio a otros cationes divalentes

Con el objetivo de ampliar el estudio a otros cationes divalentes, se realizan medidas de RP en 1/0,1 M de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$  y  $\text{NiCl}_2$ . Éstas se comparan con sus respectivos potenciales de difusión libre en la figura 4.9.

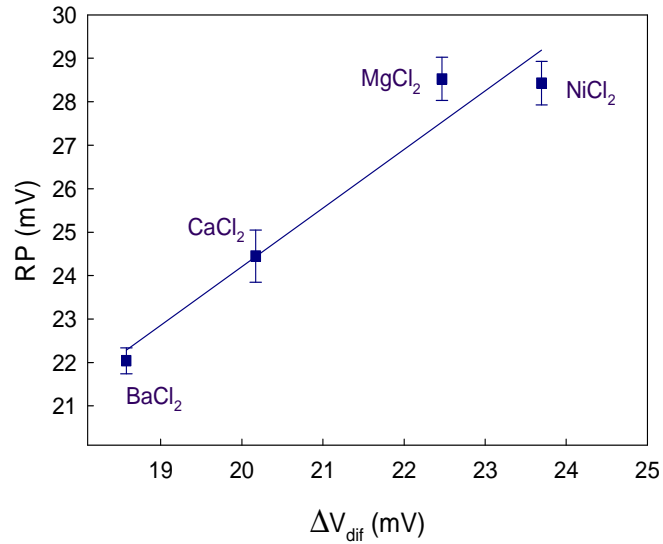


Fig. 4.9. Correlación entre las medidas del RP del canal OmpF en sales de cationes divalentes y el potencial de difusión en disolución libre a un gradiente de concentración 1/0,1 M.

La figura 4.9 muestra lo que se observaba para los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en los experimentos anteriores: existe una cierta correlación entre el potencial de difusión libre y el RP medido en las diversas sales divalentes. El efecto producido por dichos cationes se reproduce también para otros cationes divalentes, tales como  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . En el límite de bajas concentraciones de sal, en cambio, se espera que dicha correlación se rompa. Para comprobarlo, en la figura 4.10, se representan medidas del RP frente al potencial de difusión libre en 15/10 mM.

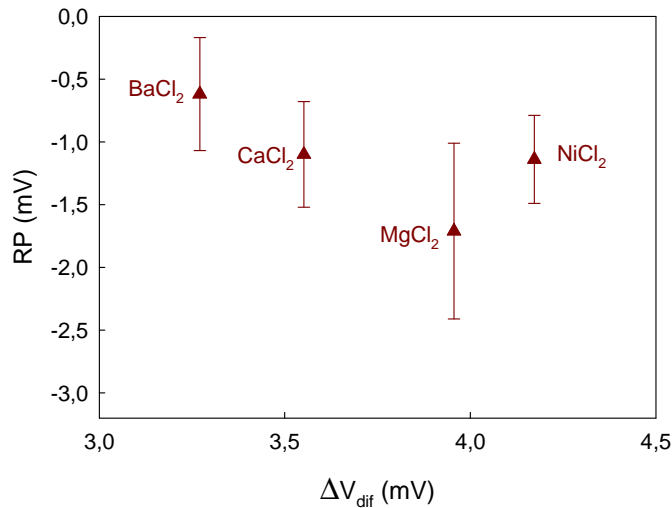


Fig. 4.10. Medidas del RP del canal OmpF en sales de cationes divalentes en función del potencial de difusión libre en 15/10 mM.

La selectividad del canal a concentraciones de sal divalente muy reducidas es catiónica, indicando que en esas condiciones los procesos de exclusión iónica dominan la selectividad del canal. Sin embargo, el criterio que manifiesta el canal para discriminar entre los distintos cationes divalentes no es evidente. Como se aprecia, el canal no distingue el transporte de cationes divalentes en función de sus movilidades. De hecho, en este caso, el canal manifiesta una selectividad menor por el Ba<sup>2+</sup>, el ión con mayor movilidad (ver tabla A1.1), lo que confirma la posible existencia de un fenómeno de *binding* de cationes divalentes en la proteína [Eisenman 1962].

#### 4.5.- Discusión y conclusiones

En disoluciones de KCl la selectividad del canal OmpF está controlada casi exclusivamente por su carga fija. El potencial de difusión del KCl es muy pequeño y por eso su contribución a la medida es irrelevante. En otras disoluciones donde el potencial de difusión del electrolito es considerable (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>,...), la selectividad está determinada no sólo por los efectos debidos a la exclusión de iones en su interacción con la proteína sino también por la diferente movilidad de los aniones y los cationes del electrolito en disolución.

En este capítulo se ha analizado la influencia de la difusión sobre la selectividad del canal. El potencial de difusión libre, calculado mediante la ecuación de Planck, proporciona un límite inferior del potencial de difusión real generado por los iones de la disolución. Esto ha permitido interpretar las medidas del RP del canal en términos de una carga neta efectiva actuando sobre los iones. Los resultados sugieren que en disoluciones de cationes monovalentes el canal tiene una carga fija negativa que genera una exclusión electrostática de los aniones de la disolución. En disoluciones de cationes divalentes, en cambio, no se aprecian apenas procesos de exclusión electrostática de aniones, si no es a muy bajas concentraciones de sal.

El efecto de los cationes divalentes es disminuir la influencia electrostática de la carga fija del canal de manera que, a concentraciones moderadas de sal, el transporte de iones a través del canal está dominado principalmente por un proceso difusivo. La cuestión que surge entonces es la siguiente: ¿qué ha pasado con la carga fija negativa del canal en presencia de cationes divalentes? Todo parece indicar que los cationes divalentes tienen la capacidad de neutralizarla o, incluso, de sobrecompensarla, con la consiguiente aparición de un fenómeno de inversión de carga, pero su origen no tiene una explicación trivial. En principio, podría tratarse de interacciones específicas entre los cationes divalentes y la proteína o correlaciones de contracciones en la superficie del poro. Todo apunta a un fenómeno de *binding* de cationes divalentes en la proteína, posibilidad factible a la luz de la resolución de la estructura cristalográfica del canal OmpF en una disolución de  $\text{MgCl}_2$ , que muestra la presencia de un ión de  $\text{Mg}^{2+}$  localizado entre los residuos ácidos de la zona del estrechamiento del canal [Yamashita 2008].

## Capítulo 5

---

### **Inversión de la carga de un canal iónico por iones multivalentes**



## 5.1.- Introducción

El canal OmpF, a *pH* neutro, pasa de ser selectivo a cationes en sales de cationes monovalentes a ser selectivo a aniones en disoluciones con cationes divalentes. Los resultados del capítulo anterior indican que la causa de esa inversión en la selectividad no es únicamente el efecto de la difusión de las sales divalentes (cuyo potencial de difusión libre es del orden de decenas de milivoltios y favorece el transporte de aniones frente a cationes). Los experimentos apuntan más bien a que el efecto de los cationes divalentes es neutralizar o sobrecompensar la carga del canal [Alcaraz 2009]. La cuestión que surge entonces es si, en presencia de cationes divalentes, se produce un fenómeno de inversión de carga en el canal.

Un fenómeno de inversión de carga ocurre cuando una superficie cargada atrae contraiones en exceso de su propia carga nominal [Greberg 1998, Levin 2002, Lyklema 2006, Faraudo 2007]. Estudiado por Troelstra [Lyklema 2006] y Bungenberg de Jong [Grosberg 2002] hace más de 50 años, este fenómeno se ha observado en vesículas lipídicas, coloides, monocapas de Langmuir, membranas de nanofiltración, polielectrolitos flexibles y otros nanodispositivos sintéticos que están en contacto con una disolución acuosa que contiene iones multivalentes [Grosberg 2002, García-Aleman 2004, Lyklema 2006, Gracheva 2007, Labbez 2007]. No tiene un origen universalmente aceptado pero existen varias teorías al respecto que tratan de dar una explicación basada en la existencia de una cierta afinidad entre los iones multivalentes y las superficies cargadas mediante diferentes mecanismos. Tradicionalmente el fenómeno de inversión de carga se ha explicado en términos de interacciones químicas específicas (no coulombicas) entre los iones y las superficies cargadas mediante enlaces de puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, formación de complejos u otras interacciones relacionadas con la estructura del disolvente [Lyklema 2006, Faraudo 2007, Lyklema 2009a, Lyklema 2009b]. Estas interacciones específicas se asocian a características del ión, por lo que iones de la misma valencia podrían interaccionar de manera diferente [Lyklema 2009b]. Un enfoque alternativo sostiene que el fenómeno de la inversión de carga se produce mediante un mecanismo genérico universal basado en correlaciones espaciales entre los contraiones próximos a la superficie cargada [Shklovskii 1999, Grosberg 2002, Quesada-Pérez 2003, Faraudo 2007].

En el caso del canal OmpF, a la luz de los resultados obtenidos en el capítulo anterior y en base a la presencia de un ión  $Mg^{2+}$  en su estructura, una vez se resuelve ésta en una disolución 1 M  $MgCl_2$  [Yamashita 2008], es factible que exista cierta afinidad entre los iones divalentes y la proteína. La localización del ión  $Mg^{2+}$  en el bucle L3 que forma el estrechamiento del canal puede ser clave para determinar el origen de esa afinidad. En concreto, determinados residuos de dicho bucle aparecen en la estructura rodeando al ión y aparentemente manteniendo su posición. El objetivo de este capítulo es estudiar la participación de esos residuos en el fenómeno de *binding* sugerido por los experimentos y aclarar si, como consecuencia de este fenómeno, es viable que se produzca una inversión de la carga neta de la proteína [García-Giménez 2009b].

## 5.2.- Influencia de los residuos D113 y E117 sobre la selectividad del canal OmpF

En la tabla 5.1 se exponen medidas del RP del canal OmpF en 1/0,1 M de disoluciones de cationes con diferente valencia. Dichas medidas se comparan con el potencial de difusión libre de la sal, calculado mediante la ecuación de Planck (ecuación 1.9).

	RP (mV)	$\Delta V_{dif}$ (mV)
<b>KCl</b>	$-25,4 \pm 0,8$	1,0
<b>NaCl</b>	$-18,7 \pm 1,1$	12,2
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	$22,1 \pm 0,7$	20,1
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	$28,5 \pm 0,8$	22,4
<b>LaCl<sub>3</sub></b>	$42,8 \pm 1,2$	21,3

Tabla 5.1. Medidas del RP del canal OmpF a *pH* 6 en 1/0,1 M y valor del potencial de difusión libre.

De la comparación del RP con el potencial de difusión libre en la tabla 5.1, se puede suponer que existe una moderada contribución del potencial de difusión del



electrolito a la medida del RP en sales de cationes monovalentes. En sales de cationes divalentes, en cambio, la contribución del potencial de difusión se intuye que debe ser crucial, determinando casi totalmente la selectividad del canal. En  $\text{LaCl}_3$ , por otra parte, el RP medido sobrepasa el doble del potencial de difusión libre, lo que indica una posible inversión de la carga del canal en este caso.

Que la medida del RP del canal  $\text{OmpF}$  coincida prácticamente con el potencial de difusión libre del electrolito divalente es una evidencia experimental de la neutralización de la carga por los iones divalentes [Alcaraz 2009]. Estos resultados y la presencia de un ión  $\text{Mg}^{2+}$  en la estructura cristalográfica del canal [Yamashita 2008] sugieren la existencia de un fenómeno de *binding* de cationes divalentes en la proteína. En este sentido, la localización concreta en la estructura del ión  $\text{Mg}^{2+}$  podría ser crucial. En la figura 5.1 se muestra la imagen de una sección del canal extraída del trabajo original en el que la estructura se resolvía en una disolución de  $\text{MgCl}_2$  [Yamashita 2008].

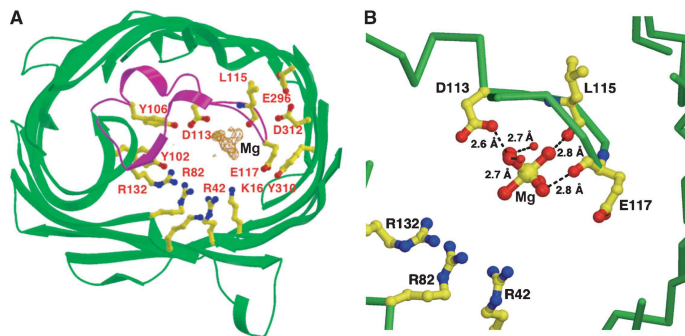


Fig. 5.1. (A) Estructura del canal  $\text{OmpF}$  resuelta en 1 M  $\text{MgCl}_2$ , mostrando un ión  $\text{Mg}^{2+}$  entre los residuos D113 y E117 del bucle L3 (en magenta). (B) Coordinación de los oxígenos de los residuos D113, E117 y L115 respecto al ión  $\text{Mg}^{2+}$ .

Como se aprecia en la figura 5.1, el ión  $\text{Mg}^{2+}$  está ubicado entre los residuos ácidos D113 y E117 del bucle L3, en la zona del estrechamiento del canal. Por su localización, estos residuos ácidos en concreto tienen un papel crucial en las propiedades funcionales del canal  $\text{OmpF}$ . Así lo sugieren los resultados de algunas simulaciones computacionales [Danelon 2003] y numerosos estudios experimentales al respecto [Nestorovich 2003, Vrouenraets 2006, Yamashita 2008, López 2009]. Para conocer el papel de estos residuos en el *binding* de cationes divalentes, se estudian dos

mutantes del canal OmpF en los que dichos residuos se sustituyen por otros mediante mutagénesis directa [Vrouenraets 2006]. La sustitución de cada uno de los residuos ácidos D113 y E117 por una cisteína (C) origina el mutante D113C/E117C (CC) y el resultado de sustituirlos por una arginina (R) es el mutante D113R/E117R (RR). En la figura 5.2 se muestra la distribución de las cargas residuales en el estrechamiento del canal OmpF en su forma nativa (también llamado *wild type* (WT)) y en cada uno de los mutantes considerados.

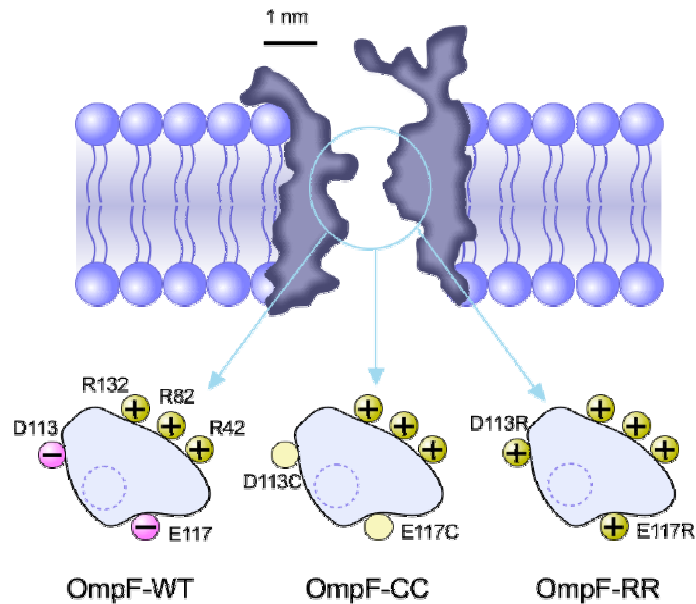


Fig. 5.2. Sección lateral del canal OmpF en una membrana lipídica. La sección transversal del estrechamiento del canal con sus residuos correspondientes en el canal nativo y en los mutantes CC y RR aparecen en la parte inferior. En ella un círculo dibujado con una línea discontinua señala la localización aproximada del ión  $Mg^{2+}$  en la estructura según la imagen de la figura 5.1.

A *pH* neutro, la cisteína no tiene carga eléctrica neta. Al haber sustituido dos residuos ácidos (de carga negativa) por dos residuos neutros, el mutante CC tiene un exceso de dos cargas positivas respecto al canal WT. Por otra parte, las argininas, que son residuos cargados positivamente, introducen en el mutante RR un exceso de cuatro cargas positivas respecto al canal WT. Para estudiar la influencia de los residuos D113 y E117 sobre la selectividad del canal, se realizan medidas del RP de

los canales WT, CC y RR en 1/0,1 M KCl. En la tabla 5.2 se exponen los resultados obtenidos.

Canal	$\Delta$ Carga	RP (mV) en KCl
WT	0	-25,4 $\pm$ 0,8
CC	+2	-23,8 $\pm$ 0,8
RR	+4	31,9 $\pm$ 1,0

Tabla 5.2. Medidas del RP del canal OmpF y diversos mutantes en 1/0,1 M KCl a *pH* 6.  $\Delta$ Carga es la carga neta del mutante relativa a la del canal nativo WT.

A la vista de los resultados de la tabla 5.2, el aumento relativo de dos cargas positivas en la zona estrecha del canal (mutante CC) no supone un cambio significativo para su selectividad en KCl. De hecho, desde un punto de vista electrostático, la pequeña variación de la selectividad observada puede estar asociada a una ligera variación de la carga neta del canal. Para probar esta hipótesis se realizan medidas del RP del canal nativo WT y del mutante CC en función del *pH* en KCl.

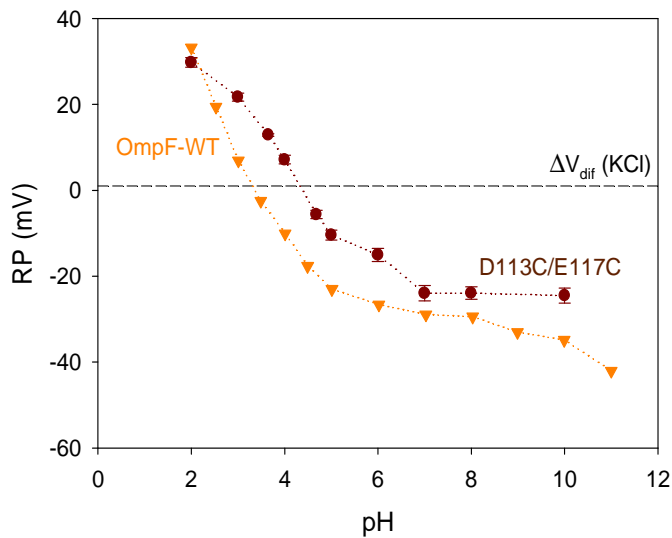


Fig. 5.3. Medidas del RP de los canales WT y CC en función del *pH* en 1/0,1 M KCl.

La figura 5.3 muestra evidencias de una ligera diferencia de carga en ambos canales. De acuerdo con el hecho de que el mutante CC tiene una magnitud de carga negativa menor que la del canal WT, el mutante manifiesta una selectividad a aniones más intensa que la del canal nativo en el rango de *pH* ácido. Por las mismas razones, a *pH* neutro y básico, la selectividad a cationes del mutante CC es menos intensa que la del canal WT.

El hecho de haber eliminado dos cargas negativas en el estrechamiento del canal parece ser irrelevante respecto a la naturaleza de su selectividad. Las medidas del RP del mutante son compatibles, en términos electrostáticos, con una reducción de la magnitud de la carga fija neta negativa del poro. En contrapartida, cuando el estrechamiento del canal tiene cuatro cargas positivas en exceso (mutante RR), la selectividad experimenta un cambio brusco. El canal pasa de ser selectivo a cationes (canal WT) a ser selectivo a aniones (mutante RR). Suponiendo que en KCl la selectividad del mutante RR está controlada principalmente por interacciones electrostáticas (del mismo modo que ocurre con WT), la selectividad aniónica observada proviene de una carga neta positiva del canal.

### 5.3.- Influencia de los residuos D113 y E117 sobre el *binding* de cationes divalentes

Para estudiar el papel de los residuos D113 y E117 en el *binding* de cationes divalentes, se realizan las medidas que se muestran en la tabla 5.3.

Canal	$\Delta$ Carga	RP (mV) en CaCl <sub>2</sub>
WT	0	22,1 ± 0,7
CC	+2	30,1 ± 1,1
RR	+4	35,4 ± 1,7

Tabla 5.3. Medidas del RP del canal OmpF y diversos mutantes en 1/0,1 M CaCl<sub>2</sub> a *pH* 6.  $\Delta$ Carga es la carga neta del mutante relativa a la del canal nativo WT.

Los datos de la tabla 5.3 revelan que el mutante CC invierte su selectividad en presencia de cationes Ca<sup>2+</sup>. De hecho, en CaCl<sub>2</sub> dicho mutante manifiesta una

selectividad a aniones considerablemente mayor que la del canal WT, superando con creces el potencial de difusión libre del electrolito (de aproximadamente 20 mV), haciendo evidente también la presencia de un fenómeno de *binding* de cationes divalentes. La carga de los residuos D113 y E117, por lo tanto, no es tampoco relevante para que el *binding* de cationes divalentes tenga lugar. Esto descarta la posibilidad de atribuir una naturaleza puramente coulombica a este fenómeno y da lugar a especular sobre si su origen es estructural.

En la figura 5.4 se amplía el estudio de la selectividad de los dos canales a un rango mayor de gradientes de concentración.

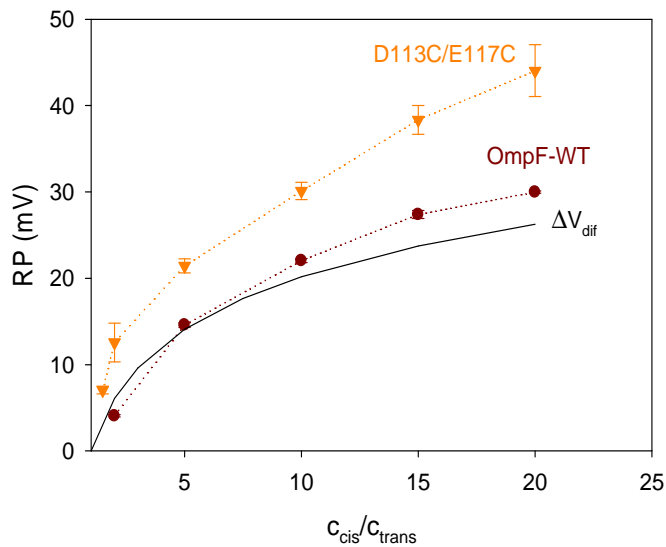


Fig. 5.4. Medidas del RP de los canales WT y CC en  $CaCl_2$  a  $pH$  6 en función del gradiente de concentración.

La estimación teórica del potencial de difusión libre, de acuerdo con la expresión de Planck, se incluye en la figura 5.4 para evaluar la contribución del potencial de difusión a las medidas del RP. En el caso del canal nativo, aunque las medidas superan ligeramente la estimación teórica no es posible asegurar que tenga lugar una inversión de la carga del canal, pues no se conoce en qué medida el valor real de los coeficientes de difusión de los iones de la sal al atravesar el canal difieren de los tabulados para disolución libre [Alcaraz 2009, López 2009]. En cambio, el incremento de la selectividad aniónica del mutante CC respecto a la del canal WT y su alejado valor del potencial de difusión libre es un indicio de que existe una

exclusión electrostática de cationes que contribuye a la selectividad del canal. La selectividad aniónica del canal en este caso puede asociarse a la influencia electrostática de una carga neta positiva sobre los iones de la disolución. En este mutante es factible considerar, por lo tanto, un fenómeno de inversión de carga.

A diferencia de WT y CC, el mutante RR es selectivo a aniones tanto en KCl como en CaCl<sub>2</sub>. Se resumen los resultados para este mutante en la tabla 5.4.

Canal	RP (mV) en KCl	RP (mV) en CaCl <sub>2</sub>
RR	31,9 ± 1,0	35,4 ± 1,7

Tabla 5.4. Medidas del RP del mutante RR en 1/0,1 M KCl y CaCl<sub>2</sub> a pH 6.

La ligera diferencia entre el valor del RP del mutante RR medido en KCl y en CaCl<sub>2</sub> hace suponer que en divalentes no únicamente los efectos difusionales de los iones contribuyen a la selectividad del canal (uno esperaría una selectividad aniónica mayor que la que manifiesta el canal en CaCl<sub>2</sub>, del orden de los 20 mV correspondientes al potencial de difusión de la sal divalente). Sin embargo, hay que percatarse que la concentración de cloruro en la disolución divalente es el doble que la que hay en la disolución monovalente. Este exceso de concentración iónica podría apantallar la carga del canal, reduciendo la selectividad respecto de la que se esperaría a la mitad de concentración.

#### 5.4.- Efecto del *binding* de cationes divalentes sobre la selectividad

La figura 5.5 muestra medidas del RP en función de la concentración manteniendo un gradiente de concentración constante de CaCl<sub>2</sub>. De esta forma, se mantiene constante también la contribución difusional a la medida del RP, lo que permite analizar únicamente el efecto de la concentración de sal sobre los procesos de exclusión iónica del canal.

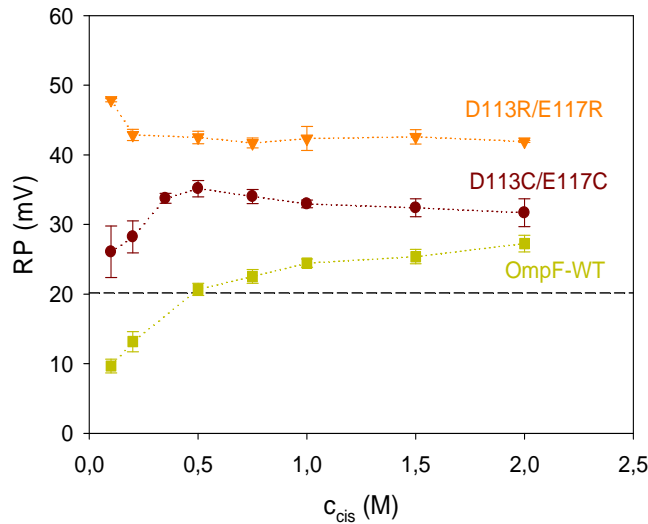


Fig. 5.5. Medidas del RP de los canales WT, CC y RR en CaCl<sub>2</sub> en función de la concentración absoluta en el lado *cis*, manteniendo un gradiente de concentración  $c_{cis}/c_{trans} = 10$ . El potencial de difusión libre calculado con la ecuación de Planck se incluye mediante la línea horizontal.

En el caso del canal WT, tal y como se comentaba en el capítulo anterior, la tendencia del RP con la concentración absoluta es un indicio de que existe un proceso de neutralización de la carga del canal. A bajas concentraciones el RP es menor que el potencial de difusión, lo cual significa que en esas condiciones el canal retiene parte de su carga fija negativa. Aumentar la concentración de sal produce un aumento en el RP, lo que sugiere que la interacción de cationes divalentes con la proteína tiene el efecto de compensar gradualmente la carga del canal. Se observa también un ligero incremento del RP sobre el potencial de difusión libre, pero no se puede asegurar si este incremento representa una sobrecompensación de la carga del canal o es que la difusión real difiere de la calculada en disolución libre. En definitiva, los datos disponibles para el canal WT son consistentes con un canal casi neutro donde la exclusión electrostática es una fuente secundaria de selectividad y los efectos difusionales predominan cuantitativa y cualitativamente. En el mutante RR la dependencia de la selectividad con la concentración del canal es compatible con un fenómeno de apantallamiento de la carga del canal, considerando que éste tiene una carga neta positiva. A medida que aumenta la concentración de sal, el canal va perdiendo selectividad (en este caso aniónica), como si su carga fuera apantallándose

gradualmente. En este caso, no se puede decir nada respecto a un posible *binding* de cationes en el canal.

En el caso del mutante CC se aprecia un comportamiento diferente a los otros dos casos. A baja concentración la tendencia del RP con la concentración es cualitativamente la misma que en el canal WT pero con una diferencia cuantitativa crucial: a bajas concentraciones las medidas del RP coinciden prácticamente con las del potencial de difusión libre calculadas para el  $\text{CaCl}_2$ . Las medidas del RP alcanzan un máximo (hasta un factor 2 por encima del potencial de difusión libre) a un gradiente de concentración 0,5/0,05 M y, a partir de entonces disminuyen al aumentar la concentración. Esta dependencia sigue un patrón que recuerda a la tendencia cualitativa de las medidas del RP del mutante RR. Este comportamiento bimodal sugiere que puede haber dos efectos principales contribuyendo a la selectividad total del mutante CC en direcciones opuestas. Por una parte, a bajas concentraciones de sal el mutante es prácticamente neutro. Los cationes divalentes en ese caso no experimentan exclusión electrostática alguna y pueden entrar fácilmente en el canal e interactuar con las cargas superficiales. El incremento de la selectividad con la concentración sugiere que el *binding* de cationes se impone como fuente principal de la exclusión iónica. Como consecuencia, se produce una acumulación de los cationes sobre la superficie interna del canal proporcionándole a este una carga neta positiva. Debido a la acumulación de carga positiva, a medida que aumenta la concentración de iones en disolución, el mutante excluye electrostáticamente a los cationes divalentes cada vez con más intensidad, favoreciendo el paso de los aniones y reflejando una selectividad mayor. Cuando los efectos de exclusión producidos por el exceso de carga positiva impiden la entrada de nuevos cationes divalentes al canal, deja de tener lugar el *binding* de cationes divalentes y al aumentar la concentración de sal el mutante va disminuyendo su selectividad, de acuerdo con un proceso de apantallamiento electrostático de la nueva carga del canal.

## 5.5.- Ampliación del estudio a otras sales multivalentes

Los resultados anteriores realizados para  $\text{CaCl}_2$  evidencian la presencia de un fenómeno de *binding* de cationes  $\text{Ca}^{2+}$  en el canal OmpF y en el mutante CC. La estructura cristalográfica que muestra un ión divalente en el interior del canal, en cambio, está resuelta para la sal divalente  $\text{MgCl}_2$ . Con el objetivo de generalizar el



fenómeno de *binding* a los iones multivalentes, se realizan medidas de RP para WT y CC en diversas sales divalentes ( $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ) y en una sal trivalente ( $\text{LaCl}_3$ ). En la tabla 5.5 se resumen los resultados obtenidos.

Sal 1/0,1 M	$\Delta V_{\text{dif}}$ (mV)	RP (mV) de WT	RP (mV) de CC
$\text{BaCl}_2$	19,0	22,0 $\pm$ 0,3	29,7 $\pm$ 1,9
$\text{CaCl}_2$	20,1	24,5 $\pm$ 0,7	32,9 $\pm$ 1,1
$\text{NiCl}_2$	23,7	28,4 $\pm$ 0,5	42,9 $\pm$ 1,0
$\text{MgCl}_2$	22,4	28,5 $\pm$ 0,8	44,0 $\pm$ 2,9
$\text{LaCl}_3$	21,3	42,8 $\pm$ 1,2	48,7 $\pm$ 0,5

Tabla 5.5. Medidas del RP de los canales WT y CC a *pH* 6 en 1/0,1 M de diversas sales multivalentes.

Los datos de la tabla 5.5 muestran que el potencial de difusión libre de todas las sales divalentes estudiadas es aproximadamente un 80 % de la medida del RP del canal WT y entre un 50 y un 60 % de la medida del RP del mutante CC. Por otra parte, la inversión de la carga en ambos canales parece evidente en el caso en que éstos se rodean de una disolución de  $\text{LaCl}_3$ , puesto que el RP medido en ambos casos supera en dos veces el valor del potencial de difusión libre de la sal. El fenómeno de *binding* de cationes se manifiesta en presencia de las diferentes sales multivalentes estudiadas. La valencia del catión de la sal, además, parece que intensifica el efecto del fenómeno.

En función de la concentración, el *binding* determina la cantidad de carga efectiva del canal. Al aumentar la concentración, la acumulación de cationes sobre la superficie es mayor y la exclusión electrostática del canal se hace más intensa. Por esa razón, la dependencia de la selectividad con la concentración absoluta de la sal es opuesta a la que sigue un proceso de apantallamiento electrostático (figura 5.5). Puesto que el *binding* se produce en todas las sales multivalentes estudiadas, es de esperar una dependencia similar del RP de los canales WT y CC con la concentración absoluta a la de la figura 5.5. Para probar esto, se realizan medidas del RP de ambos canales en función de la concentración absoluta de  $\text{MgCl}_2$ . Los datos se representan en la figura 5.1.

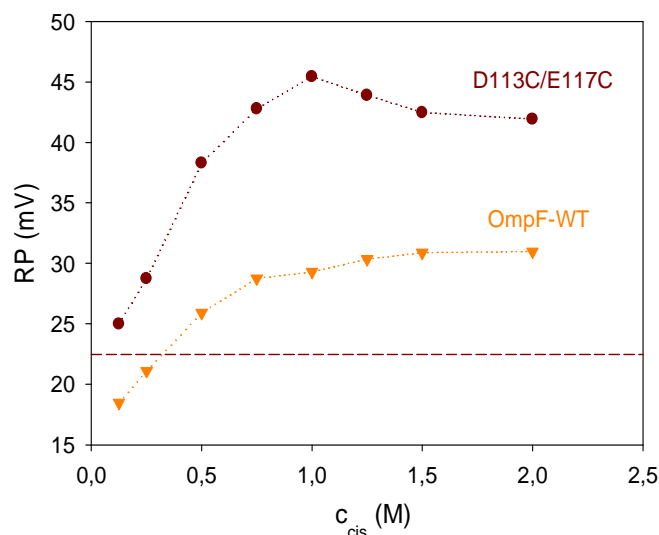


Fig. 5.6. Medidas del RP de los canales WT y CC en  $MgCl_2$  en función de la concentración absoluta en el lado *cis*, manteniendo un gradiente de concentración  $c_{cis}/c_{trans} = 10$ .

A la vista de los datos de la tabla 5.5 y de la figura 5.6 es evidente que el *binding* de cationes divalentes en el canal es un fenómeno general de los cationes multivalentes. La valencia del catión, además, parece ser crucial en la intensidad del fenómeno. Mientras que el efecto de los cationes monovalentes en el canal responde a un proceso de apantallamiento electrostático [Alcaraz 2004], los cationes trivalentes parece que son capaces incluso de invertir la carga del sistema.

## 5.6.- Aplicación de las teorías de inversión de carga

En una superficie cargada descrita por un modelo de doble capa eléctrica, la inversión de carga puede introducirse desde una perspectiva química y una perspectiva física [Lyklema 2006]. Ambos enfoques explican el fenómeno en función de la naturaleza discreta de las cargas de la superficie y las correlaciones electrostáticas entre partículas cargadas [Grosberg 2002].

El enfoque químico del fenómeno considera la posibilidad de que ciertas regiones de la superficie presenten una cierta afinidad química distinta para cada especie iónica, apareciendo correlaciones transversales entre los iones y las cargas de la superficie [Lyklema 2006, Lyklema 2009a, Lyklema 2009b]. Cada tipo de ión que se

enlaza a los grupos de la superficie posee una constante de afinidad que depende de propiedades de los iones tales como el tamaño, la estructura, la lipofilidad y la valencia. Asumiendo una constante de afinidad  $K$  con la superficie para un ión de valencia  $z$ , la densidad de carga superficial en la capa de Stern (incluyendo los contraiones enlazados en ella),  $\sigma$ , viene dada por la ecuación 5.1.

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = \frac{1 - zKc}{1 + Kc} \quad (5.1)$$

donde  $c$  es la concentración de la especie iónica y  $\sigma_0$  es la densidad de carga superficial original.

La ecuación 5.1 se puede introducir en el modelo de doble capa eléctrica como una condición de contorno de la ecuación de Poisson-Boltzmann. La solución de esta ecuación en ese caso incluye la constante de afinidad  $K$  como parámetro libre. Para que el fenómeno de la inversión de carga tenga lugar es necesario que  $\sigma/\sigma_0 < 0$ , es decir que, según la ecuación 5.1, la concentración ha de ser mayor que la inversa de la constante de afinidad ( $c > 1/K$ ) [Travesset 2006, Faraudo 2007]. Además, si únicamente intervienen interacciones coulombicas, la afinidad química de los iones con la superficie se puede también interpretar en términos electrostáticos a partir de la teoría de pares Bjerrum generalizada para electrolitos [Ebeling 1968, Travesset 2006]. En ese contexto, la constante de afinidad depende esencialmente de la densidad de carga superficial y de algunas características estructurales, de acuerdo con la ecuación 5.2.

$$K = 4\pi \left( |z_+ z_-| l_B \right)^3 G \left( \frac{|z_+ z_-| l_B}{r_0} \right) \quad (5.2)$$

donde  $G(x) = \int_2^x z^{-4} e^z dz$ ,  $r_0$  es la suma de los radios de los iones enlazados y las cargas superficiales,  $l_B$  es la longitud de Bjerrum, cuyo valor en agua es 0,71 nm [Safran 1994], y los subíndices + y - hacen referencia a los cationes y aniones respectivamente.

Para que el *binding* ocurra, este modelo requiere que las cargas opuestas estén lo suficientemente cerca para ser atraídas más fuertemente que las fluctuaciones de desorden térmico. Es decir, la distancia entre los iones y las cargas de la interfase

no debe superar una cierta cantidad dada por  $|z_+z_-|l_B/2 \approx l_B$ . Según esta teoría, en el caso concreto del canal OmpF, teniendo en cuenta que el diámetro del estrechamiento del canal es del orden de la longitud de Bjerrum, la distancia entre los contraiones y la superficie es lo suficientemente pequeña para que tenga lugar el *binding* de cationes divalentes y la correspondiente inversión de carga.

La perspectiva física del fenómeno de inversión de carga sostiene que hay un mecanismo electrostático universal detrás del fenómeno [Besteman 2004]. Los fundamentos teóricos de este mecanismo se basan en la existencia de correlaciones espaciales laterales entre los contraiones multivalentes próximos a la superficie. En la figura 5.7 se representan éstas y las anteriormente consideradas indicando el sentido de las interacciones en cada caso.

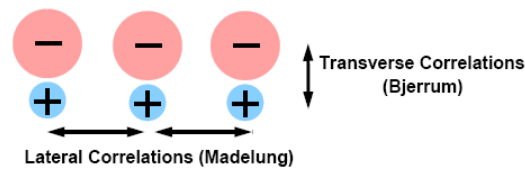


Fig. 5.7. Correlaciones transversales y laterales consideradas en distintas teorías de inversión de carga [Travesset 2006].

Las correlaciones laterales se incluyen en la teoría de la doble capa eléctrica eliminando la hipótesis de campo medio introducida por la ecuación de Poisson-Boltzmann y considerando el tamaño finito de los iones [Nguyen 2000, Grosberg 2002, Quesada-Pérez 2003, Faraudo 2007]. Estas correlaciones aparecen en la capa de Stern del modelo y su existencia se predice en función de la constante de acoplamiento de Coulomb,  $\Gamma$ , que se define por la ecuación 5.4.

$$\Gamma = \frac{z^2 e^2}{\epsilon R k_B T} = \frac{z^2 l_B}{R} \quad (5.4)$$

donde  $R$  es la separación lateral típica de la capa de Stern y viene dada por la ecuación 5.5.

$$R = \sqrt{\frac{ze}{\pi\sigma_0}} \quad (5.5)$$

La constante de acoplamiento depende básicamente de la densidad de carga de la superficie y de la valencia de los contraiones. Si  $\Gamma \sim 1$ , el acoplamiento de los iones con la superficie es débil. Valores de  $\Gamma \gg 1$  indican un acoplamiento fuerte.

En el caso del canal OmpF, el modelo de las correlaciones laterales no precisa más información que la densidad de carga de la superficie y la permitividad eléctrica del agua. Considerando un promedio de la densidad de carga superficial en el canal OmpF de  $1 \text{ e/nm}^2$  y una permitividad eléctrica del agua en disolución libre de 78 [Im 2002a, Alcaraz 2004, Aguilera-Arzo 2007], la constante de acoplamiento  $\Gamma$  que se obtiene para los cationes divalentes es de aproximadamente 4. Si además se tiene en cuenta que las propiedades dieléctricas del agua dentro del canal OmpF pueden diferir mucho de las de disolución libre y que, por lo tanto, la permitividad eléctrica efectiva  $\epsilon$  dentro podría tener un valor de 30 [Aguilera-Arzo 2009], la constante de acoplamiento  $\Gamma$  que se obtiene es de aproximadamente 10. En cualquier caso estos valores indican que los cationes divalentes podrían formar un líquido fuertemente correlacionado proporcionando la energía libre favorable para provocar inversión de carga.

Las teorías descritas aquí tratan de explicar cualitativamente el fenómeno de la inversión de la carga en cualquier sistema a partir de modelos relativamente simples como planos infinitos uniformemente cargados para las interfases, esferas representando a los iones o un medio dieléctrico continuo para el solvente [Greberg 1998]. En este marco, la densidad de carga superficial del sistema es el parámetro fundamental para predecir si en éste el fenómeno de la inversión de carga puede tener lugar. En ese sentido, las predicciones realizadas con estos modelos para el canal nativo OmpF, pueden extenderse a los mutantes CC y RR, puesto que la diferencia en la densidad de carga superficial en todos ellos es mínima. Por lo tanto, según los modelos considerados de la inversión de carga, los tres canales deberían manifestar este fenómeno. Sin embargo, los experimentos indican que la pequeña variación de la carga del canal influye considerablemente en la intensidad del fenómeno del *binding*. Además, la evidencia experimental va más allá, pues la eliminación de dos cargas negativas en el canal OmpF (mutante CC) no manifiesta una atenuación del fenómeno del *binding* sino todo lo contrario. En el mutante CC el *binding* parece ser más intenso, pues se aprecia con mayor claridad que tiene lugar la inversión de la carga neta efectiva del canal.

## 5.7.- Discusión y conclusiones

Existen evidencias experimentales de que se produce una compensación gradual de la carga fija del canal OmpF en una concentración moderada de disolución divalente, sugiriendo la existencia de un fenómeno de *binding* de cationes divalentes [Alcaraz 2009]. El paralelismo encontrado entre las medidas del RP y los valores calculados del potencial de difusión libre induce dos interpretaciones distintas. Una de ellas es que el canal OmpF, en presencia de cationes divalentes, se neutraliza y el transporte de iones a través de él es compatible con un proceso puramente difusivo. La otra interpretación es que los cationes divalentes sobrecompensan la carga del canal llegando a invertir su signo. Puesto que no se conoce en qué medida pueden variar los coeficientes de difusión de los iones dentro del canal y, por lo tanto también el potencial de difusión del electrolito al cruzarlo [López 2009], no es posible saber si las diferencias encontradas entre el RP y el potencial de difusión libre es un efecto de la difusión de la sal o es un efecto del *binding*. Para ser capaces de observar inversión de carga sin ninguna ambigüedad ha sido necesario realizar experimentos con mutantes.

Los mutantes fueron escogidos en función de la localización concreta de un ión  $Mg^{2+}$  en la estructura cristalográfica del canal, resuelta en  $MgCl_2$  [Yamashita 2008]. El ión  $Mg^{2+}$  aparece situado entre los residuos ácidos D113 y E117 del bucle L3, en la zona del estrechamiento del canal. Se eligieron, por lo tanto, mutantes en los que dichos residuos se sustituyen por otros mediante mutagénesis directa: el mutante CC, que implica la sustitución de los residuos ácidos considerados por cisteínas, y el mutante RR, en el que los residuos ácidos se sustituyen por argininas. Los mutantes WT y CC no manifiestan una selectividad muy distinta uno del otro ni en disoluciones monovalentes ni en disoluciones divalentes. Eso pone de manifiesto que la neutralización de las cargas negativas presentes en el estrechamiento del canal no tiene un efecto crítico en cuanto a su selectividad ni al efecto del *binding* de cationes divalentes (lo que descarta un origen electrostático del fenómeno). Todo apunta, más bien, a una reducción de la intensidad de los procesos de exclusión electrostática provocada por la reducción de la magnitud de la carga neta negativa del canal. Únicamente cuando todos los residuos del estrechamiento son positivos el canal manifiesta una fuerte exclusión a los cationes y una consecuente selectividad

por los aniones, que puede estar provocada por una carga neta efectiva positiva del canal.

Los experimentos con mutantes indican que para observar sin ambigüedad inversión de carga, ha sido necesario disminuir la carga negativa del canal. El efecto de los cationes divalentes sobre la exclusión iónica del mutante CC cuando la inversión de carga ha tenido lugar (de negativa a positiva) es aumentar su intensidad hasta que, por sí misma, ésta impide la entrada de nuevos cationes divalentes al canal y el *binding* deja de tener efecto. A partir de entonces el mutante manifiesta un apantallamiento electrostático de la carga efectiva del canal [García-Giménez 2009b].

Para los actuales modelos de inversión de carga, las correlaciones entre iones son la base fundamental del *binding* de iones multivalentes en una superficie cargada. El parámetro esencial para interpretar estas correlaciones en términos electrostáticos es la densidad de carga superficial del sistema [Grosberg 2002, Lyklema 2006]. La estructura de la superficie cargada es secundaria, por lo que las características cualitativas básicas de muchos sistemas de interfase pueden ser interpretadas a partir de modelos idealizados como planos cargados uniformemente, esferas y cilindros, iones como esferas rígidas cargadas o considerando que el solvente es un continuo dieléctrico [Greberg 1998, Grosberg 2002]. Asimismo, la simplicidad del modelo no permite realizar una comparación cuantitativa con experimentos particulares [Besteman 2004]. Además, la imagen simplificada de una superficie negativa cargada homogéneamente fácilmente accesible para cationes divalentes es de dudosa aplicación en una estructura compleja como la de un canal iónico. En el caso concreto del canal OmpF, las cargas positivas y negativas están dispuestas de manera heterogénea a lo largo de la superficie interna del poro proporcionando en total una carga neta positiva, opuesta a la que se requiere para que tenga lugar un fenómeno de *binding* de cationes divalentes. Únicamente si se tienen en cuenta también los residuos enterrados en el entorno proteico se puede explicar la selectividad del canal por los cationes monovalentes [Aguilella-Arzo 2007]. Pero estas cargas enterradas en el entorno proteico, de baja permitividad eléctrica, son inaccesibles a los cationes multivalentes. En un escenario así, no es fácil definir la densidad de carga superficial exigida en los modelos de inversión de carga para determinar si existe la posibilidad de que el fenómeno tenga lugar. Además, el nivel de detalle necesario para racionalizar las observaciones experimentales del canal OmpF y sus mutantes dificulta una interpretación basada únicamente en la densidad

de carga superficial. Es por ello quizás que los modelos actuales no son capaces de predecir correctamente si, a priori, un canal iónico puede experimentar inversión de carga o no. De hecho, los experimentos sugieren que el origen del *binding* en el canal OmpF debe incluir factores estructurales, como, por ejemplo, la coordinación específica de los cationes divalentes con algunos grupos funcionales de la proteína.



# Conclusiones

---



Las conclusiones de esta memoria son el producto de dos tipos de experimentos que muestran dos aspectos diferentes del transporte iónico a través del canal OmpF. Los experimentos en KCl variando el  $pH$  sugieren que el canal regula el transporte de iones principalmente mediante las interacciones electrostáticas de éstos con sus cargas fijas. En ese escenario, modificar la carga de ambos lados del canal de manera independiente es posible cambiando el  $pH$  de las disoluciones adyacentes. La aplicación de un modelo continuo electrostático es factible en este caso y resulta útil para interpretar los datos experimentales obtenidos. Bajo un gradiente de  $pH$ , el canal adquiere una distribución asimétrica de su carga eléctrica que origina una rectificación de la corriente y, en casos concretos de bipolaridad, una selectividad direccional.

Los experimentos en disoluciones multivalentes revelan una imagen distinta del canal. Por una parte, estos experimentos destacan el hecho de que la difusión iónica puede tener un papel muy importante sobre la selectividad del canal en condiciones diferentes de las fisiológicas. Por otra parte, las interacciones electrostáticas que eran dominantes en condiciones fisiológicas no son significativas. Esto sugiere que, en este caso, deben existir interacciones no coulombicas entre los cationes multivalentes y los grupos funcionales de la proteína. En esta memoria se ha hecho alusión a estas interacciones empleando el término *binding site*, pero éste es todavía un concepto abstracto, puesto que no se conoce con precisión cuál es la causa que lo produce [Grosberg 2002].

En realidad los dos aspectos del canal son las caras de una misma moneda. A lo largo de la memoria se ha podido comprobar que el fenómeno *binding* es más intenso cuanto mayor es la valencia de los contraiones de la disolución [García-Giménez 2009b]. Por lo tanto, incluso en disoluciones de KCl, el canal no está exento de presentar *binding sites* de cationes aunque su efecto no se aprecie de forma significativa. De hecho, simulaciones de dinámica molecular usando la estructura del canal OmpF [Im 2002b] y experimentos realizados a altas concentraciones de sales de iones monovalentes [López 2009] sugieren que un fenómeno de *binding* de cationes monovalentes puede tener lugar en el canal.

A causa del fenómeno de *binding*, el efecto de los iones multivalentes va más allá del apantallamiento electrostático de la carga fija del canal. Los iones de la disolución parecen compensarla progresivamente posibilitando incluso que ésta llegue a invertir su signo [Alcaraz 2009]. Este fenómeno es ampliamente conocido en

el ámbito de las interfases de superficies planas, donde es posible interpretarlo en función únicamente de la carga superficial, suponiendo la existencia de correlaciones transversales o laterales entre contraiones [Lyklema 2006]. Sin embargo, la interpretación del fenómeno en un canal iónico no es trivial [García-Giménez 2009b]. El poro se compone, no sólo de los residuos ionizables accesibles directamente a la disolución, sino también de una gran cantidad de residuos enterrados que contribuyen de igual modo a sus propiedades de transporte [Aguilella-Arzo 2007]. Además, los experimentos con mutantes sugieren que el fenómeno puede también tener un origen estructural. En ese contexto, la interpretación de la inversión de la carga en un canal iónico no se reduce sólo al conocimiento de la carga eléctrica superficial [García-Giménez 2009b]. Es necesario estudiar la influencia de otros factores para descubrir el origen del fenómeno.

El estudio de la regulación electrostática del canal OmpF abre un amplio abanico de posibles aplicaciones. El funcionamiento de los canales iónicos como nanodispositivos electrónicos sugiere aplicaciones tecnológicas a nivel microscópico, bien integrando sistemas biológicos en sistemas electrónicos, bien optimizando los sistemas artificiales imitando los biológicos [Fulinski 2004, Schiedt 2005]. En concreto, la rectificación de la corriente del canal OmpF bajo un gradiente de  $pH$  lo hace funcionar como un diodo, en el cuál se puede modular el grado de rectificación y el balance de carga de ambos lados [Alcaraz 2006]. Un sistema biológico con esas características es especialmente interesante en el campo de la biotecnología y la informática donde se valoran cada vez más los sistemas de almacenamiento de datos de alta densidad y aquellos dispositivos nanométricos que son capaces de mejorar la velocidad de la eléctrica.

Pero quizás lo más importante de conocer el funcionamiento de los canales iónicos es la gran relevancia biológica que ello supone. En este trabajo en particular, reproducir las condiciones del entorno habitual de la bacteria en la naturaleza permite conocer algo más sobre la configuración estructural del poro y su función dentro de la célula. La selectividad direccional observada en el canal OmpF bajo un gradiente de  $pH$ , por ejemplo, sugiere que existe una función reguladora de la concentración iónica dependiente del  $pH$  extracelular. Una pequeña variación de éste determina la selectividad iónica del canal OmpF (a cationes o a aniones) [García-Giménez 2009b]. La presencia en la proteína de *binding sites* de cationes multivalentes, por otro lado, también da lugar a especular sobre la función del canal OmpF en la célula. En

presencia de cationes divalentes el canal pasa de ser selectivo a cationes a ser selectivo a aniones y va desapareciendo el efecto electrostático de la carga fija del canal. Sin embargo, las consecuencias del comportamiento del canal en las diferentes condiciones aquí estudiadas no son evidentes, puesto que éste no es el único medio de transporte de materia en la célula. Haría falta estudiar la función cooperativa de todos los elementos de la membrana externa de la bacteria *Escherichia coli* para poder sacar conclusiones al respecto.



# **Apéndice 1**

---

## **Contribución del potencial de unión líquida a las medidas de selectividad**





En una interfase, las diferentes movilidades de los cationes y aniones que forman una sal originan que ambos se difundan a diferente velocidad. Esto produce una separación de carga local y, como consecuencia, aparece en la interfase una diferencia de potencial. Esta diferencia de potencial se conoce como potencial de unión líquida o LJP (por el acrónimo de su nombre en inglés Liquid Junction Potencial) [Bockris 1970].

En la técnica de reconstitución de canales iónicos es necesario el uso de electrodos reversibles de Ag/AgCl cubiertos de un puente salino para realizar medidas de conductancia y RP. Al poner los electrodos en contacto con las disoluciones adyacentes al canal, surgen una serie de interfases en el sistema que es necesario considerar [Barry 1970, Barry 1991, Neher 1992a, Barry 1994]. La figura A1.1 muestra un esquema ilustrativo de tales interfases.

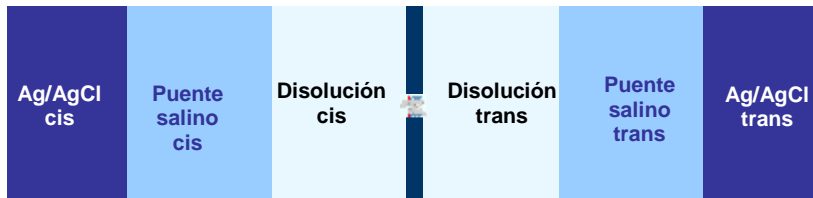


Figura A1.1. Interfases líquidas presentes durante la realización de medidas de corriente y voltaje a través de un canal iónico al usar electrodos de Ag/AgCl con un puente salino.

Las primeras interfases que aparecen en el sistema se originan entre cada uno de los electrodos de Ag/AgCl y los puentes salinos que los cubren. En estas interfases se genera una diferencia de potencial causada por las distintas actividades del cloruro en la superficie de los electrodos y el puente. La contribución de esta diferencia de potencial a una medida experimental es nula, puesto que, al ser los dos puentes idénticos, el potencial generado en la interfase de uno de los electrodos se compensa con el generado en la del otro.

Las otras interfases del sistema se originan entre cada uno de los puentes de los electrodos y las disoluciones adyacentes al canal. En estas interfases aparecen también unas diferencias de potencial que contribuyen a la medida experimental del potencial de corriente cero,  $V_{exp}$ , tal y como muestra la ecuación A1.1.

$$V_{exp} = (V_{P_{cis}} - V_{cis}) + (V_{cis} - V_{trans}) + (V_{trans} - V_{P_{trans}}) \quad (A1.1)$$

donde  $V_{P_{cis}} - V_{cis}$  y  $V_{trans} - V_{P_{trans}}$  son los LJP generados en las interfases de los puentes salinos con las disoluciones en cis y en trans, respectivamente, y  $V_{cis} - V_{trans}$  es el potencial que se genera entre los lados del canal (el RP del canal).

La medida experimental del potencial tiene, por lo tanto, dos contribuciones: el RP y la suma de los LJP generados en ambos lados del canal,  $V_{LJ}$ . El valor del RP del canal es entonces el resultado de sustraer el LJP a la medida experimental, tal y como expresa la ecuación A1.2.

$$RP = V_{exp} - V_{LJ} \quad (A1.2)$$

En las medidas de conductancia, las disoluciones *cis* y *trans* son iguales. En ese caso, los LJP que aparecen en las interfases electrodo-disolución de ambos lados son idénticos y de signo opuesto, de manera que los LJP en ambos lados se cancelan entre sí y la contribución a la medida experimental es nula,  $V_{LJ} = 0$ . Las medidas de RP, en cambio, implican condiciones asimétricas entre los lados del canal. En este caso, el LJP total no es nulo y conviene tenerlo en cuenta.

Experimentalmente, el valor del LJP generado en el sistema es difícil de determinar. Sin embargo, puede calcularse teóricamente mediante la ecuación de Henderson [Henderson 1907], que viene dada por la expresión A1.3.

$$V_I - V_D = -\frac{RT}{F} \frac{\sum_i z_i D_i (c_{i,I} - c_{i,D})}{\sum_i z_i^2 D_i (c_{i,I} - c_{i,D})} \ln \left( \frac{\sum_i z_i^2 D_i c_{i,I}}{\sum_i z_i^2 D_i c_{i,D}} \right) \quad (A1.3)$$

donde los subíndices *I* y *D* hacen referencia a los lados izquierdo y derecho de la interfase, respectivamente, y  $D_i$  son los coeficientes de difusión de los iones.

La ecuación de Henderson parte de la expresión del flujo iónico de Nernst-Planck. Proporciona el potencial de difusión que aparece en una interfase cuando hay un gradiente de concentración.

Para calcular el valor del LJP mediante la ecuación de Henderson es necesario introducir los valores de los coeficientes de difusión de los iones. Estos

valores estan determinados por la concentración de sal en la disolución. No obstante, como su determinación en función de la concentración no es una tarea fácil, se suelen usar los coeficientes de difusión en disolución libre. En la tabla A1.1 se presentan los valores de los coeficientes de difusión libre para algunos iones medidos en experimentos de electrocinética [Robinson 1957].

	D ( $\times 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /s)
<b>Cationes monovalentes</b>	
Li <sup>+</sup>	1,03
Na <sup>+</sup>	1,33
K <sup>+</sup>	1,96
Cs <sup>+</sup>	2,06
Rb <sup>+</sup>	2,07
<b>Cationes divalentes</b>	
Mg <sup>2+</sup>	0,71
Ca <sup>2+</sup>	0,79
Ni <sup>2+</sup>	0,67
Ba <sup>2+</sup>	0,85
<b>Cationes trivalentes</b>	
La <sup>3+</sup>	0,61
<b>Aniones</b>	
Cl <sup>-</sup>	2,03

Tabla A1.1. Coeficientes de difusión en disolución libre de algunos iones [Robinson 1957].

El LJP depende básicamente de la concentración de las disoluciones y de la movilidad y la valencia de los iones. Esto se puede apreciar claramente en la figura A1.2, en la que se calculan las contribuciones del LJP a una medida de corriente cero en función del gradiente de concentración y del tipo de electrolito, considerando un puente salino 2 M KCl en los electrodos.

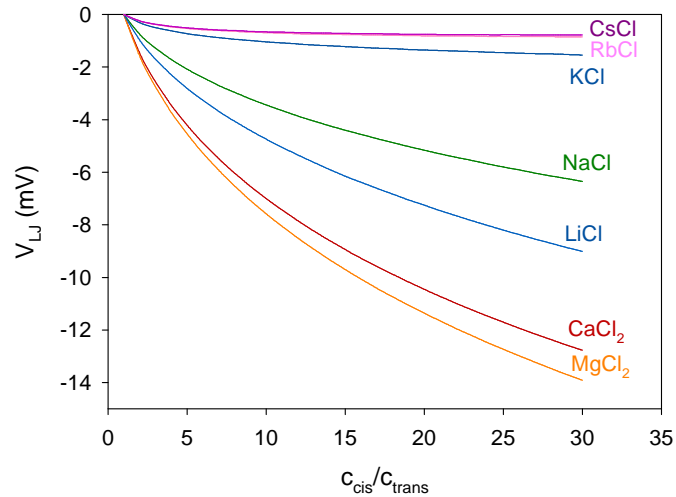


Figura A1.2 Valor del potencial de unión líquida total que se genera entre un puente salino 2 M KCl de unos electrodos en contacto con distintas disoluciones.

El LJP es un potencial de difusión que depende del logaritmo del cociente de concentraciones y por lo tanto su valor es mayor cuanto mayor es el gradiente de concentración en la interfase. En disoluciones como el KCl, CsCl y RbCl, en las que la diferencia entre la movilidad del catión y del anión es insignificante, la contribución máxima del LJP a la medida es muy pequeña ( $\sim 1$  mV) independientemente de los gradientes de concentración empleados (ver figura A1.2). Respecto de los valores típicos del RP en canales iónicos (del orden de las decenas de milivoltios), la contribución de los LJP en estas disoluciones puede considerarse despreciable. A medida que la relativa movilidad de los cationes del electrolito respecto de los aniones se hace mayor, el valor del LJP es también mayor (NaCl, LiCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>). La contribución del LJP a la medida experimental en estos casos es considerable. La figura A1.3 da una idea de la contribución del LJP a una medida experimental real del RP del canal OmpF en diversas sales en 0,1/2 M.

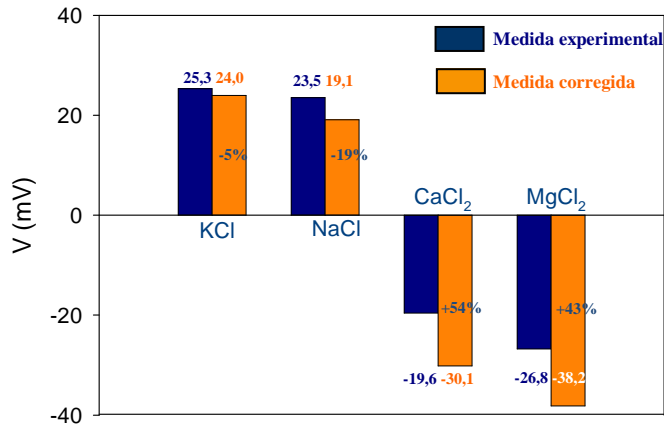


Fig. A1.3. Comparación del valor de la medida experimental del potencial y del valor corregido con el LJP que se genera entre el puente salino 2 M KCl de unos electrodos en contacto con 0,1/2 M de KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. El porcentaje que aparece sobre la medida corregida viene dado por  $100(V_e - V_c)/V_e$ , donde  $V_e$  es el potencial experimental medido y  $V_c$  el potencial una vez corregido.

La figura A1.3 muestra una contribución del LJP de apenas un 5% del valor de la medida en disoluciones de KCl, de un 19% en NaCl y de un 54% y el 43% en CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>, respectivamente.

El LJP total generado en las interfaces electrodos-disolución depende, no solo de las concentraciones de las disoluciones, sino también de la concentración de los puentes salinos. A modo de ejemplo, en la figura A1.4 se exponen los LJP calculados en distintas sales considerando puentes salinos de los electrodos más diluidos, de 0,01 M KCl.

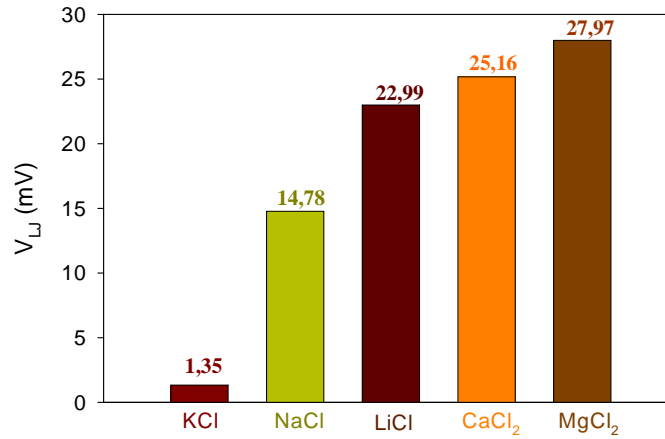


Figura A1.4. Valor del potencial de unión líquida total que se genera entre un puente salino 0,01 M KCl de unos electrodos en contacto con 2/0,1 M de distintas disoluciones de KCl, NaCl, LiCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>.

Las contribuciones del LJP de las interfases electrodos-disolución son mayores con puentes salinos más diluidos.

El uso de la ecuación de Henderson para determinar el valor de los LJP introduce algunas limitaciones. Por ejemplo, su deducción supone una distribución espacial lineal de la concentración de los iones durante su difusión por la interfase, es decir, una distribución dada por la ecuación A1.4.

$$\frac{dc_i(x)}{dx} \approx \frac{\Delta c_i}{\Delta x} \quad (\text{A1.4})$$

Por otro lado, el uso de coeficientes de difusión en disolución libre para la determinación de los LJP limita su aplicación a unas condiciones ideales del sistema sin considerar determinados efectos que pueden tener lugar dentro del canal [López 2009].

Una forma de evaluar si la ecuación de Henderson es adecuada para calcular los LJP del sistema es realizando medidas del potencial de corriente cero empleando diferentes concentraciones en los puentes salinos y el RP y comparar el valor resultante de la corrección correspondiente. El RP así determinado ha de ser independientemente de la concentración salina utilizada en el puente. La tabla A1.2

contiene una serie de medidas experimentales del potencial de corriente cero,  $V_{exp}$ , empleando diferentes puentes salinos de KCl y las correspondientes correcciones con el LJP.

	$c_{KCl}$ en el puente salino (M)	$V_{exp}$ (mV)	$V_{LJ}$ (mV)	RP (mV)
<b>3/0,1 M KCl</b>	2	$-26,9 \pm 2,3$	-1,5	<b><math>-25,3 \pm 2,3</math></b>
	0,1	$-26,5 \pm 2,1$	-1,5	<b><math>-25,0 \pm 2,1</math></b>
	0,01	$-26,0 \pm 1,6$	-1,5	<b><math>-24,5 \pm 1,6</math></b>
<b>3/0,1 M NaCl</b>	2	$-22,6 \pm 0,7$	-6,3	<b><math>-16,3 \pm 0,7</math></b>
	0,1	$-28,7 \pm 0,5$	-13,4	<b><math>-15,3 \pm 0,5</math></b>
	0,01	$-32,2 \pm 0,9$	-16,8	<b><math>-15,4 \pm 0,9</math></b>
<b>2/0,1 M NaCl</b>	2	$-22,1 \pm 0,4$	-5,1	<b><math>-16,9 \pm 0,4</math></b>
	0,1	$-27,0 \pm 0,1$	-11,5	<b><math>-15,5 \pm 0,1</math></b>
	0,01	$-30,8 \pm 0,3$	-14,7	<b><math>-16,1 \pm 0,3</math></b>
<b>1/0,1 M NaCl</b>	2	$-23,7 \pm 0,2$	-3,5	<b><math>-20,1 \pm 0,2</math></b>
	0,1	$-28,1 \pm 0,4$	-8,4	<b><math>-19,7 \pm 0,4</math></b>
	0,01	$-31,1 \pm 0,8$	-11,1	<b><math>-20,0 \pm 0,8</math></b>
<b>2/0,1 M CaCl<sub>2</sub></b>	2	$21,4 \pm 0,8$	-10,4	<b><math>31,8 \pm 0,8</math></b>
	0,1	$8,0 \pm 0,4$	-21,0	<b><math>29,0 \pm 0,4</math></b>
	0,01	$4,6 \pm 1,5$	-25,0	<b><math>29,6 \pm 1,5</math></b>

Tabla A1.2. Medidas de selectividad en el canal OmpF usando electrodos con puentes de diferentes concentraciones de KCl en diversas disoluciones.

Es interesante comprobar en la tabla A1.2 cómo la discrepancia en las medidas del potencial realizadas con distintos puentes salinos desaparece una vez se corrigen con los LJP correspondientes, calculados mediante la ecuación de Henderson, proporcionando un valor coherente del RP del canal. Esto se aprecia con mayor asombro en disoluciones como el NaCl y el CaCl<sub>2</sub>, donde con un puente salino de 0,01 M KCl, la contribución del LJP representa el 91% y el 85% del RP, respectivamente, y demuestra la validez de la ecuación de Henderson para determinar los LJP.

Los cálculos realizados con la ecuación de Henderson introducen la posibilidad de conocer previamente los valores de las contribuciones de los LJP al

potencial experimental. Con esta información uno puede elaborar puentes salinos cuya composición minimice la contribución de los LJP en función de las disoluciones empleadas durante la realización de la medida.

En la tabla A1.2 también se observa que, cuando el puente salino y la disolución contienen ambos KCl, los datos experimentales muestran una aparente independencia de la concentración del puente y los LJP también. Para comprobar esa independencia se realizan cálculos de LJP considerando diferentes disoluciones y diferentes puentes salinos y se exponen en la tabla A1.3.

Electrolito en el puente	C <sub>puente</sub> (M)	V <sub>LJ</sub> (1/0,1 M) (mV)				
		KCl	NaCl	LiCl	RbCl	CsCl
KCl	2	<b>-1,04</b>	-3,44	-4,74	-0,66	-0,69
	1	<b>-1,04</b>	-4,42	-6,28	-0,51	-0,56
	0,1	<b>-1,04</b>	-8,40	-12,71	0,06	-0,04
NaCl	2	-9,46	<b>-12,32</b>	-13,88	-9,01	-9,05
	1	-8,40	<b>-12,32</b>	-14,50	-7,78	-7,88
	0,1	-4,42	<b>-12,32</b>	-16,97	-3,24	-3,34
LiCl	2	-14,48	-17,62	<b>-19,33</b>	-13,98	-14,03
	1	-12,71	-16,97	<b>-19,33</b>	-12,05	-12,11
	0,1	-6,28	-14,50	<b>-19,33</b>	-5,06	-5,17
RbCl	2	0,21	-2,13	-3,39	<b>0,58</b>	0,54
	1	0,06	-3,24	-5,06	<b>0,58</b>	0,53
	0,1	-0,51	-7,78	-12,05	<b>0,58</b>	0,48
CsCl	2	0,10	-2,25	-3,51	0,47	<b>0,43</b>
	1	-0,04	-3,34	-5,17	0,48	<b>0,43</b>
	0,1	-0,56	-7,84	-12,11	0,53	<b>0,43</b>

Tabla A1.3. Cálculo del potencial de unión líquida total en 1/0,1 M de diferentes disoluciones salinas y con electrodos de diferentes puentes salinos.

Efectivamente, tal y como se aprecia en la tabla A1.3, el LJP calculado en una interfase electrodos-disolución donde únicamente difunden los iones de un electrolito, no depende de la concentración.



# Referencias

---



- Aguilella V. and Alcaraz A.** 2009. A fluid approach to simple circuits. *Nature Nanotechnology*. 4:403-404.
- Aguilella-Arzo M., Andrio A., Aguilera V. M. and Alcaraz A.** 2009. Dielectric saturation of water in a membrane protein channel. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 11:358-365.
- Aguilella-Arzo M., García-Celma J. J., Cervera J., Alcaraz A. and Aguilera V. M.** 2007. Electrostatic properties and macroscopic electrodiffusion in OmpF porin and mutants. *Bioelectrochemistry*. 70:320-327.
- Aidley D. J. and Stanfield P. R.** 1996. Ion Channels. Cambridge University Press.
- Aksimentiev A. and Schulten K.** 2005. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map. *Biophys.J.* 88:3745-3761.
- Alberts B., Brandy D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.** 1996. Biología molecular de la célula. 3rd Ed. Omega.
- Alcaraz A., Ramirez P., García-Giménez E., López M. L., Andrio A. and Aguilera V. M.** 2006. A pH-tunable nanofluidic diode: Electrochemical rectification in a reconstituted single ion channel. *J Phys Chem B*. 110:21205-21209.
- Alcaraz A., Aguilera-Arzo M., Nestorovich E., Aguilera V. M. and Bezrukov S. M.** 2004. Asymmetry of OmpF probed by reversal potential measurements. *Biophys.J.* 86:466A-466A.
- Alcaraz A., Nestorovich E. M., López M. L., García-Giménez E., Bezrukov S. M. and Aguilera V. M.** 2009. Diffusion, Exclusion, and Specific Binding in a Large Channel: A Study of OmpF Selectivity Inversion. *Biophys.J.* 96:56-66.
- Alcaraz A., Nestorovich E. M., Aguilera-Arzo M., Aguilera V. M. and Bezrukov S. M.** 2004. Salting out the ionic selectivity of a wide channel: The asymmetry of OmpF. *Biophys.J.* 87:943-957.
- Alcaraz A., Ramírez P., Mafé S., Holdik H. and Bauer B.** 2000. Ion selectivity and water dissociation in polymer bipolar membranes studied by membrane potential and current-voltage measurements. *Polymer*. 41:6627-6634.
- Allen T. W., Kuyucak S. and Chung S. H.** 2000. Molecular dynamics estimates of ion diffusion in model hydrophobic and KcsA potassium channels. *Biophys.Chem.* 86:1-14.

- Antosiewicz J, McCammon JA and Gilson MK.** 1996. The determinants of  $pK_a$ s in proteins. *Biochemistry (N.Y.)*. 35:7819-7833.
- Antosiewicz J, McCammon JA and Gilson MK.** 1994. Prediction of Ph-Dependent Properties of Proteins. *J.Mol.Biol.* 238:415-436.
- Armijo J. A., Florez J. and Mediavilla Á.** 1992. Farmacología humana. 2nd Ed. Masson, S.A. Barcelona
- Armstrong C. M.** 1992. Voltage-Dependent Ion Channels and their Gating. *Physiol.Rev.* 72:S5-S13.
- Armstrong C. M.** 1971. Interaction of Tetraethylammonium Ion Derivatives with Potassium Channels of Giant Axons. *J.Gen.Physiol.* 58:413-437.
- Arseniev A. S., Barsukov I. L., Bystrov V. F., Lomize A. L. and Ovchinnikov Y. A.** 1985. H-1-Nmr Study of Gramicidin-a Transmembrane Ion Channel - Head-To-Head Right-Handed, Single-Stranded Helices. *FEBS Lett.* 186:168-174.
- Avanti lipids.** 2009. <http://avantilipids.com/>.
- Barry P. H.** 2006. The reliability of relative anion-cation permeabilities deduced from reversal (dilution) potential measurements in ion channel studies. *Cell Biochem.Biophys.* 46:143-154.
- Barry P. H.** 1994. Jpcalc, a Software Package for Calculating Liquid-Junction Potential Corrections in Patch-Clamp, Intracellular, Epithelial and Bilayer Measurements and for Correcting Junction Potential Measurements. *J.Neurosci.Methods.* 51:107-116.
- Barry P. H. and Lynch J. W.** 1991. Liquid Junction Potentials and Small-Cell Effects in Patch-Clamp Analysis. *J.Membr.Biol.* 121:101-117.
- Barry P. H. and Diamond J. M.** 1970. Junction Potentials, Electrode Standard Potentials, and Other Problems in Interpreting Electrical Properties of Membranes. *J.Membr.Biol.* 3:93-122.
- Bashford D. and Karplus M.** 1990.  $pK_a$ s of Ionizable Groups in Proteins - Atomic Detail from a Continuum Electrostatic Model. *Biochemistry (N.Y.)*. 29:10219-10225.
- Benz R. and Bauer K.** 1988. Permeation of Hydrophilic Molecules through the Outer-Membrane of Gram-Negative Bacteria - Review on Bacterial Porins. *European Journal of Biochemistry.* 176:1-19.

- Benz R., Schmid A. and Voscheperkeuter G. H.** 1987. Mechanism of Sugar-Transport through the Sugar-Specific Lamb Channel of Escherichia-Coli Outer-Membrane. *J.Membr.Biol.* 100:21-29.
- Benz R., Schmid A. and Hancock R. E. W.** 1985. Ion Selectivity of Gram-Negative Bacterial Porins. *J.Bacteriol.* 162:722-727.
- Benz R., Janko K., Boos W. and Lauger P.** 1978. Formation of Large, Ion-Permeable Membrane Channels by Matrix Protein (Porin) of Escherichia-Coli. *Biochim.Biophys.Acta.* 511:305-319.
- Besteman K., Zevenbergen M. A. G., Heering H. A. and Lemay S. G.** 2004. Direct observation of charge inversion by multivalent ions as a universal electrostatic phenomenon. *Phys.Rev.Lett.* 93:170802.
- Bezrukov S. M. and Vodyanoy I.** 1993. Probing Alamethicin Channels with Water-Soluble Polymers - Effect on Conductance of Channel States. *Biophys.J.* 64:16-25.
- Bockris J. and Reddy A.** 1970. Modern Electrochemistry 1: Ionics. *2nd Ed.* Plenum Corporation. New York
- Braden C. and Tooze J.** 1999. Introduction to Protein Structure. *2nd Ed.* Garland. New York
- Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S. and Karplus M.** 1983. Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry.* 4:187-217.
- Cervera J., Schiedt B., Neumann R., Mafé S. and Ramírez P.** 2006. Ionic conduction, rectification, and selectivity in single conical nanopores. *J.Chem.Phys.* 124:
- Cervera J., Schiedt B. and Ramirez P.** 2005. A Poisson/Nernst-Planck model for ionic transport through synthetic conical nanopores. *Europhys.Lett.* 71:35-41.
- Cervera J., Alcaraz A., Schiedt B., Neumann R. and Ramírez P.** 2007. Asymmetric selectivity of synthetic conical nanopores probed by reversal potential measurements. *Journal of Physical Chemistry C.* 111:12265-12273.
- Chen D., Lear J. and Eisenberg B.** 1997. Permeation through an open channel: Poisson-Nernst-Planck theory of a synthetic ionic channel. *Biophys.J.* 72:97-116.
- Chimerel C., Movileanu L., Pezeshki S., Winterhalter M. and Kleinekathöfer U.** 2008. Transport at the nanoscale: Temperature dependence of ion conductance. *European Biophysics Journal.* 38:121-125.

- Chiu S. W. and Jakobsson E.** 1989. Stochastic-Theory of Singly Occupied Ion Channels .2. Effects of Access Resistance and Potential Gradients Extending into the Bath. *Biophys.J.* 55:147-157.
- Chun K. Y., Mafe S., Ramirez P. and Stroeve P.** 2006. Protein transport through gold-coated, charged nanopores: Effects of applied voltage. *Chemical Physics Letters.* 418:561-564.
- Chung S. H., Hoyles M., Allen T. and Kuyucak S.** 1998. Study of ionic currents across a model membrane channel using Brownian dynamics. *Biophys.J.* 75:793-809.
- Coalson R. D., Kurnikova M. G., Graf P. and Nitzan A.** 2002. Brownian dynamics studies of ion permeation through biological channels. *Biophys.J.* 82:1653.
- Corry B., Kuyucak S. and Chung S. H.** 2000. Invalidity of continuum theories of electrolytes in nanopores. *Chemical Physics Letters.* 320:35-41.
- Corry B., Hoyles M., Allen T. W., Walker M., Kuyucak S. and Chung S. H.** 2002. Reservoir boundaries in Brownian dynamics simulations of ion channels. *Biophys.J.* 82:1975-1984.
- Cowan S. W., Garavito R. M., Jansonius J. N., Jenkins J. A., Karlsson R., Konig N., Pai E. F., Pauptit R. A., Rizkallah P. J., Rosenbusch J. P., Rummel G. and Schirmer T.** 1995. The Structure of OmpF Porin in a Tetragonal Crystal Form. *Structure.* 3:1041-1050.
- Cowan S. W.** 1993. Bacterial Porins - Lessons from 3 High-Resolution Structures. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 3:501-507.
- Cowan S. W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Pauptit R. A., Jansonius J. N. and Rosenbusch J. P.** 1992. Crystal-Structures Explain Functional-Properties of Two Escherichia-Coli Porins. *Nature.* 358:727-733.
- Crozier P. S., Rowley R. L., Holladay N. B., Henderson D. and Busath D. D.** 2001. Molecular dynamics simulation of continuous current flow through a model biological membrane channel. *Phys.Rev.Lett.* 86:2467-2470.
- Daiguji H., Oka Y. and Shirono K.** 2005. Nanofluidic diode and bipolar transistor. *Nano Letters.* 5:2274-2280.
- Danelon C., Suenaga A., Winterhalter M. and Yamato I.** 2003. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophys.Chem.* 104:591-603.

- Davis ME, Madura JD, Luty BA and McCammon JA.** 1991. Electrostatics and Diffusion of Molecules in Solution - Simulations with the University-Of-Houston-Brownian Dynamics Program. *Comput.Phys.Commun.* 62:187-197.
- Dekker C.** 2007. Solid-state nanopores. *Nature Nanotechnology.* 2:209-215.
- Delcour A. H.** 2003. Solute uptake through general porins. *Frontiers in Bioscience.* 8:D1055-D1071.
- Doyle D. A., Cabral J. M., Pfuetzner R. A., Kuo A. L., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T. and MacKinnon R.** 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* 280:69-77.
- Drenth J.** 1999. Principles of Protein X-Ray Crystallography. *2nd Ed.* Springer Advanced Texts in Chemistry. Springer Verlag, New York
- Ebeling W.** 1968. Theory of Bjerrum Ion Association in Electrolytes. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Leipzig.* 238:400-402.
- Eisenberg B.** 2000. *Channels, Receptors and Transporters.* Chapter 4. Biophysics Textbook On Line.
- Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M. and Wall R.** 1984. Analysis of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot. *J.Mol.Biol.* 179:125-142.
- Eisenberg R. S.** 1999. From structure to function in open ionic channels. *J.Membr.Biol.* 171:1-24.
- Eisenberg R. S.** 1996a. Computing the field in proteins and channels. *J.Membr.Biol.* 150:1-25.
- Eisenberg R. S.** 1996b. Atomic biology, electrostatics and ionic channels. *New Developments and Theoretical Studies of Proteins.* 7:269-357.
- Eisenman G.** 1962. Cation Selective Glass Electrodes and their Mode of Operation. *Biophys.J.* 2:259-323.
- Faraudo J. and Travesset A.** 2007. The many origins of charge inversion in electrolyte solutions: Effects of discrete interfacial charges. *Journal of Physical Chemistry C.* 111:987-994.
- Finkelstein A.** 1984. Water-Movement through Membrane Channels. *Curr.Top.Membr.Transp.* 21:295-308.
- Fulinski A., Kosinska I. D. and Siwy Z.** 2004. On the validity of continuous modelling of ion transport through nanochannels. *Europhys.Lett.* 67:683-689.

- García-Aleman J. and Dickson J. M.** 2004. Permeation of mixed-salt solutions with commercial and pore-filled nanofiltration membranes: membrane charge inversion phenomena. *J.Membr.Sci.* 239:163-172.
- García-Giménez E., Alcaraz A., Aguilera V. M. and Ramírez P.** 2009a. Directional ion selectivity in a biological nanopore with bipolar structure. *J.Membr.Sci.* 331:137-142.
- García-Giménez E., Alcaraz A. and Aguilera V. M.** 2009b. Overcharging below the nanoscale: Multivalent cations reverse the ion selectivity of a biological channel. **Artículo enviado**
- Gasyna Z. L., Morales G. M., Sanchez A. and Yu L. P.** 2006. Asymmetric current-voltage characteristics of molecular junctions containing bipolar molecules. *Chemical Physics Letters.* 417:401-405.
- Gennis R. B.** 1989. Biomembranes: Molecular Structure and Function. Springer-Verlag. New York
- Gillespie D. and Eisenberg R. S.** 2002. Physical descriptions of experimental selectivity measurements in ion channels. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters.* 31:454-466.
- Goldman D. E.** 1944. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J.Gen.Physiol.* 27:37-60.
- Gracheva M. E. and Leburton J.** 2007. Electrolytic charge inversion at the liquid-solid interface in a nanopore in a doped semiconductor membrane. *Nanotechnology.* 18:145704.
- Greberg H. and Kjellander R.** 1998. Charge inversion in electric double layers and effects of different sizes for counterions and coions. *J.Chem.Phys.* 108:2940-2953.
- Griffiths J.** 2008. The realm of the nanopore. *Anal.Chem.* 80:23-27.
- Grosberg A. Y., Nguyen T. T. and Shklovskii B. I.** 2002. Colloquium: The physics of charge inversion in chemical and biological systems. *Reviews of Modern Physics.* 74:329-345.
- Healy K., Schiedt B. and Morrison A. P.** 2007. Solid-state nanopore technologies for nanopore-based DNA analysis. *Nanomedicine.* 2:875-897.
- Heckmann K., Schnaken J. and Lindeman B.** 1972. Current-Voltage Curves of Porous Membranes in Presence of Pore-Blocking Ions .1. Narrow Pores Containing no More than One Moving Ion. *Biophys.J.* 12:683-702.
- Helffferich F.** 1962a. Ion Exchange. McGraw-Hill. New York



- Helferich F.** 1962b. Ion-exchange kinetics. III. Experimental test of the theory of particle-diffusion controlled ion exchange. *J.Phys.Chem.* 66:39-44.
- Henderson P.** 1907. Thermodynamics of the liquid chain. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie--Stoichiometrie Und Verwandtschaftslehre.* 59:118-127.
- Higuchi A. and Nakagawa T.** 1987. Membrane-Potential and Permeation of Salts Across Bipolar Membranes. *J.Membr.Sci.* 32:267-280.
- Hille B.** 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. *3rd Ed.* Sinauer Associates Inc.
- Hille B.** 1973. Potassium Channels in Myelinated Nerve - Selective Permeability to Small Cations. *J.Gen.Physiol.* 61:669-686.
- Hille B.** 1972. Permeability of Sodium Channel to Metal Cations in Myelinated Nerve. *J.Gen.Physiol.* 59:637-658.
- Hille B.** 1971. Permeability of Sodium Channel to Organic Cations in Myelinated Nerve. *J.Gen.Physiol.* 58:599-619.
- Hille B.** 1967. Selective Inhibition of Delayed Potassium Currents in Nerve by Tetraethylammonium Ion. *J.Gen.Physiol.* 50:1287-1302.
- Hladky S. B. and Haydon D. A.** 1972. Ion Transfer Across Lipid-Membranes in Presence of Gramicidin-a .1. Studies of Unit Conductance Channel. *Biochim.Biophys.Acta.* 274:294-312.
- Hodgkin A. L. and Keynes R. D.** 1955. Active Transport of Cations in Giant Axons from Sepia and Loligo. *Journal of Physiology-London.* 128:28-60.
- Hodgkin A. L. and Huxley A. F.** 1952a. A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *Journal of Physiology-London.* 117:500-544.
- Hodgkin A. L. and Huxley A. F.** 1952b. Currents Carried by Sodium and Potassium Ions through the Membrane of the Giant Axon of Loligo. *Journal of Physiology-London.* 116:449-472.
- Hodgkin A. L. and Katz B.** 1949. The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity of the Giant Axon of the Squid. *Journal of Physiology-London.* 108:37-77.
- Hwang S., Chi Y. S., Lee B. S., Lee S. G., Choi I. S. and Kwak J.** 2006. pH-dependent rectification in self-assembled monolayers based on electrostatic interactions. *Chemical Communications.* 183-185.

- Im W. and Roux B.** 2002a. Ion permeation and selectivity of OmpF porin: A theoretical study based on molecular dynamics, brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory. *J.Mol.Biol.* 322:851-869.
- Im W. and Roux B.** 2002b. Ions and counterions in a biological channel: A molecular dynamics simulation of OmpF porin from Escherichia coli in an explicit membrane with 1 M KCl aqueous salt solution. *J.Mol.Biol.* 319:1177-1197.
- Im W., Seefeld S. and Roux B.** 2000. A Grand Canonical Monte Carlo-Brownian dynamics algorithm for simulating ion channels. *Biophys.J.* 79:788-801.
- International Union of Pharmacology.** 2009. <http://www.iuphar-db.org/IC/ReceptorFamiliesForward>.
- Jimbo T., Ramirez P., Tanioka A., Mafe S. and Minoura N.** 2000. Passive transport of ionic drugs through membranes with pH-dependent fixed charges. *J.Colloid Interface Sci.* 225:447-454.
- Jordan K. N., Oxford L. and O'Byrne C. P.** 1999. Survival of low-pH stress by Escherichia coli O157 : H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl.Environ.Microbiol.* 65:3048-3055.
- Kalman E. B., Vlasiouk I. and Siwy Z. S.** 2008. Nanofluidic bipolar transistors. *Adv Mater.* 20:293-+.
- Karshikoff A., Spassov V., Cowan S. W., Ladenstein R. and Schirmer T.** 1994. Electrostatic properties of two porin channels from Escherichia-Coli. *J.Mol.Biol.* 240:372-384.
- Kato M.** 1995. Numerical analysis of the Nernst-Planck-Poisson system. *Journal of Theoretical Biology.* 177:299-304.
- Koebnik R., Locher K. P. and Van Gelder P.** 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol.Microbiol.* 37:239-253.
- Krasilnikov O. V., Yuldasheva L. N., Merzlyak P. G., Capistrano M. F. P. and Nogueira R. A.** 1997. The hinge portion of the S-aureus alpha-toxin crosses the lipid bilayer and is part of the trans-mouth of the channel. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes.* 1329:51-60.
- Ku J. R., Lai S. M., Ileri N., Ramirez P., Mafe S. and Stroeve P.** 2007. pH and ionic strength effects on amino acid transport through Au-nanotubule membranes charged with self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry C.* 111:2965-2973.

- Kurnikova M. G., Coalson R. D., Graf P. and Nitzan A.** 1999. A lattice relaxation algorithm for three-dimensional Poisson-Nernst-Planck theory with application to ion transport through the gramicidin A channel. *Biophys.J.* 76:642-656.
- Labbez C., Nonat A., Pochard I. and Jonsson B.** 2007. Experimental and theoretical evidence of overcharging of calcium silicate hydrate. 309:303-307.
- Lakshminarayanaiah N.** 1984. Equations of Membrane Biophysics. Academic Press. New York
- Lakshminarayanaiah N.** 1969. Transport phenomena in membranes. Academic Press. New York
- Lanteri Y., Szymczyk A. and Fievet P.** 2008. Influence of steric, electric, and dielectric effects on membrane potential. *Langmuir.* 24:7955-7962.
- Levin Y.** 2002. Electrostatic correlations: from plasma to biology. *Reports on Progress in Physics.* 65:1577-1632.
- Li S. C., Hoyles M., Kuyucak S. and Chung S. H.** 1998. Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels. *Biophys.J.* 74:37-47.
- Li S. D., Wang C. C. and Chen C. Y.** 2008. Preparation and characterization of a novel bipolar membrane by plasma-induced polymerization. *J.Membr.Sci.* 318:429-434.
- Lindahl E., Hess B. and van der Spoel D.** 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling.* 7:306-317.
- OPM database.** 2005. <http://opm.phar.umich.edu/>.
- Lyklema J.** 2006. Overcharging, charge reversal: Chemistry or physics? *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects.* 291:3-12.
- Lyklema J.** 2009a. Quest for ion-ion correlations in electric double layers and overcharging phenomena. *Adv.Colloid Interface Sci.* 147-148:205-213.
- Lyklema J.** 2009b. Simple Hofmeister series. *Chemical Physics Letters.* 467:217-222.
- López M. L., Aguilera-Arzo M., Aguilera V. M. and Alcaraz A.** 2009. Ion Selectivity of a Biological Channel at High Concentration Ratio: Insights on Small Ion Diffusion and Binding. *J Phys Chem B.* 113:8745-8751.
- Madura JD, Briggs JM, Wade RC, Davis ME, Luty BA, Ilin A, Antosiewicz J, Gilson MK, Bagheri B, Scott LR and McCammon JA.** 1995. Electrostatics

and Diffusion of Molecules in Solution - Simulations with the University-Of-Houston Brownian Dynamics Program. *Comput.Phys.Commun.* 91:57-95.

**Mafé S. and Ramírez P.** 1997. Electrochemical characterization of polymer ion-exchange bipolar membranes. *Acta Polymerica.* 48:234-250.

**Mafé S., Pellicer J. and Aguilera V. M.** 1986. The Goldman Constant Field Assumption - Significance and Applicability Conditions. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics.* 90:476-479.

**Maier C., Bremer E., Schmid A. and Benz R.** 1988. Pore-Forming Activity of the Tsx Protein from the Outer-Membrane of Escherichia-Coli - Demonstration of a Nucleoside-Specific Binding-Site. *J.Biol.Chem.* 263:2493-2499.

**Malek K. and van Santen R. A.** 2008. Chiral separation in modified silica nanotube membranes: A molecular simulation study. *J.Membr.Sci.* 311:192-199.

**Miedema H., Vrouwenraets M., Wierenga J., Gillespie D., Eisenberg B., Meijberg W. and Nonner W.** 2006. Ca<sup>2+</sup> selectivity of a chemically modified OmpF with reduced pore volum. *Biophysical journal.* 91:4392-4400.

**Miedema H., Vrouwenraets M., Wierenga J., Meijberg W., Robillard G. and Eisenberg B.** 2007. A biological porin engineered into a molecular, nanofluidic diode. *Nano Letters.* 7:2886-2891.

**Miedema H., Meter-Arkema A., Wierenga J., Tang J., Eisenberg B., Nonner W., Hektor H., Gillespie D. and Meijberg W.** 2004. Permeation properties of an engineered bacterial OmpF porin containing the EEEE-locus of Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys.J.* 87:3137-3147.

**Mier M. P., Ibanez R. and Ortiz I.** 2008. Influence of ion concentration on the kinetics of electrodialysis with bipolar membranes. *Separation and Purification Technology.* 59:197-205.

**Molecular Devices.** 2009.

<http://www.moleculardevices.com/pages/software/pclamp.html>.

**Montal M. and Mueller P.** 1972. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of their Electrical Properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 69:3561-3566.

**Mueller P., Tien H. T., Wescott W. C. and Rudin D. O.** 1962. Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro. *Circulation.* 26:1167-1171.

**Narahashi T., Moore J. W. and Scott W. R.** 1964. Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. *J.Gen.Physiol.* 47:965-974.

- Neher E.** 1992a. Correction for Liquid Junction Potentials in Patch Clamp Experiments. *Meth.Enzymol.* 207:123-131.
- Neher E. and Sakmann B.** 1992b. The Patch Clamp Technique. *Sci.Am.* 266:44-51.
- Neher E. and Sakmann B.** 1976. Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle-Fibers. *Nature.* 260:799-802.
- Nestorovich E. M., Rostovtseva T. K. and Bezrukov S. M.** 2003. Residue ionization and ion transport through OmpF channels. *Biophys.J.* 85:3718-3729.
- Nestorovich E. M., Danelon C., Winterhalter M. and Bezrukov S. M.** 2002a. Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:9789-9794.
- Nestorovich E. M., Rostovtseva T. K. and Bezrukov S. M.** 2002b. Residue protonation, transport properties, and structural stability of OmpF channels. *Biophys.J.* 82:187A-187A.
- Nguyen T. T., Grosberg A. Y. and Shklovskii B. I.** 2000. Macroions in salty water with multivalent ions: giant inversion of charge. *Phys.Rev.Lett.* 85:1568-1571.
- Nikaido H.** 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67:593-656.
- Nikaido H.** 1993. Transport Across the Bacterial Outer-Membrane. *J.Bioenerg.Biomembr.* 25:581-589.
- Nishizawa M., Menon V. P. and Martin C. R.** 1995. Metal Nanotubule Membranes with Electrochemically Switchable Ion-Transport Selectivity. *Science.* 268:700-702.
- Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M. A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T. and Numa S.** 1984. Primary Structure of Electrophorus-Electricus Sodium-Channel Deduced from Cdna Sequence. *Nature.* 312:121-127.
- Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T. and Numa S.** 1982. Primary Structure of Alpha-Subunit Precursor of Torpedo-Californica Acetylcholine-Receptor Deduced from Cdna Sequence. *Nature.* 299:793-797.
- Oliver D., Baukrowitz T. and Fakler B.** 2000. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Biochemistry.* 267:5824-5829.

- Park M. K., Deng S. X. and Advincula R. C.** 2004. pH-sensitive bipolar ion-permeable ultrathin films. *J. Am. Chem. Soc.* 126:13723-13731.
- Parsegian V. A.** 1969. Energy of an Ion Crossing a Low Dielectric Membrane - Solutions to 4 Relevant Electrostatic Problems. *Nature*. 221:844-846.
- Pellicer J., Mafe S. and Aguilera V. M.** 1986. Ionic Transport Across Porous Charged Membranes and the Goldman Constant Field Assumption. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*. 90:867-872.
- Perram J. W. and Stiles P. J.** 2006. On the nature of liquid junction and membrane potentials. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 8:4200-4213.
- Pezeski S., Chimere C., Bessonov A. N., Winterhalter M. and Kleinekathöfer U.** 2009. Understanding Ion Conductance on a Molecular Level: An All-Atom Modeling of the Bacterial Porin OmpF. *Biophys. J.* 97:1898-1906.
- Phale P. S., Philippsen A., Widmer C., Phale V. P., Rosenbusch J. P. and Schirmer T.** 2001. Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry (N.Y.)*. 40:6319-6325.
- Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kale L. and Schulten K.** 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 26:1781-1802.
- Protein Data Bank.** 2007. <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- Quesada-Pérez M., González-Tovar E., Martín-Molina A., Lozada-Cassou M. and Hidalgo-Alvarez R.** 2003. Overcharging in colloids: Beyond the Poisson-Boltzmann approach. *Chemphyschem*. 4:235-248.
- Quinn P. J. and Cherry R. J.** 1992. Structural and Dynamics Properties of Lipids and Membranes. Portland Press. London
- Ramírez P., Apel P. Y., Cervera J. and Mafé S.** 2008. Pore structure and function of synthetic nanopores with fixed charges: tip shape and rectification properties. *Nanotechnology*. 19:315707/1-315707/12.
- Ramírez P., Gómez V., Cervera J., Schiedt B. and Mafé S.** 2007. Ion transport and selectivity in nanopores with spatially inhomogeneous fixed charge distributions. *J. Chem. Phys.* 126:194703.
- Ramírez P., Mafé S., Aguilera V. M. and Alcaraz A.** 2003a. Synthetic nanopores with fixed charges: an electrodiffusion model for ionic transport. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 68:011910.

- Ramírez P., Mafé S., Alcaraz A. and Cervera J.** 2003b. Modeling of pH-switchable ion transport and selectivity in nanopore membranes with fixed charges. *J Phys Chem B*. 107:13178-13187.
- Ramírez P., Alcaraz A., Mafé S. and Pellicer J.** 2002. Donnan equilibrium of ionic drugs in pH-dependent fixed charge membranes: Theoretical modeling. *J. Colloid Interface Sci.* 253:171-179.
- Ramírez P., Alcaraz A. and Mafé S.** 1997a. Effects of pH on ion transport in weak amphoteric membranes. *J Electroanal Chem.* 436:119-125.
- Ramírez P., Alcaraz A. and Mafé S.** 1997b. Model calculations of ion transport against its concentration gradient when the driving force is a pH difference across a charged membrane. *J. Membr. Sci.* 135:135-144.
- Ramírez P., Mafé S., Tanioka A. and Saito K.** 1997c. Modelling of membrane potential and ionic flux in weak amphoteric polymer membranes. *Polymer.* 38:4931-4934.
- Ramírez P., Mafé S., Manzanares J. A. and Pellicer J.** 1996. Membrane potential of bipolar membranes. *J Electroanal Chem.* 404:187-193.
- Reif F.** 1965. Fundamentals of Statistical and Thermal Physics. McGraw Hill. New York
- Robinson R. A. and Stokes R. H.** 1957. Solutions of Electrolytes and Diffusion in Liquids. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 8:37-54.
- Rostovtseva T. K., Nestorovich E. M. and Bezrukov S. M.** 2002. Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into OmpF porin. *Biophys. J.* 82:160-169.
- Roux B., Allen T., Berneche S. and Im W.** 2004. Theoretical and computational models of biological ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 37:15-103.
- Safran S. A.** 1994. Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces and Membranes. Perseus Publishing. New York
- Saint N., Lou K. L., Widmer C., Luckey M., Schirmer T. and Rosenbusch J. P.** 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size .2. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* 271:20676-20680.
- Schiedt B., Healy K., Morrison A. P., Neumann R. and Siwy Z.** 2005. Transport of ions and biomolecules through single asymmetric nanopores in polymer films. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms.* 236:109-116.

- Schindler H and Rosenbusch JP.** 1978. Matrix Protein from Escherichia-Coli Outer Membranes Forms Voltage-Controlled Channels in Lipid Bilayers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75:3751-3755.
- Schirmer T. and Phale P. S.** 1999. Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *J.Mol.Biol.* 294:1159-1167.
- Schirmer T.** 1998. General and specific porins from bacterial outer membranes. *J.Struct.Biol.* 121:101-109.
- Schoch R. B., Han J. Y. and Renaud P.** 2008. Transport phenomena in nanofluidics. *Reviews of Modern Physics.* 80:839-883.
- Scott-ward T. S., Li H., Schmidt A., Cai Z. and Sheppard D. N.** 2004. Direct block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by niflumic acid. *Mol.Membr.Biol.* 21:27-38.
- Sexton L. T., Horne L. P. and Martin C. R.** 2007. Developing synthetic conical nanopores for biosensing applications. *Molecular Biosystems.* 3:667-685.
- Shenoy D. K., Barger W. R., Singh A., Panchal R. G., Misakian M., Stanford V. M. and Kasianowicz J. J.** 2005. Functional reconstitution of protein ion channels into planar polymerizable phospholipid membranes. *Nano Letters.* 5:1181-1185.
- Shklovskii B. I.** 1999. Screening of a macroion by multivalent ions: Correlation-induced inversion of charge. *Physical Review E.* 60:5802-5811.
- Simons R.** 1993. Preparation of a High-Performance Bipolar Membrane. *J.Membr.Sci.* 78:13-23.
- Siwy Z., Kosinska I. D., Fulinski A. and Martin C. R.** 2005. Asymmetric diffusion through synthetic nanopores. *Phys.Rev.Lett.* 94:48102/1-48102/4.
- Siwy Z. and Fulinski A.** 2002. Fabrication of a synthetic nanopore ion pump. *Phys.Rev.Lett.* 89:
- Siwy Z. S.** 2006. Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry. *Advanced Functional Materials.* 16:735-746.
- Smith G. R. and Sansom M. S. P.** 1999. Effective diffusion coefficients of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in ion channel models. *Biophys.Chem.* 79:129-151.
- Smith G. R. and Sansom M. S. P.** 1998. Dynamic properties of Na<sup>+</sup> ions in models of ion channels: A molecular dynamics study. *Biophys.J.* 75:2767-2782.



- Stein W. D.** 1990. Channels, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport. Plenum Press. New York
- Striemer C. C., Gaborski T. R., McGrath J. L. and Fauchet P. M.** 2007. Charge- and size-based separation of macromolecules using ultrathin silicon membranes. *Nature*. 445:749-753.
- Suenaga A., Komeiji Y., Uebayasi M., Meguro T., Saito M. and Yamato I.** 1998. Computational observation of an ion permeation through a channel protein. *Biosci.Rep.* 18:39-48.
- Tanford C.** 1991. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, New Comprehensive Biochemistry. Elsevier. New York
- Tanford C. and Kirkwood J. G.** 1957. Theory of Protein Titration Curves .1. General Equations for Impenetrable Spheres. *J.Am.Chem.Soc.* 79:5333-5339.
- Tieleman D. P. and Berendsen H. J. C.** 1998. A molecular dynamics study of the pores formed by Escherichia coli OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer. *Biophys.J.* 74:2786-2801.
- Todt J. C. and McGroarty E. J.** 1992. Acid Ph Decreases Ompf and Ompc Channel Size In vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189:1498-1502.
- Todt J. C., Rocque W. J. and McGroarty E. J.** 1992. Effects of Ph on Bacterial Porin Function. *Biochemistry (N.Y.)*. 31:10471-10478.
- Travesset A. and Vaknin D.** 2006. Bjerrum pairing correlations at charged interfaces. *Europhys.Lett.* 74:181-187.
- Ullmann G. M. and Knapp E. W.** 1999. Electrostatic models for computing protonation and redox equilibria in proteins. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 28:533-551.
- Van den Berg A. and Wessling M. V.** 2007. Nanofluidics - Silicon for the perfect membrane. *Nature*. 445:726-726.
- Van der Heyden F. H. J., Stein D., Besteman K., Lemay S. G. and Dekker C.** 2006. Charge inversion at high ionic strength studied by streaming currents. *Phys.Rev.Lett.* 96:224502.
- Varma S. and Jakobsson E.** 2004. Ionization states of residues in OmpF and mutants: Effects of dielectric constant and interactions between residues. *Biophys.J.* 86:690-704.
- Verlet L.** 1967. Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*. 159:98-103.

- Vlassiouk I. and Siwy Z. S.** 2007. Nanofluidic diode. *Nano Letters*. 7:552-556.
- Visual Molecular Dynamics.** <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- Vrouenraets M., Wierenga J., Meijberg W. and Miedema H.** 2006. Chemical modification of the bacterial porin OmpF: Gain of selectivity by volume reduction. *Biophys.J.* 90:1202-1211.
- Wagner G.** 1990. Nmr Investigations of Protein-Structure. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 22:101-139.
- Walter A. and Gutknecht J.** 1986. Permeability of Small Nonelectrolytes through Lipid Bilayer-Membranes. *J.Membr.Biol.* 90:207-217.
- Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Profeta S. and Weiner P.** 1984. A New Force-Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic-Acids and Proteins. *J.Am.Chem.Soc.* 106:765-784.
- Yamashita E., Zhalnina M. V., Zakharov S. D., Sharma O. and Cramer W. A.** 2008. Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *EMBO J.* 27:2171-2180.
- Zakharov S. D., Eroukova V. Y., Rokitskaya T. I., Zhalnina M. V., Sharma O., Loll P. J., Zgurskaya H. I., Antonenko Y. N. and Cramer W. A.** 2004. Colicin occlusion of OmpF and TolC channels: Outer membrane translocons for colicin import. *Biophys.J.* 87:3901-3911.
- Zwanzig R.** 2001. Nonequilibrium Statistical Mechanics. Oxford University Press.

# Publicaciones

---



## A pH-Tunable Nanofluidic Diode: Electrochemical Rectification in a Reconstituted Single Ion Channel

Antonio Alcaraz,<sup>†</sup> Patricio Ramírez,<sup>‡</sup> Elena García-Giménez,<sup>†</sup> M. Lidón López,<sup>†</sup> Andreu Andrio,<sup>†</sup> and Vicente M. Aguilera<sup>\*†</sup>

Department of Experimental Sciences, Biophysics Unit, University Jaume I, P.O. Box 8029, E-12080 Castellón, Spain, and Department of Applied Physics, Politechnical University of Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, Spain

Received: May 25, 2006; In Final Form: August 22, 2006

We report pH-dependent electrochemical rectification in a protein ion channel (the bacterial porin OmpF) reconstituted on a planar phospholipid membrane. The measurements performed at single-channel level show that the electric current is controlled by the protein fixed charge and it can be tuned by adjusting the local pH. Under highly asymmetric pH conditions, the channel behaves like a liquid diode. Unlike other nanofluidic devices that display also asymmetric conductance, here the microscopic charge distribution of the system can be explored by using the available high-resolution (2.4 Å) channel crystallographic structure. Continuum electrostatics calculations confirm the hypothesized bipolar structure of the system. The selective titration of the channel residues is identified as the underlying physicochemical mechanism responsible for current rectification.

### Introduction

The molecular systems that show rectification (asymmetric conduction) have attracted the attention of researchers, because they are vital components in the development of molecule-based devices that provide faster electronics, higher density data storage, improved methods for drug delivery, and single-molecule analysis.<sup>1,2</sup> The ability of a specific system to produce an asymmetric current–voltage curve depends mainly on the peculiarities of the electrostatic potential spatial profile.<sup>3</sup> Examples include, among others, molecular junctions containing bipolar molecules, chemically modified electrodes, redox-active monolayers,<sup>4,5</sup> or synthetic track-etched nanopores.<sup>1,6</sup> Transmembrane proteins that form ion channels can also play this role as they are highly specialized tools designed to communicate chemically and electrically the living cells with the extracellular environment. There are a number of ion channels that display asymmetric conductance, although its origin may vary greatly. Current rectification of electrostatic nature can be caused by the blocking of the pore by other ions, often divalent cations, asymmetry in permeant ion concentration, and fixed electrical charges or dipoles at the membrane surface or in the channel.<sup>3,7</sup> A remarkable example is the family of inward-rectifying potassium channels in cardiac and neuronal cells.<sup>8</sup>

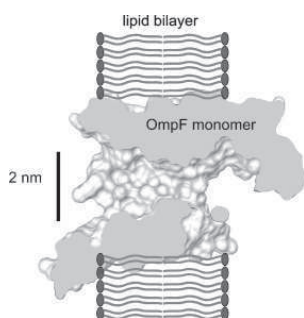
Here, we report what could be the onset in the development of a molecular diode based on asymmetry in electrostatic interactions. Specifically, we show here that pH-dependent rectification can be achieved by using a lipid membrane reconstituted protein channel, the bacterial porin OmpF (outer membrane protein F) found in the external membrane of *Escherichia Coli*. The OmpF channel has a trimeric structure formed by three

identical and functionally independent subunits. Each monomer opens a wide aqueous pore (see Figure 1), characterized by its poor selectivity and almost no ion specificity. The crystallographic structure of the channel<sup>9</sup> reveals an asymmetric pore geometry, with relatively large entrances and a narrow constriction similar to that of general diffusion porins. Despite the nonsymmetric structure, and the fact that fixed charge is also unevenly distributed along the pore, the channel shows no noticeable rectification unlike other asymmetric channels such as  $\alpha$ -hemolysin.<sup>10–12</sup> Nevertheless, it is shown here that when the pH of both solutions is manipulated, the channel conductive properties are modified and it may become a highly rectifying device. The remarkable feature of the OmpF channel lies on the particularities of the reversible protonation/deprotonation of the channel titratable residues that enables the selection between symmetric and rectifying currents by just adjusting pH. The artificial reconstitution of protein nanopores in unsupported phospholipid bilayers, as we do here, has provided much of our understanding of ion permeation in biological systems but involves a serious limitation for technological applications due to the instability of these membranes. However, recent studies have succeeded in producing robust synthetic scaffolds for protein channels using solid supported membranes, tethered bilayer lipid membranes, or polymerizable lipids. Thus, the idea of protein ion channels acting as components of nanoscale sensors is not an ideal chimera, but has already been achieved in a variety of biotechnological and analytical applications.<sup>13</sup> Our approach could be considered then as the first step in the experimental realization of a recently reported theoretical analysis of nanofluidic diodes,<sup>2</sup> since it is shown here that the OmpF channel may function as a pH-regulated, biological, nanofluidic bipolar diode. On a higher spatial scale, pH-switchable membrane systems have proved to be important for other technological applications such as filtration systems, membrane-based separations, bio-separations, and sensors.<sup>14,15</sup>

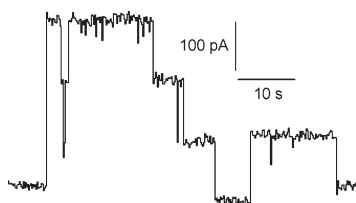
\* Corresponding author. Phone: +34-964-728045. Fax: +34-964-728066. E-mail: aguilell@uji.es.

<sup>†</sup> University Jaume I.

<sup>‡</sup> Politechnical University of Valencia.



**Figure 1.** Axial section of the OmpF channel superimposed on a cartoon representing the phospholipid planar membrane where the channel is reconstituted. The periplasmic part of the channel is on the left side, and the extracellular part is on the right side.

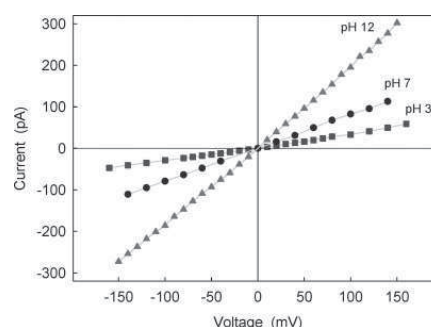


**Figure 2.** Single-channel current recording of OmpF porin reconstituted on a DPhPC planar bilayer. The trimeric nature of the channel is revealed by the spontaneous monomer closures at high applied voltages. Traces shown correspond to measurements performed at pH 7 in 0.1 M KCl and 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .

## Methods

**Channel Conductance Measurements.** Wild-type OmpF (a generous gift of Dr. Mathias Winterhalter) was isolated and purified from an *Escherichia coli* culture. Bilayer membranes were formed from two monolayers made from a 1% solution of diphyanoylphosphatidylcholine (DPhPC) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) in pentane (Baker) on 70–80  $\mu\text{m}$  diameter orifices in the 15  $\mu\text{m}$ -thick Teflon partition that separated two chambers.<sup>16,17</sup> The orifices were pretreated with a 1% solution of hexadecane in pentane. The total capacitance depended on the actual location of the orifice in the film (and thus area of the film exposed to salt solution) but was always around 80–120 pF. Aqueous solutions of KCl and 1 mM  $\text{CaCl}_2$  were buffered by 5 mM HEPES. Single-channel insertion was achieved by adding 0.1–0.3  $\mu\text{L}$  of a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution of OmpF in the buffer that contained 1 M KCl and 1% (v/v) of Octyl POE (Alexis, Switzerland) to 2 mL of aqueous phase at the cis side of the membrane only while stirring. The membrane potential was applied using Ag/AgCl electrodes in 2 M KCl, 1.5% agarose bridges assembled within standard 250  $\mu\text{L}$  pipet tips.<sup>16</sup> Potential is defined as positive when it is greater at the side of protein addition (the cis side of the membrane cell). As shown in Figure 2, the formation of OmpF channels is indicated by the characteristic step increases in the current for a given value of the applied potential. An Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA) in the voltage-clamp mode was used for measuring the current and applying potential. Data were directly saved into the computer memory. The membrane chamber and the headstage were isolated from external noise sources with a double metal screen (Amuneal Manufacturing Corp., Philadelphia, PA).

**Calculation of Protein Charge Distribution.** The protocol followed to calculate the ionization state of each of the 306



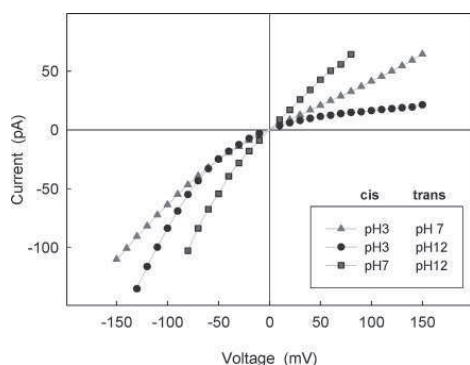
**Figure 3.** Current–voltage curves of OmpF channel in 0.1 M KCl under symmetric pH conditions. No noticeable rectification is observed. There is a 6-fold change in channel conductance from pH 3 to pH 12. Labels indicate the pH on both solutions. Error bars are smaller than the size of the symbols used.

titratable residues in the OmpF channel was described in detail elsewhere.<sup>18,19</sup> To sum, the entire trimer was built using the Protein Data Bank file<sup>9</sup> and was inserted in a membrane represented by a low dielectric medium. The UHBD (the University of Houston Brownian Dynamics Program) code<sup>20,21</sup> was used for the calculation of the  $\text{pK}_a$  of ionizable residues following the procedure described by Antosiewicz et al.<sup>22,23</sup> This approach involves the calculation of the interaction energy between the ionizable groups of the protein and the differences between the ionization energies of each group in the neutral protein and in free solution. All of these energies were assumed to be of purely electrostatic nature so that they could be calculated by means of the Poisson–Boltzmann equation. A Monte Carlo method was later employed for the estimation of the interaction energy between titratable groups.

## Results and Discussion

The ion conduction of OmpF was investigated by reconstituting single channels in planar membranes (made of a neutral lipid, DPhPC). Figure 3 shows the current–voltage ( $I$ – $V$ ) curves of the OmpF channel at basic, neutral, and acidic pH, under symmetrical conditions (the same pH and KCl concentration on both sides of the channel). As seen in the slopes of the measured current–voltage curves, channel conductance is strongly dependent on solution pH, but no rectification is observed. Therefore, it seems that the slight structural asymmetry of the protein channel has a negligible effect on the change of conductance with voltage bias. A tentative explanation for OmpF pH-dependent conductance could be a conformational change inducing an increase in the pore size. However, polymer-partitioning experiments with poly(ethylene glycol) in OmpF channel indicate that the rise in conductance with pH should be attributed to the titration of channel ionizable charges (and the subsequent change in the electric potential distribution) rather than to changes in the effective cross-section of the pore lumen.<sup>24</sup> The fact that the channel geometry is unaffected by pH suggests that the measured  $I$ – $V$  curves are mainly influenced by electrostatic interactions between the permeating ions and the titratable residues within the porin. The pore fixed charges induce local accumulation of charge carriers of opposite sign, so that the ion current is crucially determined by the ionization state of the charged residues in the pore.

To further test the working hypothesis that the channel fixed charge determines its conductance, we manipulated the ionization state of the channel residues in an asymmetric way. The



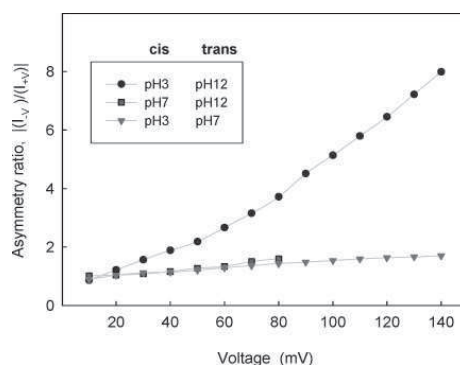
**Figure 4.** Current–voltage curves of OmpF channel in 0.1 M KCl under asymmetric pH conditions show rectification. Labels indicate the pH on the cis side (the side of the protein addition) and the trans side (the side taken as ground for the electric potential).

KCl solutions on either side of the membrane were kept at different pH's. We report here (Figure 4) the results for three different asymmetric pH combinations: (a) acid||neutral (pH 3||pH 7); (b) neutral||basic (pH 7||pH 12); and (c) acid||basic (pH 3||pH 12).

The acid||neutral configuration is obtained with pH 3 in the cis compartment (the side of the protein addition) and pH 7 in the trans compartment. The  $I$ – $V$  curve displays a slope similar to that of the symmetric pH 3||pH 3 configuration (Figure 3) for positive applied voltages, but a clear nonlinearity under negative voltages. The selective titration of some acidic residues in the region of the channel facing the cis side seems responsible for this behavior. This interpretation is supported by detailed electrostatic calculations<sup>18,19</sup> of the  $pK_a$  of ionizable residues present in the channel. Note that when more than 100 ionizable residues per monomer are involved as it is here, the effects of pH on the measured  $I$ – $V$  curves are far from easy to anticipate and these calculations are mandatory. Specifically, the current asymmetry can be ascribed to the neutralization of some negative groups with  $pK_a$  around 4, like aspartic and glutamic acids,<sup>18</sup> which could lead to a positive net charge in the cis side of the channel. The electrostatic nature of this phenomenon is confirmed by a similar rectification found at positive bias for the neutral||acid configuration (not shown here).

The neutral||basic configuration (pH 7 in the cis side and pH 12 in the trans side) shows another asymmetric system obtained by titrating the basic residues in the trans side of the channel. Unlike the acid||neutral configuration, here current rectification seems to be connected to the neutralization of positively charged groups such as lysines, tyrosines, and arginines, yielding an increment in the negative net charge of the channel on the side of high pH. The effect of pH 12 when compared to pH 3 is consistent with the fact that most basic residues facing the pore have  $pK_a$ 's over 12,<sup>18</sup> and thus their titration is only partial.

The most dramatic effect is found for the acid||basic configuration (pH 3 in the cis side and pH 12 in the trans side). Actually, measurements yield a typical diode  $I$ – $V$  curve: a rapid increase of current under negative voltages and a large resistance for positive voltages where current almost attains a limiting value. A similarly shaped  $I$ – $V$  curve is typical of solid-state  $p$ – $n$  junctions, polymer ion-exchange bipolar membranes,<sup>25,26</sup> and a number of molecular rectifiers.<sup>2</sup> The selective titration of the channel achieved by partial titration of the acid groups in the cis side, and of the basic residues in the trans side, leads to

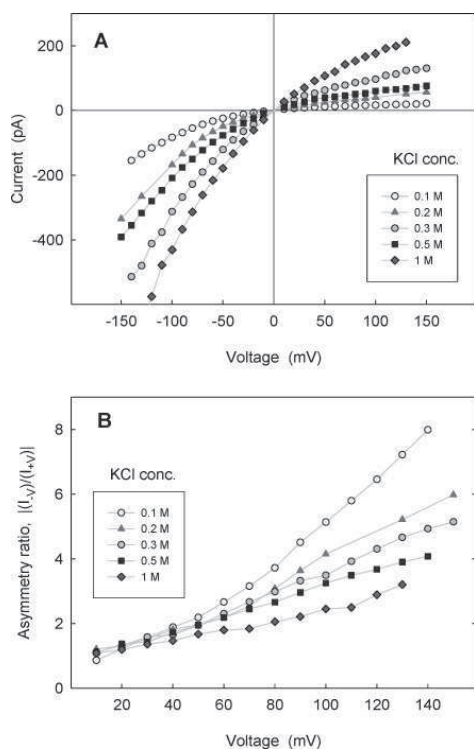


**Figure 5.** Ratio between channel current at negative and positive applied voltages,  $|I(-V)/I(+V)|$ , defined as the rectification ratio in the text. Measurements were performed in 0.1 M KCl under three asymmetric pH conditions (the same as in Figure 4).

a bipolar-type charged system, with a positive net charge in the cis side and a negative net charge in the trans side that are arranged in series. The effect of opposite sign of fixed charge on either side of the channel is best seen in the plot of current rectification ratio at several applied voltages (Figure 5). This ratio is defined as the absolute value of the quotient between currents measured at a given applied potential under both polarities. The pH 3||pH 7 and pH 7||pH 12 configurations yield measurable but moderate rectification, while in the pH 3||pH 12 configuration, the channel current at  $-140$  mV is 8-fold greater than the current at  $140$  mV. Remarkably, the rectification ratio is similar for the two configurations, which share neutral pH on one side. The big difference arises when both sides are titrated in a different way.

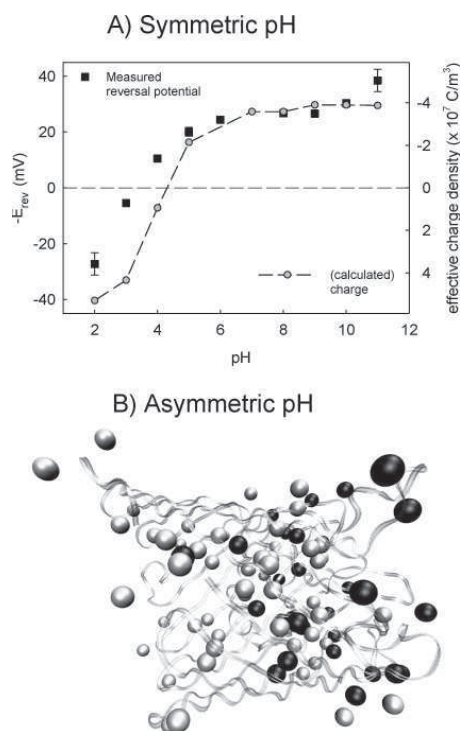
At this point, we may wonder whether salt concentration has an effect similar to that of pH on the current rectification ratio. To answer this question and provide further evidence about the role of fixed charges,  $I$ – $V$  measurements were performed under the pH 3||pH 12 configuration using different KCl concentrations. Results are displayed in Figure 6a ( $I$ – $V$  curves) and b (rectification ratio). Interestingly, the rectification ratio decreases as salt concentration increases. This indicates that concentrated solutions screen the channel fixed charges more effectively. Therefore, at high salt concentrations, the different titration on both sides of the channel is less effective and current becomes more similar under both polarities.

As mentioned above, a change in pH modifies not only the channel conductance, but also its selectivity. The OmpF porin is slightly selective to cations at neutral and basic pH, but turns into anion-selective at  $pH < 4$ . This is the key point to understanding how the channel can behave as a bipolar rectifier when it is placed under asymmetric pH conditions. One part of the channel may have an excess of negative net charge, while the other part may have an excess of positive net charge. This appears to be more than a working hypothesis when we focus on the channel atomic structure and perform electrostatic calculations. The ionization state of each channel residue is computed taking into account both the protein dielectric environment and the possible interaction between neighbor residues. Note that the system differs dramatically from most synthetic nanopores where the geometry is usually well defined and often only one type of chemical group is attached to the pore walls. The charge regulation exerted by the pH in a biological channel is then a complicated issue that requires much more detailed calculations than in synthetic systems and make inadequate any



**Figure 6.** (A)  $I$ - $V$  curves of the nanofluidic channel measured under asymmetric pH conditions: pH 3||pH 12 (bipolar configuration). (B) Ratio between channel current at negative and positive applied voltages. Measurements were performed in KCl solutions with concentrations as labeled.

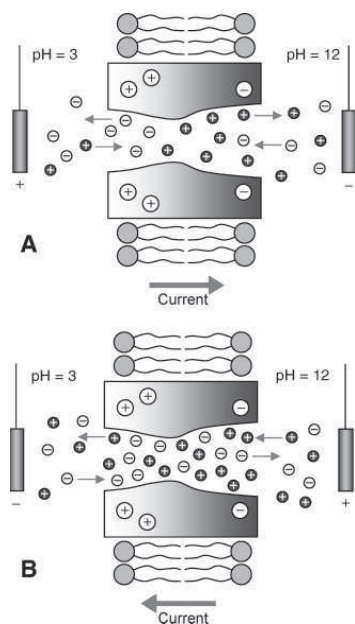
simplistic interpretation. The effective net charge density in the channel, calculated after evaluation of the ionization state of all residues,<sup>18,19</sup> follows the same trend as the measured reversal potential (potential needed to achieve zero current under a salt concentration gradient) when pH is changed (Figure 7a). This correlation indicates that the measured anion selectivity at low pH is consistent with an effective positive charge, whereas the cation selectivity at neutral and basic pH corresponds well with the net negative charge. We can use the information about the charge state of every ionizable residue of the OmpF channel to confirm the bipolar structure of the diode achieved under the acid||basic configuration. Figure 7b shows a ribbon representation of one of the OmpF monomers, based on the atomic structure of the OmpF channel obtained from X-ray crystallography.<sup>9</sup> White and dark gray spheres illustrate the location of the remaining basic and acid residues, respectively, when solution pH is 3 on the left side (periplasmic end) and solution pH is 12 on the right side (extracellular side). The bipolar nature of the system is better visualized by this graphical representation of charged residues. The position of the ionizable residues was taken from the microscopic structure (Protein Data Bank code 2OMF), and their charge state was obtained after the calculation of their corresponding  $pK_a$ .<sup>18</sup> For the sake of clarity, we considered an idealization of the system where pH 3 is considered in the left half of the channel and pH 12 in the right half (in the actual system, the pH changes continuously between both channel ends). As shown, excess positive charge prevails on the channel side facing low pH solution, and there is an excess negative charge on the other side.



**Figure 7.** (A) OmpF reversal potential (0.1 M KCl trans||1 M KCl cis) and calculated<sup>18</sup> channel effective charge density as a function of pH (the same on both solutions). Positive net charge is consistent with the channel anion selectivity (low pH), and negative net charge is consistent with the cationic selectivity (high pH). (B) Ribbon representation of the OmpF monomer. White and dark gray spheres illustrate the location of the remaining basic and acid residues, respectively, when pH is 3 on the left side (periplasmic end) and pH is 12 on the right side (extracellular side). The position of the ionizable residues was taken from the channel crystallographic structure,<sup>9</sup> and their charge state was obtained after calculation of their respective  $pK_a$ .<sup>18</sup> Excess positive charge prevails on the channel side facing low pH solution, and there is an excess negative charge on the other side.

Figure 8 illustrates the proposed explanation of current rectification in the OmpF channel under the acid||basic configuration. The excess of positive net charge in the side of the channel that faces the acidic solution is equilibrated by a corresponding amount of anions. In the same way, the excess of negative net charge in the other side of the channel, which faces the basic solution, is compensated by a corresponding amount of cations. Under positive applied voltages, the predominant carriers of each zone migrate outward from the channel, heading to the corresponding electrode, giving rise to a depleted zone in the central part of the channel and consequently an increase of electric resistance caused by the lack of ions (see Figure 8a). When the polarity is switched to negative values, we obtain a totally different picture. The excess cations coming from the negative zone try to cross the positive zone and vice versa. The final result is an accumulation of carriers in the central region of the channel (see Figure 8b). The local concentrations become much higher than those in bulk solution, and a rapid increase in current is observed. Note that the asymmetric  $I$ - $V$  curve found in other ion channels such as  $\alpha$ -hemolysin<sup>11,12</sup> does not correspond to the same phenomenon described here, since it appears independently of pH because it is based on the structural asymmetry. Indeed, this  $\alpha$ -hemolysin channel is anion-selective





**Figure 8.** Schematic representation of the bipolar diode under positive applied potential (A) and negative bias (B).

for almost the entire pH range (except for  $\text{pH} > 10$ ), and thus its slightly asymmetric  $I$ - $V$  curve (rectification ratio is within the range 1–2) at neutral pH is incompatible with the bipolar picture invoked here.

### Conclusions

We have shown that pH-dependent electrochemical rectification is displayed by a protein ion channel reconstituted in a planar phospholipid membrane. The nonohmic conduction is not associated with channel blocking by ions as happens in other biological channels but seems almost entirely controlled by electrostatic interactions between channel ionizable residues and permeating ions. This allows one to achieve a pH-tunable rectification, and eventually create a bipolar liquid diode. The asymmetric fixed charge distribution arising from the selective titration of the channel residues seems to be the origin of the diode-like ionic conduction. On the one hand, it is emphasized here the crucial role of the electrostatic interactions between the surface charges of the channel and the permeating ions. On the other hand, the experiments reported here open the door to new rectifying devices based on synthetic nanopores, which, after chemical modification, may change their local fixed charge

in response to variation of the pH.<sup>27</sup> Protein channels are being extensively tested as biological sensing elements because of their potential benefits in chemical, pharmaceutical, and biological applications.<sup>13</sup>

**Acknowledgment.** This work was supported by Fundació Caixa-Castelló (project P1-1B2004-27), Generalitat Valenciana (project GV04A/701), and the Spanish Ministry of Education (projects FIS2004-03424 and MAT2006-03097).

### References and Notes

- (1) Schiedt, B.; Healy, K.; Morrison, A. P.; Neumann, R.; Siwy, Z. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2005**, *236*, 109–116.
- (2) Daiguji, H.; Oka, Y.; Shirono, K. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2274–2280.
- (3) Neumcke, B. *Biophysik* **1970**, *6*, 231–240.
- (4) Gasyňa, Z. L.; Morales, G. M.; Sanchez, A.; Yu, L. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *417*, 401–405.
- (5) Hwang, S.; Chi, Y. S.; Lee, B. S.; Lee, S. G.; Choi, I. S.; Kwak, J. *Chem. Commun.* **2006**, 183–185.
- (6) Siwy, Z.; Kosińska, I. D.; Fuliński, A.; Martin, C. R. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 048102.
- (7) Kienker, P. K.; DeGrado, W. F.; Lear, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4859–4863.
- (8) Oliver, D.; Baukowitz, T.; Fakler, B. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5824–5829.
- (9) Cowan, S. W.; Schirmer, T.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Pauptit, R. A.; Jansonius, J. N.; Rosenbusch, P. J. *Nature* **1992**, *358*, 727–733.
- (10) Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 13770–13773.
- (11) Krasilnikov, O. V.; Yuldasheva, L. N.; Merzylak, P. G.; Capistrano, M.-F. P.; Nogueira, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1329*, 51–60.
- (12) Krasilnikov, O. V.; Capistrano, M.-F. P.; Yuldasheva, L. N.; Nogueira, R. A. *J. Membr. Biol.* **1997**, *156*, 157–172.
- (13) Shenoy, D. K.; Barger, W. R.; Singh, A.; Panchal, R. G.; Misakian, M.; Stanford, V. M.; Kasianowicz, J. J. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1181–1185.
- (14) Ramirez, P.; Mafé, S.; Alcaraz, A.; Cervera, J. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13178–13187.
- (15) Park, M. K.; Deng, S.; Advincula, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13723–13731.
- (16) Bezrukov, S. M.; Vodyanov, I. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 16–25.
- (17) Montal, M.; Mueller, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, *69*, 3561–3566.
- (18) Alcaraz, A.; Aguilera-Arzo, M.; Nestorovich, E. M.; Aguilera, V. M.; Bezrukov, S. M. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 943–957.
- (19) Aguilera-Arzo, M.; Garcia-Celma, J. J.; Cervera, J.; Alcaraz, A.; Aguilera, V. M. *Bioelectrochemistry* **2006**, *71*, 22–29.
- (20) Davis, M. E.; Madura, J. D.; Luty, B. A.; McCammon, J. A. *Comput. Phys. Commun.* **1991**, *62*, 187–197.
- (21) Madura, J. D.; Briggs, J. M.; Wade, R. C.; Davis, M. E.; Luty, B. A.; Ilin, A.; Antosiewicz, J.; Gilson, M. K.; Bagheri, B.; Scott, L. R.; McCammon, J. A. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 57–95.
- (22) Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Gilson, M. K. *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 415–436.
- (23) Antosiewicz, J.; McCammon, J. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 7819–7833.
- (24) Nestorovich, E. M.; Rostovtseva, T. K.; Bezrukov, S. M. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3718–3729.
- (25) Alcaraz, A.; Ramirez, P.; Mafé, S.; Holdik, H.; Bauer, B. *Polymer* **2000**, *41*, 6627–6634.
- (26) Mafé, S.; Ramirez, P. *Acta Polym.* **1997**, *48*, 234–250.
- (27) Fuliński, A.; Kosińska, I. D.; Siwy, Z. *Europhys. Lett.* **2004**, *67*, 683–689.





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Membrane Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/memsci](http://www.elsevier.com/locate/memsci)

## Directional ion selectivity in a biological nanopore with bipolar structure

Elena García-Giménez<sup>a</sup>, Antonio Alcaraz<sup>a</sup>, Vicente M. Aguilera<sup>a</sup>, Patricio Ramírez<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Física, Universitat Jaume I de Castellón, Spain<sup>b</sup> Departamento de Física Aplicada, Universitat Politècnica de València, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 October 2008

Received in revised form 9 January 2009

Accepted 21 January 2009

Available online 30 January 2009

## Keywords:

Ion selectivity

Bipolar membranes

Amphoteric membranes

Ion channels

Membrane potential

## ABSTRACT

Ion transport features of a biological nanopore, the bacterial porin OmpF from *Escherichia coli*, have been investigated by patch-clamp experiments performed at the single channel level. Membrane potential measurements done under asymmetric conditions of pH and electrolyte concentration provide important evidences about the charge regulation exerted by the channel that cannot be extracted from the rectification displayed in current–voltage curves. The pH gradient imposed across the pore induces an asymmetric fixed-charge distribution that resembles the structure of synthetic bipolar membranes. This particular arrangement demonstrates that the ionic selectivity of a non-uniformly charged structure is not an intrinsic quality of the system but depends crucially on several external factors. Amazingly, changing the direction of the salt concentration gradient can turn a cation selective channel into an anion selective one.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

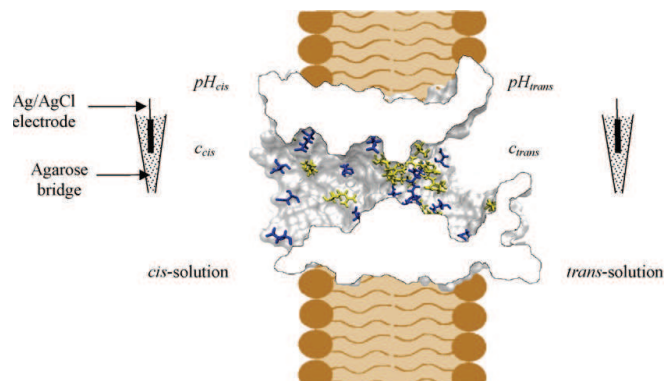
The promising connections between biological molecular structures and engineered nano-scale sensors have attracted the interest and imagination of researchers. Over the last years, exhaustive attention has been paid to synthetic pores that mimic several relevant physiological mechanisms carried out by ion channels. Selective permeation of inorganic ions, metabolites or other small solutes that are crucial in electrical signaling and other biological functions has been also found in abiotic nanopores [1–15]. Conversely, the manipulation of biological membranes and ion channels to take advantage of their “sensing” properties has already been achieved in a variety of biotechnological and analytical applications [16–18]. In a recent study, we showed that the OmpF channel, a biological pore found in the outer membrane of *Escherichia coli*, may function as a pH-regulated, biological, nanofluidic diode [19]. Continuum electrostatic calculations suggested as well that the origin of the current rectification found might be the asymmetric distribution of fixed-charges, similar to that of a bipolar ion exchange membrane.

Bipolar membranes (BMs), a composite of an anion-permeable membrane and a cation-permeable membrane, have been known for more than half a century [20]. Since the development of the first commercial BMs for industrial purposes [21], a great progress has been made, and intensive research is currently being done both in fabrication [22] and in characterization of BM structure

and physico-chemical properties [23]. Today, BM technology is well established [24], regarded as a clean technology, and numerous separation processes involve the use of BM in the fields of chemical engineering and biotechnology [25–30].

There are very few historical records of biological systems analogue to BMs. To our knowledge, only Mauro [31] and Coster [32] reported biological systems with properties similar to those of BM. Under asymmetric pH conditions the OmpF channel has been reported to display current rectification [19]. Despite the fact that electrostatic calculations pointed to a bipolar-like charge structure, that study was not totally conclusive about the origin of the diode-like rectifying behavior since an asymmetric conduction has been also reported in other ion exchange systems like conical nanopores [4]. Here we attempt to clarify whether the rectification properties arise from a merely asymmetric fixed-charge distribution or from a bipolar distribution, i.e., with two regions of opposite fixed charge. The exploration of OmpF channel selectivity is appealing as it tests our understanding of physical principles underlying transport through BMs. To this end, we present here a thorough characterization of the pore under an applied pH gradient: current–voltage (*I*–*V*) curves and membrane potential. We show that under certain conditions the fixed-charge distribution is unambiguously bipolar. Furthermore, our results raise the question of the definition of selectivity in non-homogenous systems, since in such membranes or nanopores the selectivity is no longer an exclusive feature of them but depends largely on the pH and ion concentrations of the surrounding solutions. These results suggest that the pH-regulated selectivity of ion channels and synthetic nanopores is somewhat similar to the permselectivity of synthetic membranes with grafted ionizable groups and amphoteric membranes [33–40].

\* Corresponding author. Tel.: +34 967 387 70 07.  
E-mail address: [patraho@fis.upv.es](mailto:patraho@fis.upv.es) (P. Ramírez).



**Fig. 1.** Longitudinal cross-section of the OmpF porin where acidic residues (blue in web version) and basic residues (yellow in web version) have been highlighted. The channel visualization (using Visual Molecular Dynamics (VMD) software) has been made from the atomic coordinates of OmpF crystal structure taken from the Protein Data Bank repository. Only one of the three monomers is depicted and superimposed over a cartoon that represents the lipid bilayer membrane. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

All these systems have in common that electrostatic interactions between titratable fixed charges and permeating ions are the main determinants of ion selectivity.

## 2. Experimental

Experiments have been performed on single ion channels reconstituted on lipid bilayer membranes (see Fig. 1). Wild type OmpF isolated and purified from an *Escherichia coli* culture was kindly provided by Dr. Mathias Winterhalter (Jacobs University, Germany). Bilayer lipid membranes were formed from two monolayers prepared from 1% solution of diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.) in pentane (Baker) on 70–90  $\mu\text{m}$  diameter orifices in the 12  $\mu\text{m}$ -thick Teflon partition that separated two chambers [41,42]. The orifices were pretreated with 1% solution of hexadecane in pentane. The total capacitance depended on the actual location of the orifice in the film but it was always around 70–130 pF. In order to keep constant the pH value aqueous solutions of KCl were buffered by 5 mM MES (2-(N-morpholino)-ethanesulphonic acid) at pH values below pH 6, by 5 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid) at pH values (6–8), by 5 mM CHES (2-(cyclohexylamino)-ethanesulphonic acid) at pH 9, and by 10 mM CAPS (3-(cyclohexylamino)-propanesulphonic acid) at pH values above 9. All measurements were performed on single OmpF channels at room temperature ( $23.0 \pm 1.5$ )  $^{\circ}\text{C}$ . Single-channel insertion was achieved by adding 0.1–0.3  $\mu\text{l}$  of a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  solution of OmpF in the buffer that contained 1 M KCl and 1% (v/v) of Octyl POE (Alexis, Switzerland) to 2 ml aqueous phase at the *cis* side of the membrane only while stirring.

The  $I$ - $V$  curves of OmpF were recorded under a variety of pH values and electrolyte concentration conditions of the surrounding solutions (see Fig. 1). For the sake of simplicity the pH configurations studied will be hereafter denoted as  $\text{pH}_{\text{cis}}||\text{pH}_{\text{trans}}$ . The voltage,  $V$ , was applied via Ag/AgCl electrodes in 2 M KCl, 1.5% agarose bridges assembled within standard 200  $\mu\text{l}$  pipette tips [41]. Electric potential  $V$  is defined as positive when it is greater at the *trans* side of the membrane cell. An Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) in the voltage-clamp mode was used for measuring both  $V$  and the electric current,  $I$ , passing through the channel.  $I$  is defined as positive when it flows from solution *trans* to solution *cis* in Fig. 1. The membrane chamber and the headstage were isolated from external noise sources with a double  $\mu$ -metal screen (Amuneal Manufacturing Corp., Philadelphia, PA).

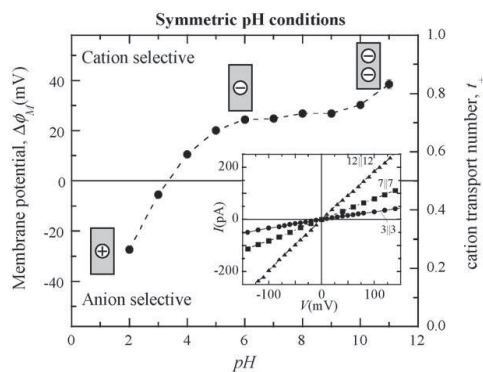
The membrane potential,  $\Delta\phi_M$ , was obtained as follows. First, a lipid membrane was formed at a given salt concentration gradient. Second, a single OmpF channel was inserted at zero potential and the channel conductance was checked by applying +50 mV and then switching potential polarity. Third, the ionic current through the channel was manually set to zero by adjusting the applied potential. When measuring electric potential differences between two solutions of different concentration (as is the case of membrane potential), one cannot ignore that each bridge is in contact with a different solution. The potential difference generated across each bridge/solution interface, known as liquid junction potential (LJP), is different, so that the total contribution of both LJP to the total measured potential is different from zero. The LJP is commonly estimated by means of Henderson's equation, which is based upon two basic assumptions. First, the electrolyte solutions are treated as ideal (i.e., constant mobilities are assigned and activities are replaced by concentrations). Second, the junction may be represented by a continuous series of mixtures of the two end solutions (i.e., linear ion concentration profiles). The potential needed to achieve zero current was then corrected by the LJP calculated from Henderson's equation to obtain  $\Delta\phi_M$  [43]. Each point was measured for at least three different channels in three different experiments to assure reproducibility and to estimate the standard deviation.

## 3. Results and discussion

Fig. 2 shows the measurements of  $\Delta\phi_M$  under symmetric pH conditions ( $\text{pH}_{\text{cis}} = \text{pH}_{\text{trans}} = \text{pH}$ ), in the case  $c_{\text{cis}} = 1$  M and  $c_{\text{trans}} = 0.1$  M KCl. We have represented in the right axis the transport number for cations calculated from [44]

$$t_+ = \frac{1}{2} \left( 1 - \frac{F}{RT} \frac{\Delta\phi_M}{\ln(c_{\text{trans}}/c_{\text{cis}})} \right), \quad (1)$$

where  $F$ ,  $R$  and  $T$  have their usual meaning. The results in Fig. 2 reveal some interesting features of the OmpF porin transport properties. In agreement with previous studies of this channel, we see that  $\Delta\phi_M$ , and consequently  $t_+$ , depend strongly on the pH of the external solutions [45,46]. Note that this is not only a quantitative change, but also a qualitative one: the cation selectivity found for the channel in neutral and basic medium turns into anionic selectivity in acidic solutions. This remarkable dependence on pH suggests that the mechanism responsible for the changes in selectivity is the titration of the porin acid and basic charged residues. Note how-

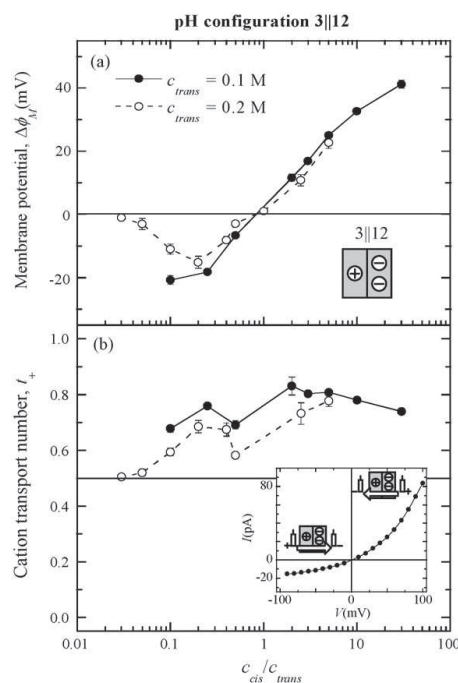


**Fig. 2.** Measurements of membrane potential,  $\Delta\phi_M$  (left vertical axis) of the OmpF porin for symmetric pH conditions ( $\text{pH}_{\text{cis}} = \text{pH}_{\text{trans}} = \text{pH}$ ) for  $c_{\text{cis}} = 1$  M and  $c_{\text{trans}} = 0.1$  M KCl. Values of the cation transport number,  $t_+$  (right vertical axis) were calculated using Eq. (1). Icons reflect the sign and the relative amount of the global concentration of fixed charges. The inset shows current–voltage curves at three representative symmetric pH values of the surrounding solutions. All  $I$ – $V$  curves have been measured in symmetric solutions:  $c_{\text{cis}} = c_{\text{trans}} = 0.1$  M KCl.

ever, that there is a considerable amount of residues buried in the protein matrix, and consequently non-accessible for the solvent. Icons in Fig. 2 show the sign and the relative amount of the overall net fixed charge of the channel under acid, neutral and basic environments. The  $I$ – $V$  curves at three representative pH values of the surrounding solutions ( $c_{\text{cis}} = c_{\text{trans}} = 0.1$  M KCl) are shown in the inset of Fig. 2. Although the structure and transport properties of OmpF have been reported to be slightly asymmetric [46], the measured  $I$ – $V$  curves are almost linear and no noticeable rectification is observed. The pore conductance (calculated from the slope of the  $I$ – $V$  curves) changes also strongly with pH. It increases from 0.32 nS for the configuration 2||2, to 0.80 nS in the case 7||7, and 1.90 nS for 12||12.

The above experiments show clearly that the ion transport properties of the OmpF porin can be artificially tuned simply by changing the pH of the external solutions. This makes this ion channel especially suitable to study the mechanisms of charge regulation and their influence on the selectivity of permeating systems, and the main results can be extended directly to the case of synthetic membranes. For instance, qualitatively similar titration curves of  $\Delta\phi_M$  vs pH have been reported for synthetic membranes with amphoteric fixed charges [33,34].

A further step in our analysis consists in measuring the ion channel properties under asymmetric pH conditions. Previous studies on the OmpF porin [19] and synthetic nanopores with pH-dependent fixed charges [47] have demonstrated that the  $I$ – $V$  curves obtained under these experimental conditions show rectification. In the case of the OmpF porin, the detailed electrostatic calculations of the  $\text{pK}_a$  of ionizable residues present in the channel suggested the existence of a bipolar fixed-charge distribution originated by the pH gradient. Under this conjecture and according to the scheme shown in Fig. 2, the porin side closer to the solution at acidic pH (the *cis* solution in our case) becomes positively charged, and that facing the solution at basic pH (the *trans* solution in our case) becomes negatively charged. This distribution of fixed charges resembles clearly those found in bipolar membranes [24,48] and synthetic nanopore diodes [7,49]. However, it has been demonstrated that membranes or nanopores with non-symmetric distribution of fixed charges of the same sign (such systems will be referred as *monopolar* in the following) could also yield rectifying  $I$ – $V$  curves, [47,50]. We propose here the use of the membrane potential in order to clarify this question. As we will show later, this technique gives new insights about

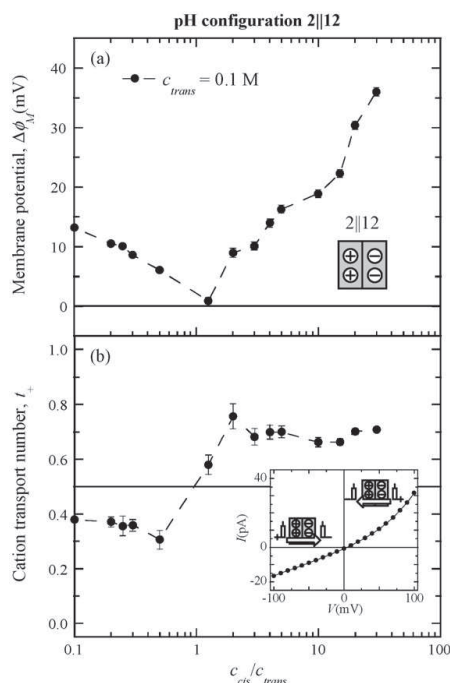


**Fig. 3.** Measured membrane potential,  $\Delta\phi_M$  (a) and calculated cation transport number,  $t_+$  (b) vs  $c_{\text{cis}}/c_{\text{trans}}$  ratio for the pH configuration 3||12.  $c_{\text{trans}}$  is kept constant (filled circles: 0.1 M and empty circles: 0.2 M) whereas  $c_{\text{cis}}$  is changed. The inset shows the  $I$ – $V$  curve for  $c_{\text{cis}} = c_{\text{trans}} = 0.1$  M KCl. Icons reflect the sign and the relative amount of the concentration of fixed charges at the channel regions facing the external solutions.

the distribution of fixed charges in the porin and reveals interesting properties concerning the selectivity of permeating systems with non-homogeneous fixed charges.

Fig. 3a shows measurements of  $\Delta\phi_M$  vs the ratio  $c_{\text{cis}}/c_{\text{trans}}$  in the pH configuration 3||12. In each series of experiments  $c_{\text{trans}}$  is kept constant at 0.1 M (filled circles) or 0.2 M KCl (empty circles). The  $I$ – $V$  curve in this case (inset in Fig. 3) shows a pronounced rectification [19].  $\Delta\phi_M$  changes its sign when the concentration gradient  $c_{\text{cis}}/c_{\text{trans}}$  is reversed. In terms of selectivity, this means that the calculated  $t_+$  (Fig. 3b) attains values systematically higher than 0.5 all over the ratio  $c_{\text{cis}}/c_{\text{trans}}$  studied, and the channel, as a whole, is selective to cations. Therefore, qualitatively speaking, we can say that, under the conditions studied in Fig. 3, cation selectivity is an attribute of the channel itself. Interestingly, when the two series of experiments are compared (filled and empty circles in Fig. 3), we see that  $\Delta\phi_M$  decreases in magnitude when increasing  $c_{\text{trans}}$  and consequently  $t_+$  is slightly lower for  $c_{\text{trans}} = 0.2$  M than for  $c_{\text{trans}} = 0.1$  M. As expected, concentrated solutions screen the channel fixed charges more effectively and the channel cationic preference is attenuated.

Fig. 3a and b are not conclusive about the charge distribution of the pore. Although our experiments follow the same trend as those reported for synthetic membranes [44] and nanopores [51] with monopolar distributions of fixed charges, they are also compatible with the presence of a bipolar distribution of fixed charges within the channel. Indeed, a change of sign in  $\Delta\phi_M$  when the concentration gradient is inverted has been observed for instance in synthetic commercial membranes with well-known bipolar structure [52,53]. In the case of the OmpF porin, we find in Fig. 2 some clues for a possible explanation. Under symmetric pH conditions,



**Fig. 4.** Measured membrane potential,  $\Delta\phi_M$  (a) and calculated cation transport number  $t_+$  (b) vs  $c_{cis}/c_{trans}$  ratio for the pH configuration 2||12.  $c_{trans}$  is kept constant (0.1 M KCl) and  $c_{cis}$  is changed. The inset shows the  $I$ - $V$  curve for this pH configuration at  $c_{cis} = c_{trans} = 0.1$  M. Icons have the same meaning as in Fig. 3.

we see that the absolute value of  $\Delta\phi_M$  at pH 3 is substantially lower than at pH 12. This indicates that, in the case of the configuration 3||12, the concentration of positive fixed charges in the channel side close to the solution at acidic pH (*cis*) is lower than that of negative fixed charges in the channel side facing the solution at basic pH (*trans*). As in Fig. 2, icons represent qualitatively the sign and the relative amount of the net fixed charge on each side of the channel. Therefore, although the distribution of fixed charges along the system could be plausibly bipolar, the positive net fixed charge on *cis* side is overcompensated by the negative one on *trans* side, and the channel as a whole behaves as monopolar and exhibits cationic selectivity. A possible way to check this assumption is also found in Fig. 2 and constitutes the next step in our study: if the pH value of the *cis* solution is decreased, we will obtain a bipolar distribution with a better balance between positive and negative fixed charges and the system must show then a behavior more similar to that expected for a bipolar one.

Fig. 4a shows measurements of  $\Delta\phi_M$  performed for several concentration ratios under highly asymmetric pH conditions: 2||12. The rectification properties displayed by the  $I$ - $V$  curve (inset) do not differ much from the configuration 3||12 (inset in Fig. 3). However, remarkable differences in the channel selectivity arise between both situations. In the case 2||12, we find that the sign of  $\Delta\phi_M$  does not change when the concentration gradient  $c_{cis}/c_{trans}$  is inverted and consequently the calculated  $t_+$  (Fig. 4b) becomes lower than 0.5 for  $c_{cis} < c_{trans}$  and higher than 0.5 for  $c_{cis} > c_{trans}$ . The conclusion to be drawn here is that, amazingly, the same ion channel is selective to anions for  $c_{cis} < c_{trans}$  and selective to cations for  $c_{cis} > c_{trans}$ . Therefore, not only the values of  $\Delta\phi_M$  and  $t_+$ , but also the nature of the selectivity of the ion channel depends on the pH and the ratio

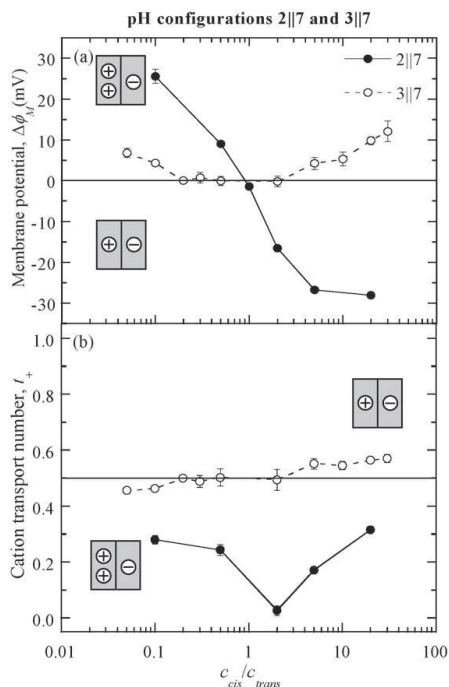
$c_{cis}/c_{trans}$ . This can be rationalized in terms of the distribution of the fixed charges along the channel and interestingly it is just what TMS theory predicts for bipolar ion exchange membranes with equal concentration of positive and negative fixed charges [52–54]. When  $c_{cis} < c_{trans}$ , the negative fixed charges of the ion channel close to the *trans* solution are more screened than the positive ones facing the *cis* solution, and the channel shows global anionic selectivity. For  $c_{cis} > c_{trans}$  the positive fixed charges facing the *cis* solution are screened more effectively than the negative ones facing the *trans* solution and therefore, the channel as a whole is selective to cations. This biological example reveals that in the case of inhomogeneous systems the definition of selectivity is problematic because it is not necessarily a quality of the system itself, but depends strongly on external factors like pH, concentration of electrolyte, type of electrolyte and even the direction of the salt gradient imposed to the system.

Fig. 4 displays an additional interesting channel feature. The positive values found for  $\Delta\phi_M$  when  $c_{cis} < c_{trans}$  indicate that the current due to the concentration gradient  $I$  is positive and flows from solution *trans* to solution *cis*. This means that, under such conditions, the system displays ion transport against its concentration gradient. This phenomenon is crucial in the case of active transport across biological membranes and additionally is a classical topic in the membrane technology field [55]. The physical mechanism underlying this phenomenon is, commonly, the counter transport of other charged species. In the present case the driving force responsible for this uphill transport is the pH difference imposed across the channel.

The asymmetric pH configurations 2||12 and 3||12 displayed up to now should not be considered in terms of OmpF physiological environment, since such extreme pH gradient is not realistic from the biological point of view. On the contrary, 2||12 and 3||12 should be understood as custom-made archetypes of inhomogeneous nanopores. However, for the sake of comprehensiveness, we will end our study with other pH configurations that can be seen as more realistic from the biological point of view. It has been reported that *Escherichia coli* can survive inside the stomach, at very acidic external pH values, while the cytoplasm pH is kept close to seven by internal cellular mechanisms [56,57]. Therefore, we consider now in Fig. 5 the pH configurations 2||7 and 3||7. We see again that small changes in the pH value of the *cis* solution lead to high differences in  $\Delta\phi_M$  (Fig. 5a) and  $t_+$  (Fig. 5b). Under configuration 2||7 the channel behaves like monopolar charged membranes: the sign of  $\Delta\phi_M$  changes when the concentration gradient  $c_{cis}/c_{trans}$  is reversed (Fig. 5a), and  $t_+$  values are always below 0.5 (the channel is in this case selective to anions in the  $c_{cis}/c_{trans}$  range studied). In terms of fixed-charge distributions, these results can be understood taking into account that the configuration 2||12 performs like bipolar charge distributions (see Fig. 4). When the pH of the *trans* solution is reduced to obtain the configuration 2||7, many of the negative fixed charges close to the *trans* solution are neutralized (see icons in Fig. 5), and the channel as a whole is anion selective.

Interestingly, under configuration 3||7 the channel selectivity performs like that of bipolar membranes: the sign of the measured values of  $\Delta\phi_M$  remains unchanged when the concentration gradient  $c_{cis}/c_{trans}$  is reversed (Fig. 5a). Consequently, for  $c_{cis} < c_{trans}$  the channel is slightly selective to anions ( $t_+ \leq 0.5$ ), and for  $c_{cis} > c_{trans}$  the channel is slightly cation selective ( $t_+ \geq 0.5$ ) (Fig. 5b). Again, we can rationalize these results making reference to the configuration 3||12 described as monopolar and selective to cations in Fig. 3. When the pH of the *trans* solution is lowered to obtain the configuration 3||7, the negative charges facing the *trans* side are neutralized so that the negative fixed-charge concentration becomes comparable to that of the positive fixed charges close to the *cis* side. A bipolar-type fixed charge structure with relatively low concentration of negative and positive charges is then obtained (see icons in Fig. 5). The con-





**Fig. 5.** Measured membrane potential,  $\Delta\phi_M$  (a) and calculated cation transport number  $t_+$  (b) vs  $c_{cis}/c_{trans}$  ratio for pH configurations 2||7 and 3||7.  $c_{trans}$  is kept constant (0.1 M KCl) and  $c_{cis}$  is changed. Icons have the same meaning as in Fig. 3.

**Table 1**

Values of  $\Delta\phi_M$  and  $t_+$  obtained under variable pH gradient while maintaining fixed  $pH_{trans} = 7$  and the electrolyte concentration gradient ( $c_{cis} = 1$  M,  $c_{trans} = 0.1$  M KCl).

$pH_{cis}$	$\Delta\phi_M$ (mV)	$t_+$	Selectivity
2.50	-22.0	0.31	Anionic
2.75	-9.8	0.42	Anionic
3.00	5.3	0.55	Cationic

OmpF channel selectivity for  $pH_{trans} = 7$  in 1 M  $c_{cis}/0.1$  M  $c_{trans}$  KCl solution.

clusion arising here is that, in order to find an unambiguously bipolar behavior in  $\Delta\phi_M$  and  $t_+$ , a good balance between the concentration of positive and negative fixed charges is essential.

To illustrate in detail the transition between the monopolar-like to the bipolar-like behavior for  $pH_{trans} = 7$ , we have measured  $\Delta\phi_M$  at  $pH_{cis} = 2.5, 2.75$  and 3 in the case  $c_{cis} = 1$  M and  $c_{trans} = 0.1$  M KCl. The results have been summarized in Table 1. We see again the critical effect of pH on the fixed-charge regulation and consequently on the transport properties of the ion channel: the membrane potential decreases in almost 30 mV when the pH is increased in 0.5 units only, and the channel selectivity changes from anionic to cationic. The transition between the two regimes occurs at  $pH_{cis} \approx 2.9$  for the concentration gradient used in the experiments.

#### 4. Conclusions

A biological nanopore, the bacterial porin OmpF, has been investigated by patch-clamp experiments performed under asymmetric pH conditions. The applied pH gradient originates strong asymmetries in the distribution of fixed charges along the ion channel, which eventually lead to bipolar-type fixed-charge distributions

analogous to those observed in synthetic bipolar membranes. Membrane potential measurements reveal also that the definition of selectivity in inhomogeneous systems is delicate and depends on a number of external parameters such as the pH gradient and the direction of the concentration gradient used in the experiments. In particular, we have demonstrated that the same ion channel can be selective to anions at a given  $c_{cis}/c_{trans}$  ratio and selective to cations when the concentration gradient is inverted. This directional selectivity constitutes a unique trait, characteristic of bipolar-type fixed-charge distributions. Our study can be also of interest in the characterization of synthetic membranes with fixed charges dependent on the pH, amphoteric membranes and synthetic nanopores.

#### Acknowledgement

Financial support from the Spanish Ministry of Education (projects FIS2007-60205 and Programme of Materials) is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] M. Nishizawa, V.P. Menon, C.R. Martin, Metal nanotubule membranes with electrochemically switchable ion-transport selectivity, *Science* 268 (1995) 700.
- [2] Z. Siwy, A. Fulinski, Fabrication of a synthetic nanopore ion pump, *Phys. Rev. Lett.* 89 (2002) 198103.
- [3] J. Cervera, B. Schiedt, P. Ramírez, A Poisson/Nernst-Planck model for ionic transport through synthetic conical nanopores, *Europhys. Lett.* 71 (2005) 35.
- [4] J. Cervera, B. Schiedt, R. Neumann, S. Mafé, P. Ramírez, Ionic conduction, rectification, and selectivity in single conical nanopores, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 104706.
- [5] Z.S. Siwy, Ion-current rectification in nanopores and nanotubes with broken symmetry, *Adv. Funct. Mat.* 16 (2006) 735.
- [6] C. Dekker, Solid-state nanopores, *Nat. Nanotech.* 2 (2007) 209.
- [7] I. Vlasiouk, Z.S. Siwy, Nanofluidic diode, *Nano Lett.* 7 (2007) 552.
- [8] L.T. Sexton, L.P. Horne, C.R. Martin, Developing synthetic conical nanopores for biosensing applications, *Mol. Biosyst.* 3 (2007) 667.
- [9] C.C. Striemer, T.R. Gaborski, J.L. McGrath, P.M. Fauchet, Charge- and size-based separation of macromolecules using ultrathin silicon membranes, *Nature* 445 (2007) 749.
- [10] A. van den Berg, M. Wessling, Silicon for the perfect membrane, *Nature* 445 (2007) 726.
- [11] K. Healy, B. Schiedt, A.P. Morrison, Solid-state nanopore technologies for nanopore-based DNA analysis, *Nanomedicine* 2 (2007) 875.
- [12] P. Ramírez, P.Y. Apel, J. Cervera, S. Mafé, Pore structure and function of synthetic nanopores with fixed charges: tip shape and rectification properties, *Nanotechnology* 19 (2008) 315707.
- [13] E.B. Kalman, I. Vlasiouk, Z.S. Siwy, Nanofluidic bipolar transistors, *Adv. Mater.* 20 (2008) 293.
- [14] R.B. Schoch, J. Han, P. Renaud, Transport phenomena in nanofluidics, *Rev. Mod. Phys.* 80 (2008) 839.
- [15] J. Griffiths, The realm of the nanopore, *Anal. Chem.* 80 (2008) 23.
- [16] D.K. Shenoy, W.R. Barger, A. Singh, R.G. Panchal, M. Misakian, V.M. Stanford, J.J. Kasianowicz, Functional reconstitution of protein ion channels into planar polymerizable phospholipid membranes, *Nano Lett.* 5 (2005) 1181.
- [17] H. Miedema, M. Vrouenraets, J. Wierenga, W. Meijberg, G. Robillard, B. Eisenberg, A biological porin engineered into a molecular, nanofluidic diode, *Nano Lett.* 7 (2007) 2886.
- [18] K. Malek, R.A. van Santen, Chiral separation in modified silica nanotube membranes: a molecular simulation study, *J. Membr. Sci.* 311 (2008) 192.
- [19] A. Alcaraz, P. Ramírez, E. García-Giménez, M.L. López, A. Andrio, V.M. Aguilera, A pH-tunable nanofluidic diode: electrochemical rectification in a reconstituted single ion channel, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 21205.
- [20] V.J. Frilette, Preparation and characterization of bipolar ion-exchange membranes, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 435.
- [21] R. Simons, Preparation of a high-performance bipolar membrane, *J. Membr. Sci.* 78 (1993) 13.
- [22] S.D. Li, C.C. Wang, C.Y. Chen, Preparation and characterization of a novel bipolar membrane by plasma-induced polymerization, *J. Membr. Sci.* 318 (2008) 429.
- [23] M.P. Mier, R. Ibáñez, I. Ortiz, Influence of ion concentration on the kinetics of electrodialysis with bipolar membranes, *Sep. Purif. Technol.* 59 (2008) 197.
- [24] A.J.B. Kemperman (Ed.), *Handbook on Bipolar Membrane Technology*, Twente University Press, Enschede, The Netherlands, 2000.
- [25] E. Lobytseva, T. Kallio, K. Konturi, Bipolar membranes in forward bias region for fuel cell reactors, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 1165.
- [26] E. Lobytseva, T. Kallio, N. Alekseyeva, K. Tammeveski, K. Konturi, Electrochemical synthesis of hydrogen peroxide: rotating disk electrode and fuel cell studies, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 7262.

- [27] S. Koter, Modeling of weak acid production by the EDB method, *Sep. Purif. Technol.* 57 (2007) 406.
- [28] M.P. Mier, R. Ibáñez, I. Ortiz, Influence of process variables on the production of bovine milk casein by electrodialysis with bipolar membranes, *Biochem. Eng. J.* 40 (2008) 304.
- [29] F.L.T. Shee, J. Arul, S. Brunet, L. Bazinet, Effect of bipolar membrane electrobasification on chitosanase activity during chitosan hydrolysis, *J. Biotechnol.* 134 (2008) 305.
- [30] A. Grabowski, G.Q. Zhang, H. Strathmann, G. Eigenberger, Production of high-purity water by continuous electrodeionization with bipolar membranes: influence of concentrate and protection compartment, *Sep. Purif. Technol.* 60 (2008) 86.
- [31] A. Mauro, Space charge regions in fixed charge membranes and the associated property of capacitance, *Biophys. J.* 2 (1962) 179.
- [32] H.G.L. Coster, A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of punchthrough, *Biophys. J.* 5 (1965) 669.
- [33] P. Ramírez, S. Mafé, A. Tanioka, K. Saito, Modelling of membrane potential and ionic flux in weak amphoteric polymer membranes, *Polymer* 38 (1997) 4931.
- [34] P. Ramírez, A. Alcaraz, S. Mafé, Effects of pH on ion transport in weak amphoteric membranes, *J. Electroanal. Chem.* 436 (1997) 119.
- [35] T. Jimbo, P. Ramírez, A. Tanioka, S. Mafé, N. Minoura, Passive transport of ionic drugs through membranes with pH dependent fixed charges, *J. Colloid Interface Sci.* 225 (2000) 447.
- [36] P. Ramírez, A. Alcaraz, S. Mafé, J. Pellicer, Donan equilibrium of ionic drugs in pH-dependent fixed charge membranes: theoretical modeling, *J. Colloid Interface Sci.* 253 (2002) 171.
- [37] P. Ramírez, S. Mafé, A. Alcaraz, J. Cervera, Modeling of pH-switchable ion transport and selectivity in nanopore membranes with fixed charges, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 13178.
- [38] P. Ramírez, S. Mafé, V.M. Aguilera, A. Alcaraz, Synthetic nanopores with fixed charges: an electrodiffusion model for ionic transport, *Phys. Rev. E* 68 (2003) 011910.
- [39] K.-Y. Chun, S. Mafé, P. Ramírez, P. Stroeve, Protein transport through gold-coated, charged pores: effects of applied voltage, *Chem. Phys. Lett.* 418 (2006) 561.
- [40] J.-R. Ku, S.-M. Lai, N. Ileri, P. Ramírez, S. Mafé, P. Stroeve, pH and ionic strength effects on amino acid transport through Au-nanotubule membranes charged with self-assembled monolayers, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 2965.
- [41] S.M. Bezrukov, I. Vodyanoy, Probing Alamethicin channels with water-soluble polymers: effect of conductance of channel states, *Biophys. J.* 64 (1993) 16.
- [42] M. Montal, P. Mueller, Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972) 3561.
- [43] A. Alcaraz, E. Nestorovich, M.L. López, E. García-Giménez, S.M. Bezrukov, V.M. Aguilera, Diffusion, exclusion, and specific binding in a large channel: a study of OmpF selectivity inversion, *Biophys. J.* 96 (2008) 56.
- [44] N. Lakshminarayanaiah, *Equations of Membrane Biophysics*, Academic Press, New York, 1984.
- [45] E.M. Nestorovich, T.K. Rostovtseva, S.M. Bezrukov, Residue ionization and ion transport through OmpF channels, *Biophys. J.* 85 (2003) 3718.
- [46] A. Alcaraz, E.M. Nestorovich, M. Aguilera-Arzo, V.M. Aguilera, S.M. Bezrukov, Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF, *Biophys. J.* 87 (2004) 943.
- [47] A. Fulinski, I.D. Kosinska, Z. Siwy, On the validity of continuous modelling of ion transport through nanochannels, *Europhys. Lett.* 67 (2004) 683.
- [48] S. Mafé, P. Ramírez, Electrochemical characterisation of polymer ion-exchange bipolar membranes, *Acta Polym.* 48 (1997) 234.
- [49] D. Constantin, Z.S. Siwy, Poisson-Nernst-Planck model of ion current rectification through a nanofluidic diode, *Phys. Rev. E* 76 (2007) 041202.
- [50] P. Ramírez, V. Gómez, J. Cervera, B. Schiedt, S. Mafé, Ion transport and selectivity in nanopores with spatially inhomogeneous fixed charge distributions, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 194703.
- [51] J. Cervera, A. Alcaraz, B. Schiedt, R. Neumann, P. Ramírez, Asymmetric selectivity of synthetic conical nanopores probed by reversal potential measurements, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 12265.
- [52] P. Ramírez, S. Mafé, J.A. Manzanera, J. Pellicer, Membrane potential of bipolar membranes, *J. Electroanal. Chem.* 404 (1996) 187.
- [53] A. Alcaraz, P. Ramírez, S. Mafé, H. Holdik, B. Bauer, Ion selectivity and water dissociation in polymer bipolar membranes studied by membrane potential and current-voltage measurements, *Polymer* 41 (2000) 6627.
- [54] A. Higuchi, T. Nakagawa, Membrane potential and permeation of salts across bipolar membranes, *J. Membr. Sci.* 32 (1987) 281.
- [55] P. Ramírez, A. Alcaraz, S. Mafé, Model calculations of ion transport against its concentration gradient when the driving force is a pH difference across a charged membrane, *J. Membr. Sci.* 135 (1997) 135.
- [56] F. Díez-González, J.B. Russel, The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid, *Microbiology* 143 (1997) 1175.
- [57] K.N. Jordan, L. Oxford, C.P. O'Byrne, Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3048.



## Diffusion, Exclusion, and Specific Binding in a Large Channel: A Study of OmpF Selectivity Inversion

Antonio Alcaraz,<sup>†</sup> Ekaterina M. Nestorovich,<sup>‡</sup> M. Lidón López,<sup>†</sup> Elena García-Giménez,<sup>†</sup> Sergey M. Bezrukov,<sup>‡</sup> and Vicente M. Aguilera<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Física, Universitat Jaume I, 12080 Castellón, Spain; and <sup>‡</sup>Laboratory of Physical and Structural Biology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892

**ABSTRACT** We find that moderate cationic selectivity of the general bacterial porin OmpF in sodium and potassium chloride solutions is inverted to anionic selectivity in concentrated solutions of barium, calcium, nickel, and magnesium chlorides. To understand the origin of this phenomenon, we consider several factors, which include the binding of divalent cations, electrostatic and steric exclusion of differently charged and differently sized ions, size-dependent hydrodynamic hindrance, electrokinetic effects, and significant “anionic” diffusion potential for bulk solutions of chlorides of divalent cations. Though all these factors contribute to the measured selectivity of this large channel, the observed selectivity inversion is mostly due to the following two. First, binding divalent cations compensates, or even slightly overcompensates, for the negative charge of the OmpF protein, which is known to be the main cause of cationic selectivity in sodium and potassium chloride solutions. Second, the higher anionic (versus cationic) transport rate expected for bulk solutions of chloride salts of divalent cations is the leading cause of the measured anionic selectivity of the channel. Interestingly, at high concentrations the binding of cations does not show any pronounced specificity within the divalent series because the reversal potentials measured in the series correlate well with the corresponding bulk diffusion potentials. Thus our study shows that, in contrast to the highly selective channels of neurophysiology that employ mostly the exclusion mechanism, quite different factors account for the selectivity of large channels. The elucidation of these factors is essential for understanding large channel selectivity and its regulation *in vivo*.

### INTRODUCTION

Ion selectivity is a critical property of the channels of excitable membranes (1,2). It is essential for the cell function that each ionic species (typically “small ions” such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, or Cl<sup>−</sup>) permeates across membranes at different regulated rates, and this regulatory mission is often accomplished by selective ion channels. In the case of large channels represented by bacterial porins (3–5), toxins (6–9), voltage-dependent anionic channels of outer mitochondrial membrane (10), and others, the conduction of small ions has not been necessarily attributed to their major functions. Most of these channels were designed by nature to facilitate the exchange of metabolites and other larger molecules between cells and between organelles within cells. However, the exploration of large channel selectivity to small ions is appealing as it tests our understanding of physical principles underlying transport through these nanoscale objects.

The functional aspects of small-ion conduction by large channels are still debated (5,10). A recent study of a bacterial porin, OmpF, demonstrated that this channel develops a nearly ideal cationic selectivity when salt concentration is reduced to a subdecimolar range (11). A plausible functionally important consequence of this finding is that under special but physiologically relevant conditions bacteria can develop a significant transient potential across the outer membrane. This potential may serve as an important physiological signal.

The ability of channels to discriminate between ions depends on their intrinsic properties (size, hydration, etc.) as well as on the interaction of permeant ions with the channel and among themselves. In other words, ion selectivity is a property of the system that necessarily includes both the channel and the electrolyte. In this sense, two factors have been cited as the main contributors to the large channel selectivity: the differences in ion mobilities and the electrostatic exclusion due to the interaction between permeating ions and channel ionizable residues. The latter is usually considered to be the leading reason for the high selectivity. However, other factors—such as entropic effects related to the preferential rejection of ions because of their size, short range nonelectrostatic interactions, and osmotic effects—may play a role in certain specific cases. As many of these factors are closely interconnected, experiments designed to separate their roles are necessary.

Several experimental protocols provide the means of different quantitative estimations for ion selectivity. To this end, mole fraction, conductance ratio, and reversal potential measurements define operational quantities accounting for this property (12). As may be expected, these protocols provide similar but not identical results. Mole fraction experiments give a quantification of ion partitioning between the channel and the surrounding solution, i.e., the excess chemical potential of ions inside the channel. Conductance ratio measurements yield information about both partitioning and relative diffusivities of the ions in the channel, but require comparison of different sets of measurements and

Submitted June 26, 2008, and accepted for publication September 26, 2008.

\*Correspondence: [aguillel@fca.uji.es](mailto:aguillel@fca.uji.es)

Editor: Michael Pusch.

© 2009 by the Biophysical Society  
0006-3495/09/01/0056/11 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2008.09.024

certain model assumptions to deduce selectivity. Reversal potential measurement is the method of choice to quantify selectivity because it provides a joint measure of partition and diffusion, and the sign of the measured potential provides a quick estimate of the channel selectivity via the anion-cation permeability ratios given by the Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation (1). For a large channel, cation selectivity is explained as a consequence of a negative effective charge of the channel, whereas an anionic selectivity is immediately connected to a positive effective charge. This method is so popular that in practice it is considered almost a universal indicator of ion selectivity, irrespective of the experimental conditions used (13).

We would like to note that this procedure was originally proposed for experiments performed at moderate gradients of KCl solutions buffered at neutral pH and with salts of divalent cations present in micromolar or millimolar concentrations. At such conditions, the specific binding of ions is usually irrelevant, and diffusion potentials are also negligible because  $K^+$  and  $Cl^-$  have almost equal bulk mobilities and, therefore, hydrated sizes. This allows one to reduce the description to electrostatic exclusion only and to interpret selectivity exclusively in terms of the effective channel charge. However, in experiments with concentrated solutions used at large gradient ratios (50–100) and electrolytes such as NaCl or LiCl and, indeed, chloride salts of divalent cations such as  $CaCl_2$  or  $MgCl_2$ , the description of selectivity in terms of ion accumulation/depletion can only be an oversimplification of the problem since the contributions of specific binding and diffusion potentials can be quite significant. As often happens, popular approaches far from the conditions where they have proved to be successful can lead to a poor description of the system and, therefore, must be carefully inspected.

There is abundant but scattered information on the selectivity of large channels. The main message of the existing literature can be summarized by saying that ion selectivity is not just a number, a universal property of the channel itself but, on the contrary, a strong function of several factors including salt concentration, solution pH, channel orientation, lipid membrane composition, and type of electrolyte (e.g., 11,14–17).

In this work we study OmpF, a general diffusion bacterial porin that forms large channels in the outer membrane of *Escherichia coli* (5,18). Each monomer assembles into a 16-stranded  $\beta$ -barrel, leaving an hourglass-shaped aqueous pore with a diameter in the range of 1–4 nm (19). In planar lipid bilayers OmpF homotrimeric channels allow multiionic transport and exhibit moderate cationic selectivity in solutions of monovalent salts at neutral pH (11). This selectivity has been reported to be highly sensitive to the charge state of the ionizable residues of the channel (16), particularly of those lying at the channel constriction (20). Here we show that, depending on the experimental conditions, selectivity of the channel may be dominated by different sources. In particular, we report an unusual inversion of normally cat-

ionic selectivity of OmpF in solutions of divalent cations such as  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ .

## MATERIALS AND METHODS

Wild-type (WT) OmpF, mutants D113A and E117A, were a generous gift of Drs. Prashant Phale, Anne Delcour, and Mathias Winterhalter. Mutant D113C/E117C was kindly provided by Dr. Henk Miedema. Bilayer membranes were formed from two monolayers prepared from a 1% solution of diphyanoylphosphatidylcholine (DPhPC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) in pentane (Burdick and Jackson, Muskegon, MI) on 70–80- $\mu$ m-diameter orifices in the 15- $\mu$ m-thick Teflon partition that separated two chambers (21,22). The orifices were pretreated with a 1% solution of hexadecane in pentane. The total capacitance depended on the actual location of the orifice in the film (and thus the area of the film exposed to salt solution), but membrane capacitance was always ~100–150 pF. Aqueous solutions of KCl were buffered by 5 mM MES (2-(*N*-morpholino)-ethanesulphonic acid) at pH values below pH 6, by 5 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid) at pH values (6–8), by 5 mM CHES (2-(cyclohexylamino)-ethanesulphonic acid) at pH 9, and by 10 mM CAPS (3-(cyclohexylamino)-propanesulphonic acid) at pH values above 9. All measurements were performed on single OmpF channels at room temperature ( $23.0^\circ C \pm 1.5^\circ C$ ). Single-channel insertion was achieved by adding 0.1–0.3  $\mu$ l of a 1  $\mu$ g/ml solution of OmpF in the buffer that contained 1 M KCl and 1% (v/v) octyl polyoxyethylene (Alexis, Switzerland) to 1 ml aqueous phase at the *cis* side of the membrane only while stirring.

If not stated otherwise, the membrane potential was applied using Ag/AgCl electrodes in 2 M KCl, 1.5% agarose bridges assembled within standard 200  $\mu$ l pipette tips (21). Potential is defined as positive when it is greater at the side of protein addition (the *cis* side of the membrane cell). An Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) in the voltage-clamp mode was used for measuring the current and applying potential. Data were filtered by a low-pass eight-pole Butterworth filter (Model 9002, Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50 kHz. The membrane chamber and the head stage were isolated from external noise sources with a double  $\mu$ -metal screen (Amuneal Manufacturing, Philadelphia, PA).

The reversal potential was obtained as follows. First, a lipid membrane was formed at a given salt concentration gradient. Second, a single OmpF channel was inserted at zero potential and the channel conductance was checked by applying +50 mV (–50 mV in divalent salts) and then switching potential polarity (Fig. 1). Third, the ionic current through the channel was manually set to zero by adjusting the applied potential. The potential needed to achieve zero current,  $V_{0Exp}$ , was then corrected by the liquid junction potential (LJP) calculated from Henderson's equation (see Appendix) to obtain reversal potential. Each point was measured for at least three different channels in three different experiments to ensure reproducibility and to estimate the standard deviation. In some experiments, negative potentials of ~100 mV were applied to speed up channel insertion.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Measuring OmpF selectivity inversion

One of the unexpected results of this study is OmpF selectivity inversion in concentrated solutions of salts of divalent cations. Fig. 1 demonstrates typical current traces of spontaneous channel insertion at 20-fold gradients of a divalent salt (2.0 M  $CaCl_2$  from the *cis* side and 0.1 M  $CaCl_2$  from the *trans* side, Fig. 1 B) and a monovalent salt (2.0 M KCl from the *cis* side and 0.1 M KCl from the *trans* side, Fig. 1 C). It is seen that channel insertion results in a finite current jump even at zero applied potential and that the

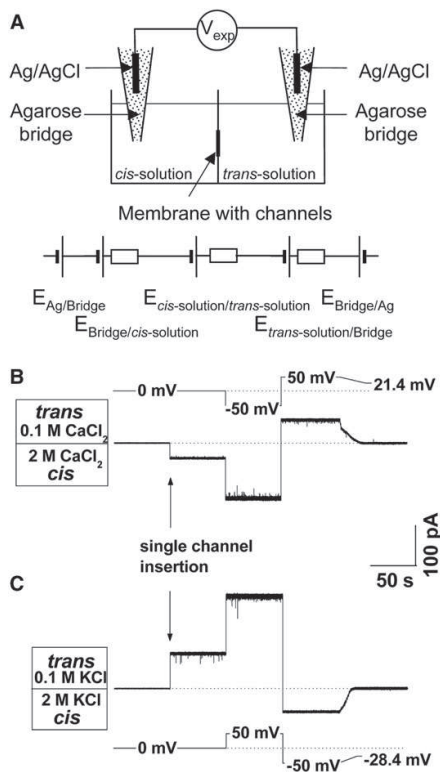


FIGURE 1 (A) Schematic illustration of the electric elements contributing to the measured potential  $V_{\text{exp}}$  (after Finkelstein and Mauro (25)). The goal is to measure zero-current potential between the *cis* and *trans* solutions of the cell. At equal concentrations and same salt types in the bridges, the electrochemical potentials  $E_{\text{Ag}/\text{Bridge}}$  and  $E_{\text{Bridge}/\text{Ag}}$  compensate each other because they are equal in modulus and opposite in sign. These are equilibrium silver/silver chloride electrode potentials. Potentials between the agarose bridges are nonequilibrium and stem from the differences in diffusion coefficients of the involved ionic species and can be estimated from Henderson's equation (50). Depending on experimental conditions, they can be either of the same or opposite sign (see Appendix). The internal resistances of the elements representing contacts between silver/silver chloride electrodes and solutions in bridges are not shown, as they are much smaller than all other resistances in the system. Current traces of spontaneous channel insertion at 20-fold gradients of  $\text{CaCl}_2$  (B) and  $\text{KCl}$  (C). The potentials that should be applied to zero currents in the two cases are of opposite signs.

directions of the currents for these two salts are opposite. Correspondingly, potentials that are necessary to apply to zero currents in the two cases are of opposite signs, namely  $V_{0\text{Exp}} = -28.4 \text{ mV}$  for  $\text{KCl}$  and  $V_{0\text{Exp}} = +21.4 \text{ mV}$  for  $\text{CaCl}_2$ .

These experimentally found potentials contain significant corrections arising from liquid junctions between the agarose-filled parts of the electrodes (see Materials and Methods) and the electrolyte solutions they are in contact with (Fig. 1 A). The origin of LJPs is related to the difference in cation and anion concentrations and mobilities both in solutions of the membrane cell and in solutions in the agarose-

filled parts of the electrodes (23–25). Because concentrations of the solutions in the opposite halves of the cell are not the same, these potentials are not equal to each other. Indeed, as Table 3 demonstrates, these potentials depend not only on salt concentrations in the cell but also on salt concentration in the agarose-filled parts of the electrodes. For this reason, in the case of an asymmetric system LJPs do not compensate for each other. To obtain a true reversal potential which relates to the physical parameters of the system under study, but not to the details of the measuring procedure (such as type and concentration of salts in the bridges), LJPs should be accounted for. Because the direct measurement of these potentials is problematic (23,26), we use Henderson's equation for their calculation (Appendix).

Reversal potentials are calculated from the experimentally found potentials  $V_{0\text{Exp}}$ , corresponding to zero current in the circuit shown in Fig. 1 A. The results of the measurements, examples of which are given in Fig. 1, B and C, and Table 3, are presented in Fig. 2. The data for  $\text{KCl}$  are in good agreement with all data reported earlier in the literature at the same conditions (11,15,16,27–29). However, this is not the case for the reversal potentials in  $\text{NaCl}$  or  $\text{CaCl}_2$  solutions where one can find a great dispersion in the reported values and corresponding interpretations (11,27–31). This dispersion is sometimes attributed to the variability in the parameters of the  $\text{OmpF}$  channels used in the reconstitution experiments, but such a conjecture is barely convincing. Indeed, channels do show persistent variability of their properties (32). However, it is not clear why the same reasons would not affect  $\text{KCl}$  data to a similar extent as for the other electrolytes. Thus, we can conclude that something not present in  $\text{KCl}$  experiments is probably misleading in experiments with other salts. This motivated us to closely inspect the measuring procedure of reversal potential (Appendix).

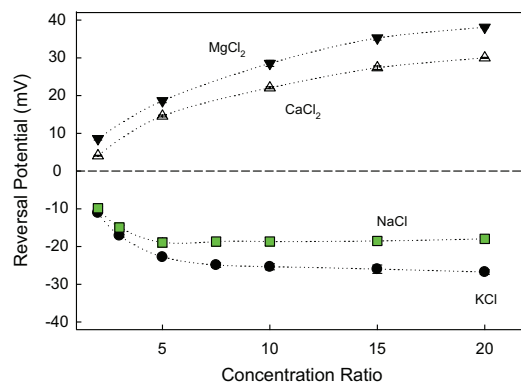


FIGURE 2  $\text{OmpF}$  channel reversal potential measured in monovalent ( $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ) and divalent salts ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ) at pH 6. Salt concentration is 0.1 M on the *trans* side, and concentration on the *cis* side varies up to a 20-fold concentration ratio. Error bars are smaller than the symbol size. Each point was measured for at least three different channels in three different experiments.

The reversal potentials in Fig. 2 are measured at pH 6. It is seen that in 1-1 salts, the channel favors the passage of cations (negative reversal potentials), whereas in 2-1 salts it is more permeable to anions (positive reversal potentials). Indeed, standard calculations of permeability ratios according to the GHK equation indicate that OmpF is moderately cation selective for KCl ( $P_{K^+}/P_{Cl^-} = 2.9$  at  $C_{cis} = 2$  M and  $C_{trans} = 0.1$  M) but displays an anionic selectivity of divalent cations ( $P_{Mg^{2+}}/P_{Cl^-} = 0.1$  at  $C_{cis} = 2$  M and  $C_{trans} = 0.1$  M). Therefore, if the electrostatic exclusion due to the charges on the OmpF molecule is considered the only possible source of ion selectivity, this would lead to the conclusion that the effective negative channel charge acting on monovalent cations (11,16) is transformed into a positive charge acting now on divalent cations. Clearly, additional effects contributing to the overall selectivity must be present.

### Different sources of ion selectivity

To clarify the many sources of ion selectivity and the role of diffusion, we can consider Planck's expression for the potential difference across a constrained liquid junction for a  $z_+z_-$  binary electrolyte, so that diffusion potential scales with the logarithm of the concentration ratio:

$$\Delta\phi_{diff} \equiv \phi_{cis} - \phi_{trans} = \left(\frac{k_B T}{e}\right) \frac{D_- - D_+}{z_+ D_+ - z_- D_-} \ln \frac{C_{cis}}{C_{trans}}, \quad (1)$$

where  $k_B$  and  $T$  have their usual meaning of the Boltzmann constant and absolute temperature, respectively, and  $e$  is the elementary charge.  $D_i$  denote the ionic diffusion coefficients. By means of Eq. 1, we can calculate the bulk diffusion potential for any electrolyte involved in our study at every concentration ratio. This provides an alternative representation of Fig. 2 by plotting reversal potential data against their respective bulk diffusion potentials. The plots for 2-1 salts shown in Fig. 3 display a clear correlation between measured reversal potential and calculated bulk diffusion potential. This agreement, not found in the case of 1-1 salts, suggests that the measured potential for salts of divalent cations is mostly due to the different mobilities of anions and cations.

To understand why 1-1 salts and 2-1 salts behave differently, we will concentrate now on two alkaline chlorides (KCl and NaCl), where electrostatic exclusion must be identical and only diffusional effects are expected to be different. In cation-selective channels like OmpF, the contribution of electrostatic exclusion to reversal potential is a potential that is more negative on the high concentration side. However, for salts of anions with higher mobility than the cation, the diffusion potential is more positive on the highly concentrated side. Thus, in KCl, NaCl, LiCl, and other chloride salts of cations with larger hydrated radii, the two contributions (electrostatic exclusion and diffusion) have opposite signs. In KCl, the diffusion potential is very small, but in other salts like NaCl it may be significant. Fig. 4 shows the reversal

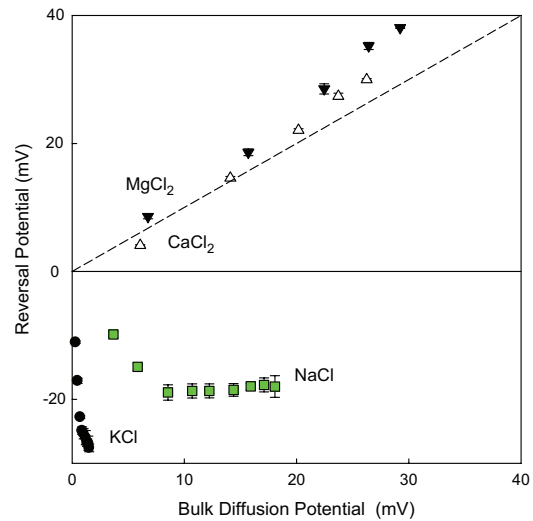


FIGURE 3 Reversal potential as a function of bulk diffusion potential expected for different salts at their concentration gradients varied up to a 20-fold ratio (Fig. 2). Bulk diffusion potential is calculated for each pair of concentrations of every salt according to Planck's equation (see main text).

potential measured in OmpF at pH 6 for an increasing concentration ratio of KCl (solid circles) and NaCl (solid squares). From the reversal potential in Fig. 4, one could think that the channel prefers potassium ions over sodium ions. However, the difference between the reversal potentials in KCl and NaCl scales rather well with the logarithm of the concentration ratio. This fact suggests that if it were not for

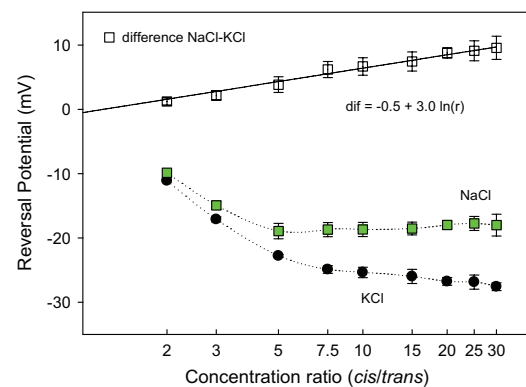


FIGURE 4 Reversal potential as a function of the *cis/trans* concentration ratio for KCl (circles) and NaCl (solid squares) at pH 6. Solution concentration on the *trans* side was fixed at 0.1 M, whereas the concentration on the *cis* side was increased from 0.1 M to 3 M. Membranes were formed from DPhPC. The difference between the values of reversal potential in NaCl and KCl solutions (open squares) scales with the natural logarithm of the concentration ratio ( $r = 0.99$ ).

the differences in the diffusivities of potassium and sodium, the channel would be equally selective to both salts. In other words, the difference in the reversal potentials would be just the difference in the diffusion potential of NaCl and KCl, which can be calculated as follows:

$$\Delta\phi_{\text{diff}}^{\text{NaCl}} - \Delta\phi_{\text{diff}}^{\text{KCl}} = \left(\frac{k_B T}{e}\right) \left[ \frac{D_{\text{Cl}} - D_{\text{Na}}}{D_{\text{Na}} + D_{\text{Cl}}} - \frac{D_{\text{Cl}} - D_{\text{K}}}{D_{\text{K}} + D_{\text{Cl}}} \right] \ln \frac{C_{\text{cis}}}{C_{\text{trans}}}. \quad (2)$$

The slope of the regression line in Fig. 4 is 3.0, the value that indeed differs from 4.8, which is the slope predicted by Eq. 2 using infinite dilution bulk diffusion coefficients. This difference is expected because of the several factors (such as hydrodynamic hindrance, ion-residue interactions, and ion-ion correlations) that surely change diffusion coefficients in the pore and also because in the general case diffusion potentials are not additive components of reversal potentials (11). Nevertheless, this result illustrates the importance of different bulk diffusivities of ions in OmpF selectivity.

### Specific binding of divalent cations

Previous studies demonstrated that the OmpF charge is largely regulated by the solution pH (11,16). Continuum electrostatic calculations show that lowering pH decreases the overall negative charge of the channel and eventually changes its sign (11,29). To check how reversal potential depends on the magnitude of the channel negative charge, we performed measurements over a broad range of pH in 10-fold concentration gradient (0.1 M *cis* | 1 M *trans*). From Fig. 5 we see that the reversal potential in 2-1 salts is less sensitive to channel residue ionization than it is in KCl, implying that the overall charge felt by permeating ions in the presence of high concentrations of CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> is virtually the same within the pH 4–10 range.

Fig. 5 also compares the results for 1-1 and 2-1 salts with their bulk diffusion potentials calculated using Eq. 1 and shown by the horizontal dashed lines. This comparison clearly demonstrates that in the case of KCl, diffusional effects are not relevant and the electrostatic exclusion dominates the channel cation selectivity. Conversely, both 2-1 salts display anionic selectivities that are comparable but larger than their respective bulk diffusion potentials. This points to a binding of divalent cations to channel residues, which screens and might even overcharge the “initial” negative charge of the channel. Binding divalent cations also interfere with the proton titration of the channel acidic residues, explaining why the reversal potential in 2-1 salts is only weakly sensitive to pH. This conjecture has been supported by the crystallographic structure of OmpF in MgCl<sub>2</sub> presented recently by Cramer and collaborators (33), who found a binding site for magnesium cations located in the narrow constriction of the channel.

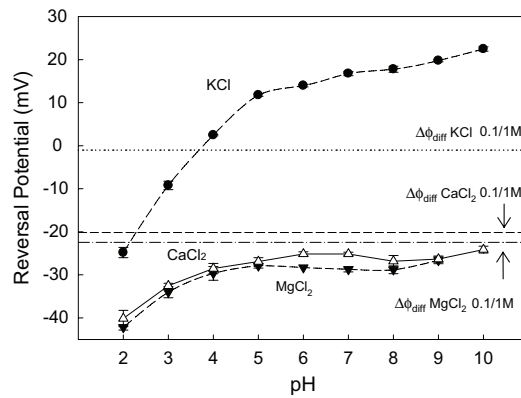


FIGURE 5 Reversal potential measured in salts of monovalent and divalent cations at the inverted (0.1 M *cis* | 1 M *trans*) gradient at different pH. The corresponding bulk diffusion potentials for this gradient are also shown. Over a broad range of pH, the reversal potential in 2-1 salts is only weakly sensitive to channel residue ionization. This contrasts with the known titration behavior of OmpF in monovalent salts where increasing proton concentration beyond pH 4 results in the inversion of both reversal potential and the channel effective charge (11,16,29).

Similar selectivity inversion was also found for high concentrations of other divalent salts with the results shown on the right-hand side of Fig. 6. Again, it is interesting to note that the reversal potential measured in these solutions correlates well with their bulk diffusion potentials calculated using Eq. 1. This indicates that under the conditions studied,

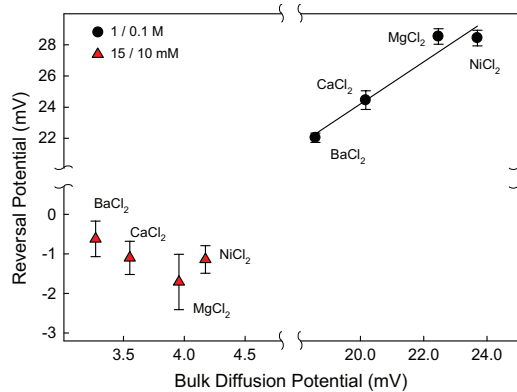


FIGURE 6 (Right) Reversal potential measured in salts of divalent cations at high concentrations (1.0 M *cis* | 0.1 M *trans*) displays correlation between the reversal potential and the corresponding bulk diffusion potentials for the 1.0|0.1 gradient. Although binding properties of these four divalent cations are very different in other systems (neutral lipid bilayers, for instance), here the reversal potential seems to be sensitive only to cation diffusivity. (Left) At small concentrations of divalent cations (15 mM *cis* | 10 mM *trans*), the channel regains its cationic selectivity. Correlation between reversal potential and bulk diffusion potential is lost. Both sets of measurements are performed at pH 6.



all four divalent cations screen the channel negative charges in a very similar way, so that the differences in the reversal potentials are coming from the differences in their mobilities.

Remarkably, at small concentrations of divalent salts, the channel regains its cationic selectivity and the correlation with the diffusion potential is lost (left-hand side of Fig. 6). This is exactly what one would expect for the charge-screening mechanism. Concentrations of divalent cations that are too small do not lead to efficient screening, so that the overall charge of the channel stays at its net-negative value as in the presence of 1-1 salts. This leads to the expected cationic selectivity and probably restores the specificity in the binding of divalent cations.

Fig. 7 A shows the reversal potential at a 10-fold *cis/trans* concentration ratio but different absolute concentrations of KCl (*circles*) and CaCl<sub>2</sub> (*triangles*). In both electrolytes, reversal potential depends not only on the concentration ratio but also on absolute concentration following, apparently, a similar trend. Note, however, that cationic selectivity found for KCl increases as concentration decreases, whereas anionic selectivity found in CaCl<sub>2</sub> follows the opposite behavior. This is more clearly seen in Fig. 7 B, where reversal potential data are presented in terms of permeability ratios. The data for KCl can be easily understood in terms of electrostatic exclusion. As the concentration increases, the screening of channel fixed charges is more effective and selectivity decreases. CaCl<sub>2</sub> data are clearly incompatible with such a mechanism. Increasing concentration produces a gain of anionic selectivity, pointing again to the proposed binding of divalent cations that screen the negative charge of the channel. In such a picture, when concentration decreases, the binding becomes less probable so that in the low concentration limit we find values of reversal potential below the calculated diffusion potential for a concentration ratio  $r = 10$ .

This means that the concentration is not high enough to ensure the binding of divalent cations and the consequent screening of the channel negative charges. This is especially true in the less concentrated compartment, where we can speculate that the channel charge is not completely neutralized and some negative groups are still active. If this is true, a reversal potential below the diffusion potential is expected as exclusion effects appear. This point becomes clearer when the concentration ratio is kept small,  $r = 1.5$ , and both sides can be at a relatively low concentration (Fig. 7, A and B, *inset*). Then, negative values of reversal potential are found, showing that there is no binding, and the channel restores its original cation selectivity. Note that this situation is never realized in Figs. 2 and 5, as the “diluted” side is always kept at 0.1 M. The inset in Fig. 7 B also demonstrates that possible electrokinetic effects (34) are not among the major causes of selectivity inversion. It is seen that decreasing the salt gradient by a factor of 7 does not lead to any qualitative changes in channel selectivity.

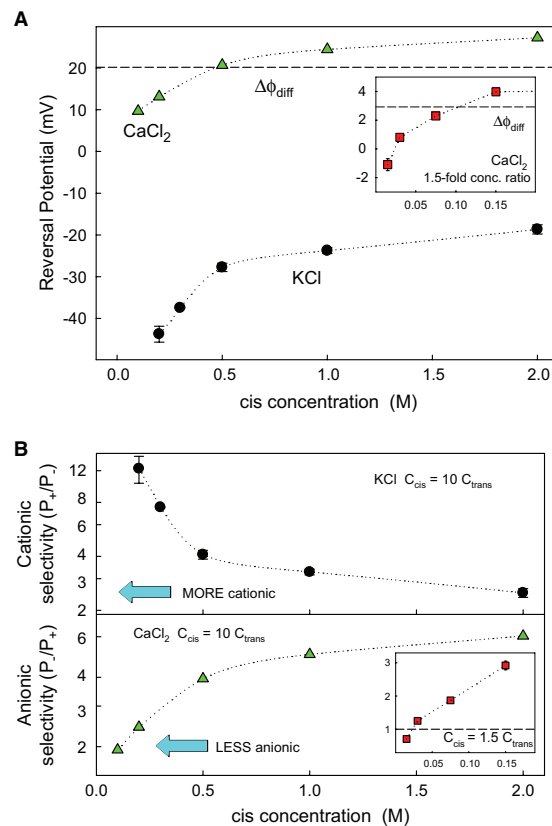


FIGURE 7 (A) Reversal potential measured at a 10-fold *cis/trans* concentration ratio but different absolute concentrations of KCl (*circles*) and CaCl<sub>2</sub> (*triangles*) at pH 6. In KCl the channel shows cationic selectivity that is enhanced at low concentrations. In CaCl<sub>2</sub> the channel does not increase its anionic selectivity at low concentrations but becomes less selective to anions. At low enough CaCl<sub>2</sub> concentrations (see *insets* that show measurements at 1.5-fold *cis/trans* concentration ratio), OmpF seems to recover its “normal” negative fixed charge since the reversal potential is lower in magnitude than the free solution diffusion potential and, for the smallest concentrations, the selectivity gets cationic again. (B) Selectivity of the channel, calculated from data in (A).

The elucidation of the residues that are responsible for the binding of divalent cations and consequent selectivity inversion is not straightforward in light of electrophysiological measurements. Mutagenesis involves conformational changes that further modify the total net charge of the protein. Thus, the rationalization of selectivity experiments with mutants is far from being trivial. Table 1 is a good example of this. Reversal potential measurements in a 10-fold concentration gradient of CaCl<sub>2</sub> (1 M *cis* | 0.1 M *trans*) are presented for WT OmpF and three of its mutants: Two single-site mutants, D113A and E117A, and a double-site mutant, D113C/E117C. The substitution of negatively charged acids of the channel constriction by neutral residues like

**TABLE 1** Measurements of reversal potential at pH 6 in 1 M *cis* | 0.1 M *trans* CaCl<sub>2</sub> using WT and several OmpF mutants

	WT	D113A	E117A	D113C/E117C
RP (mV)	24.5 ± 0.6	33.2 ± 2.2	30.8 ± 1.5	30.1 ± 0.7

alanine and cysteine (where divalent cations do not bind) yields a gain of anionic selectivity. This could be roughly explained by invoking the change in the net charge of the protein produced by mutagenesis: Compared to WT OmpF, the mutants D113A and E117A have an extra positive charge and the D113C/E117C mutant has two extra positive charges. However, in such a scenario, the role of the divalent binding is unclear. A much more detailed study involving up to 34 OmpF mutants in salts of divalent cations reached similar conclusions (31): Charge is not the sole determinant of the ion selectivity of OmpF mutants: Other parameters also contribute to this property. Thus, mutations in this system involve simultaneous changes of too many physical quantities (net charge, spatial distribution of residues, the possibility of binding, the available volume for permeating ions, etc.) to give a quantitative interpretation of measured data.

In this context, a recent publication of W. Cramer's group is highly relevant. A 1.6 Å OmpF structure in 1 M MgCl<sub>2</sub> showed that one Mg<sup>2+</sup> is bound in the selectivity filter between Asp-113 and Glu-117 of loop 3 (33). In light of this study, we decided to investigate, at least qualitatively, the source of observed anionic selectivity of the D113C/E117C mutant, where the specific binding of the divalent cations should be absent. To this end, reversal potential experiments at a 10-fold *cis/trans* concentration ratio but different absolute concentrations of CaCl<sub>2</sub> were performed for both the WT OmpF and D113C/E117C mutant (data shown in Table 2).

The anionic selectivity found for the D113C/E117C mutant increases as concentration decreases, whereas the anionic selectivity of WT OmpF follows the opposite behavior, as shown in Fig. 7, A and B. As may be expected after the analysis of the 1.6 Å OmpF structure, this indicates that Ca<sup>2+</sup>-specific binding is not present in the case of the D113C/E117C mutant, since the increase of CaCl<sub>2</sub> concentration leads to a loss of anionic selectivity. Then the source of anionic selectivity in the D113C/E117C mutant may be the excess of positive charge in the channel constriction after the neutralization of both Asp-113 and Glu-117 acids. Con-

**TABLE 2** Reversal potential (mV) measured at pH 6 and 10-fold *cis/trans* concentration ratio but different absolute concentrations of CaCl<sub>2</sub> using WT and the double OmpF mutant D113C/E117C

<i>cis/trans</i> concentration (M)	WT	D113C/E117C
0.2/0.02	13.1 ± 1.5	37.9 ± 2.2
0.5/0.05	20.7 ± 0.9	30.7 ± 2.2
1.0/0.1	24.5 ± 0.6	30.1 ± 0.7
2.0/0.2	27.3 ± 1.2	25.1 ± 0.5

sequently, the trend found for the D113C/E117C mutant qualitatively resembles the trend found for WT OmpF in KCl, which easily rationalizes invoking electrostatic screening. As concentration increases, the screening of channel fixed charges is more effective and selectivity decreases.

Interestingly, Fig. 7 also demonstrates that steric (or entropic) effects are not dominant in selectivity inversion. Indeed, one of the possible alternative explanations of anionic selectivity of OmpF in CaCl<sub>2</sub> may be preferential exclusion of cation simply because the size of the Ca<sup>2+</sup>-hydrated ion is larger than that of Cl<sup>-</sup>. For KCl, diluting the salt only increases channel cationic selectivity. For CaCl<sub>2</sub>, the channel anionic selectivity is decreased as the concentration is lowered. Furthermore, at very low salt concentration, the channel becomes cation selective. As noted before, it is natural to expect this result within the proposed binding of divalent cations: Less CaCl<sub>2</sub> means less Ca<sup>2+</sup> binding, smaller screening, and, therefore, lower anionic selectivity.

With steric exclusion stemming from the larger ion size of Ca<sup>2+</sup>, one would expect an opposite behavior. Indeed, if anionic selectivity was due not to electrostatic—as we hypothesized above—but to steric exclusion, then the selectivity should be more pronounced at smaller salt concentrations. This is clear from the following argument. Let us calculate the electrical energy of a concentration fluctuation as a function of its size assuming that cations and anions confined by a cube with sides *l* behave as independent particles with switched-off Coulombic interactions. Then the expected root mean-square fluctuation of the particle number is simply  $(nl^3)^{1/2}$ , where *n* is particle concentration. The resulting potential can be roughly estimated as  $\varphi \sim e(nl^3)^{1/2}/\epsilon l$ , where  $\epsilon$  is the dielectric constant of the medium. Therefore, the energy of such fluctuation is  $E \sim \varphi e(nl^3)^{1/2} \sim e^2 n l^2 / \epsilon$ . The characteristic energy *E* is proportional to the square of the linear dimension and is commensurable with *k<sub>B</sub>T* at room temperature for dimensions close to the Debye screening length. This simple estimate demonstrates that on length scales larger than the screening length, any deviations in cationic concentration and anionic concentrations should be strongly correlated by obeying the electroneutrality principle. Therefore, because the Debye screening length increases with the decreasing salt concentration, the compensation of steric exclusion of Ca<sup>2+</sup> ions by the forces maintaining electroneutrality should be smaller. This would lead to higher anionic selectivity at smaller CaCl<sub>2</sub> concentration.

From Figs. 3 and 5, it follows that anionic selectivity of the OmpF channel in the presence of high concentrations of calcium and magnesium chlorides exceeds the selectivity expected from the difference in bulk solution diffusion coefficients for the cations and anion. One of the possible interpretations of this observation would be that divalent ions actually overscreen the negative charge of the channel introducing charge inversion. As evidenced by a recent stream of publications in the leading physics journals (e.g., (35–44)), inversion of the charge of charged surfaces by multivalent

counterions is quite a general phenomenon attracting the attention of many researchers from different fields. Among the objects studied are nanochannels (37,43,45), amine-terminated silicon dioxide surfaces (36), anionic monolayers (42), DNA coils (46), actin filaments (47), protein complexes (41), asymmetric lipid bilayers (48), and charged colloidal particles (39). Charge inversion has been observed by studying electrokinetic phenomena (electrophoresis or streaming current), colloid stability, phase separation, or resonant x-ray scattering, or by measuring the attraction force between like-charged surfaces.

Several origins are proposed for the charge inversion in electrolyte solutions (40). Apart from the specific interaction between divalent cations and particular surfaces, alternative theories considering counterion correlations are available (35,44). However, the applicability of such physical theories of charge inversion near charged interfaces in electrolytic solutions to the findings reported here is problematic for several reasons. First, the interface in the case of the OmpF channel is an amphoteric surface, with a discrete, highly inhomogeneous distribution of positive and negative charges. Second, and most important, the effective surface charge density in the pore is only  $\sim 0.1 \text{ e/nm}^2$  (29). This low charge density poses an immediate problem for the explanation based on a two-dimensional strongly correlated liquid of counterions (35,49) because the inverse dimensionless temperature of such a liquid for the divalent counterions can be estimated as 1.1.

## CONCLUSIONS

Though most of the experimental conditions of this study diverge significantly from typical physiological conditions, investigations of ion channels in the wide range of salt concentrations and large gradients and in the presence of diverse electrolytes advance our understanding of the physics of ion transport. The obtained results show that several physico-chemical phenomena are crucially involved in the mechanism of ion selectivity of large channels. An immediate consequence is that the interpretation of the measured reversal potential—the most popular parameter used to evaluate selectivity—in the framework of models that are too simplistic can lead to a distorted picture. We can also conclude that the selectivity mechanisms of the mesoscopic systems, which in this study are represented by the OmpF channel, are qualitatively different from those of the highly selective channels of neurophysiology (1).

We summarize our main findings as follows:

1. Contrary to the cationic selectivity for the monovalent salts at neutral pH, the OmpF channel at high concentrations of salts of divalent cations exhibits an anionic selectivity. Specifically, the sign of reversal potential for chloride salts of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  is opposite to that found for monovalent salts.
2. Two major factors contribute to the selectivity inversion in this large channel in salts of divalent cations: 1), the binding of permeant ions to the channel, which compensates, or slightly overcompensates, for the negative charge of the OmpF molecule and 2), the anionic selectivity coming from the differences in ion mobilities.
3. Other possible factors such as steric depletion of ions, occurring when their size is comparable to the size of the pore, channel-specific changes in hydrodynamic hindrance for cations and anions, and electrokinetic effects induced by the salt gradient appear to play only a minor role in the studied cases.
4. At sufficiently small concentrations of chloride salts of divalent cations, the channel regains its “original” cationic selectivity.
5. Selectivity measurements in the D113/E117C OmpF mutant are consistent with the existence of a binding site for divalent cations at the channel constriction, as recently evidenced by the high resolution OmpF crystal structure in  $\text{MgCl}_2$  solution.

## APPENDIX: CORRECTION OF THE MEASURED ZERO CURRENT POTENTIAL BY LIQUID JUNCTION POTENTIALS

Though the LJP corrections are routinely used in modern electrophysiology, they are ignored often enough to deserve a revision of the current situation in this short Appendix. Electrophysiological measurements are mostly done with reversible Ag/AgCl electrodes, which in many cases are immersed in salt bridges of a certain concentration. When measuring electric potential differences between two solutions of different concentration (as is the case of reversal potential), one cannot ignore that each bridge is in contact with a different solution. The potential difference generated across each bridge/solution interface, known as LJP, is different, so that the total contribution of both LJP to the total measured potential is different from zero. Seminal studies by Barry and Neher (24,26) indicate that LJP is small ( $\sim 1 \text{ mV}$ ) in the reversal potential experiments done with KCl involving KCl bridges. That is why these corrections are usually bypassed when measurements are performed at physiological conditions (moderate gradients of KCl solutions at decimolar concentrations buffered at neutral pH, occasionally also containing salts of divalent cations in micromolar or millimolar concentrations). However, in experiments with other salts (NaCl, LiCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , etc.) LJP contribution becomes significant and may be comparable to the actual reversal potential. The situation is aggravated when electrode salt bridges are diluted, sometimes to prevent contamination of the measuring solutions. LJP can then be several times larger than the actual RP. This fact has long been noted (23) but repeatedly ignored, thus leading to some inconsistencies in the selectivity data.

Direct measurements of LJP are difficult (23,26), so that, to determine the actual reversal potential, it is necessary to rely on LJP theoretical estimates. LJP between two solutions—left (L) and right (R)—is defined as

$$\text{LJP} \equiv \phi_L - \phi_R = -\frac{k_B T}{e} \sum_i \int_R^L \frac{t_i}{z_i} d \ln a_i, \quad (\text{A1})$$

where  $t_i$ ,  $z_i$ , and  $a_i$  denote the transport number (or fractional conductance), valence, and activity of the  $i$ th ion, correspondingly. The above definition is not very practical and has been replaced by an approximation due to Henderson (50,51), which makes LJP computation straightforward. Henderson



**TABLE 3** Measurements of reversal potential in OmpF channel using Ag/AgCl electrodes with different KCl concentrations in salt bridges

	KCl salt concentration in bridges (M)	$V_{0\text{Exp}}$ (mV)	$\text{LJP}^{\text{cis}}$ (mV)	$\text{LJP}^{\text{trans}}$ (mV)	LJP (mV)	RP (mV)
3.0/0.1 M KCl	2.0	$-26.9 \pm 2.3$	-0.18	-1.34	-1.52	$-25.4 \pm 2.3$
	0.1	$-26.5 \pm 2.1$	-1.52	0	-1.52	$-25.0 \pm 2.1$
	0.01	$-26.0 \pm 1.6$	-2.55	1.03	-1.52	$-24.5 \pm 1.6$
3.0/0.1 M NaCl	2.0	$-22.6 \pm 0.7$	-5.56	-0.74	-6.30	$-16.3 \pm 0.7$
	0.1	$-28.7 \pm 0.5$	-17.82	4.39	-13.43	$-15.3 \pm 0.5$
	0.01	$-32.2 \pm 0.9$	-29.52	12.73	-16.79	$-15.4 \pm 0.9$
2.0/0.1 M NaCl	2.0	$-22.1 \pm 0.4$	-4.39	-0.74	-5.13	$-17.0 \pm 0.4$
	0.1	$-27.0 \pm 0.1$	-15.88	4.39	-11.50	$-15.5 \pm 0.1$
	0.01	$-30.8 \pm 0.3$	-27.41	12.73	-14.68	$-16.1 \pm 0.3$
1.0/0.1 M NaCl	2.0	$-23.7 \pm 0.2$	-2.68	-0.74	-3.42	$-20.3 \pm 0.2$
	0.1	$-28.1 \pm 0.4$	-12.73	4.39	-8.34	$-19.8 \pm 0.4$
	0.01	$-31.1 \pm 0.8$	-23.83	12.73	-11.10	$-20.0 \pm 0.8$
2.0/0.1 M $\text{CaCl}_2$	2.0	$21.4 \pm 0.8$	-11.29	0.91	-10.38	$31.8 \pm 0.8$
	0.1	$8.0 \pm 0.4$	-32.31	11.29	-21.01	$29.0 \pm 0.4$
	0.01	$4.6 \pm 1.5$	-51.78	26.79	-24.99	$29.6 \pm 1.5$
2.0/0.1 M $\text{MgCl}_2$	2.0	$21.8 \pm 1.0$	-12.35	1.06	-11.28	$33.1 \pm 1.0$
	0.1	$12.3 \pm 0.7$	-35.58	12.35	-23.24	$35.5 \pm 0.7$
	0.01	$7.0 \pm 0.2$	-57.24	29.46	-27.78	$34.8 \pm 0.2$

$V_{0\text{Exp}}$  is the potential  $V_{\text{Exp}}$  corresponding to zero current through the circuit shown in Fig. 1 A. Liquid junction potential  $\text{LJP}^{\text{cis}}$  is a potential between the agarose bridge of the *cis* electrode and the solution in *cis* compartment.  $\text{LJP}^{\text{trans}}$  is defined as a potential between the solution in the *trans* compartment and the agarose bridge of the *trans* electrode, so that it should be added to its *cis* counterpart to obtain the total correction. The total correction then should be subtracted from  $V_{0\text{Exp}}$  to calculate the reversal potential.

simplified the problem in two ways. First, he treated the electrolyte solutions as ideal (i.e., constant mobilities are assigned and activities are replaced by concentrations). Second, he assumed that the junction may be represented by a continuous series of mixtures of the two end solutions (i.e., linear ion concentration profiles). Thus, Eq. A1 reduces to

$$\text{LJP} = -\left(\frac{k_{\text{B}}T}{e}\right) \frac{\sum_i z_i D_i [C_{i,\text{L}} - C_{i,\text{R}}]}{\sum_i z_i^2 D_i [C_{i,\text{L}} - C_{i,\text{R}}]} \ln \frac{\sum_i z_i^2 D_i C_{i,\text{L}}}{\sum_i z_i^2 D_i C_{i,\text{R}}} \quad (\text{A2})$$

Most authors resort to the calculation of LJP using Henderson's equation. As for the assumption of linear concentration profiles, it has been shown recently that calculation of LJP from numerical solutions of Nernst-Planck and Poisson equations yields identical results as Henderson's equation in the vast majority of cases of interest (52). However, when solutions cannot be regarded as ideal or the ionic strength of the two solutions in contact is very different, Henderson's equation becomes a poor approximation, and then LJP calculations demand a proper estimation of ionic activity coefficients and ion mobilities as a function of concentration (53,54).

An indirect way of checking the validity of the LJP calculation from Henderson's equation is to measure the reversal potential of a channel in a given pair of solutions but using a different salt bridge concentration in each series of experiments. If the LJP estimation is good, the channel reversal potential, once corrected, should be the same irrespective of the salt

concentration in the bridge. Table 3 shows the zero current potential measured in OmpF in different salt solutions. *Cis* and *trans* bridges contained equal KCl concentrations varying from 2 M to 0.01 M. One can see that LJP contribution may be significant, particularly when salts of divalent cations are used, and it changes with the KCl bridge concentration. However, in all cases the actual reversal potential is the same within experimental error no matter what salt bridge concentration is used.

Interestingly, when the same species of electrolyte is used in the solutions and in the electrode salt bridge and the salt concentrations in the *trans* and *cis* bridges are equal, according to Henderson's equation, the total LJP should be the same irrespective of the salt concentration in the bridge. A simple inspection of Eq. A2 applied to each interface shows that if the ratios of the anion/cation diffusivities are the same in the solutions and in the bridges, the salt concentrations in both bridges enter only as their ratio:

$$\begin{aligned} \text{LJP} &= \text{LJP}_{\text{cis}} + \text{LJP}_{\text{trans}} \\ &= \left(\frac{k_{\text{B}}T}{e}\right) \frac{D_- - D_+}{z_+ D_+ - z_- D_-} \ln \frac{C_{\text{trans}} C_{\text{cis}}^{\text{bridge}}}{C_{\text{cis}} C_{\text{trans}}^{\text{bridge}}} \end{aligned} \quad (\text{A3})$$

Data in Table 3 for 3.0/0.1 M KCl solutions and Table 4 for 3.0/0.1 M NaCl solutions are compatible with this statement. This result is perhaps the origin of most mistakes concerning LJP corrections to the measured reversal potential. Following the pioneer studies (24,26) performed under physiological conditions and with KCl bridges, the protocol is sometimes erroneously

**TABLE 4** Measurements of reversal potential in the OmpF channel using Ag/AgCl electrodes with different NaCl concentrations in salt bridges

	NaCl salt concentration in bridges (M)	$V_{0\text{Exp}}$ (mV)	$\text{LJP}^{\text{cis}}$ (mV)	$\text{LJP}^{\text{trans}}$ (mV)	LJP (mV)	RP (mV)
3.0/0.1 M NaCl	2.0	$-32.5 \pm 1.0$	-2.16	-15.93	-18.08	$-14.4 \pm 1.0$
	0.1	$-33.4 \pm 1.5$	-18.08	0	-18.08	$-15.3 \pm 1.5$
	0.01	$-32.8 \pm 1.4$	-30.33	12.24	-18.08	$-14.7 \pm 1.4$

extended to altogether different conditions. Data in Table 4 also show that in different pairs of NaCl solutions and NaCl bridges, the LJP is not dependent on the salt bridge concentration. In this case, the LJP correction is much bigger than for KCl. Finally, one can compare the corrected RP for 3.0/0.1 M NaCl solutions when using KCl bridges (rows 4–6 in Table 3) and using NaCl bridges (Table 4). The agreement shows that for the salt gradients explored here, Henderson's equation is a good approximation for estimating LJP contribution.

The authors are grateful to Adrian Parsegian for fruitful discussions and reading parts of the manuscript.

We acknowledge support from the Spanish Ministry of Education (project FIS2007-60205). This study was also supported by the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development.

## REFERENCES

- Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Eisenberg, B. 2003. Proteins, channels and crowded ions. *Biophys. Chem.* 100:507–517.
- Benz, R., K. Janko, K. Boos, and P. Lauger. 1978. Formation of large, ion-permeable membrane channels by matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 551:238–247.
- Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, et al. 1992. Crystal-structures explain functional-properties of 2 *Escherichia coli* porins. *Nature.* 358:727–733.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593–656.
- Krasilnikov, O. V., V. I. Ternovsky, and B. A. Tashmukhamedov. 1981. Properties of ion channels induced by  $\alpha$ -staphylo toxin in bilayer lipid membranes. *Biofizika.* 26:271–275.
- Song, L. Z., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, et al. 1996. Structure of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science.* 274:1859–1866.
- Blaustein, R. O., T. M. Koehler, R. J. Collier, and A. Finkelstein. 1989. Anthrax toxin—channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2209–2213.
- Finkelstein, A. 1994. The channel formed in planar lipid bilayers by the protective antigen component of anthrax toxin. *Toxicology.* 87:29–41.
- Colombini, M. 2004. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* 256:107–115.
- Alcaraz, A., E. M. Nestorovich, M. Aguilera-Arzo, V. M. Aguilera, and S. M. Bezrukov. 2004. Salting out the ionic selectivity of a wide channel: the asymmetry of OmpF. *Biophys. J.* 87:943–957.
- Gillespie, D., and R. S. Eisenberg. 2002. Physical descriptions of experimental selectivity measurements in ion channels. *Eur. Biophys. J.* 31:454–466.
- Barry, P. H. 2006. The reliability of relative anion-cation permeabilities deduced from reversal (dilution) potential measurements in ion channel studies. *Cell Biochem. Biophys.* 46:143–154.
- Benz, R., K. Janko, and P. Lauger. 1979. Ion selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 551:238–247.
- Benz, R., A. Schmid, and R. E. Hancock. 1985. Ion selectivity of Gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.* 162:722–727.
- Nestorovich, E. M., T. K. Rostovtseva, and S. M. Bezrukov. 2003. Residue ionization and ion transport through OmpF channels. *Biophys. J.* 85:3718–3729.
- Cervera, J., A. G. Komarov, and V. M. Aguilera. 2008. Rectification properties and pH-dependent selectivity of *Meningococcal* class I (PorA) porin. *Biophys. J.* 94:1194–1202.
- Delcour, A. H. 2003. Solute uptake through general porins. *Front. Biosci.* 8:d1055–d1071.
- Cowan, S. W., R. M. Garavito, J. N. Janssonius, J. A. Jenkins, R. Karlsson, et al. 1995. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure.* 3:1041–1050.
- Phale, P. S., A. Philippsen, C. Widmer, V. P. Phale, J. P. Rosenbusch, et al. 2001. Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry.* 40:6319–6325.
- Bezrukov, S. M., and I. Vodyanoy. 1993. Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states. *Biophys. J.* 64:16–25.
- Montal, M., and P. Mueller. 1972. Formation of biomolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:3561–3566.
- Barry, P. H., and J. W. Lynch. 1991. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Membr. Biol.* 121:101–117.
- Neher, E. 1992. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol.* 207:123–131.
- Finkelstein, A., and A. Mauro. 1976. Physical principles of electrical excitability. In *Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System, Vol. 1.* American Physiological Society, Bethesda, MD. 161–213.
- Barry, P. H., and J. M. Diamond. 1970. Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties of membranes. *J. Membr. Biol.* 3:93–122.
- Danelon, C., A. Suenaga, M. Winterhalter, and I. Yamato. 2003. Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation. *Biophys. Chem.* 104:591–603.
- Miedema, H., A. Meter-Arkema, J. Wierenga, J. Tang, B. Eisenberg, et al. 2004. Permeation properties of an engineered bacterial OmpF porin containing the EEEE-locus of  $Ca^{2+}$  channels. *Biophys. J.* 87:3137–3147.
- Aguilera-Arzo, M., J. J. García-Celma, J. Cervera, A. Alcaraz, and V. M. Aguilera. 2007. Electrostatic properties and macroscopic electrodiffusion in OmpF porin and mutants. *Bioelectrochemistry.* 70:320–327.
- Saint, N., K.-L. Lou, C. Widmer, M. Luckey, T. Schirmer, et al. 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. *J. Biol. Chem.* 271:20676–20680.
- Vrouenraets, M., J. Wierenga, W. Meijberg, and H. Miedema. 2006. Chemical modification of the bacterial porin OmpF: gain of selectivity by volume reduction. *Biophys. J.* 90:1202–1211.
- Kullman, L., P. A. Gurnev, M. Winterhalter, and S. M. Bezrukov. 2006. Functional sub-conformations in protein folding: evidence from single-channel experiments. *Phys. Rev. Lett.* 96:038101,1–4.
- Yamashita, E., M. V. Zhalnina, S. D. Zakharov, O. Sharma, and W. A. Cramer. 2008. Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *EMBO J.* 27:2171–2180.
- Rosenberg, P. A., and A. Finkelstein. 1978. Interaction of ions and water in gramicidin A channels. Streaming potentials across lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 72:327–340.
- Grosberg, A. Yu., T. T. Nguyen, and B. I. Shklovskii. 2002. The physics of charge inversion in chemical and biological systems. *Rev. Mod. Phys.* 74:329–345.
- Besteman, K., M. A. G. Zevenbergen, H. A. Heering, and S. G. Lemay. 2004. Direct observation of charge inversion by multivalent ions as a universal electrostatic phenomenon. *Phys. Rev. Lett.* 93:170802, 1–4.
- Qiao, R., and N. R. Aluru. 2004. Charge inversion and flow reversal in a nanochannel electro-osmotic flow. *Phys. Rev. Lett.* 92:198301, 1–4.
- Boroudjerdi, H., Y.-W. Kim, A. Naji, R. R. Netz, X. Schlagberger, et al. 2005. Statics and dynamics of strongly charged soft matter. *Phys. Rep.* 416:129–199.
- Quesada-Pérez, M., E. González-Tovar, A. Martín-Molina, M. Lozada-Cassou, and R. Hidalgo-Álvarez. 2005. Ion size correlations and charge

- reversal in real colloids. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspect.* 267:24–30.
40. Lyklema, J. 2006. Overcharging, charge reversal: chemistry or physics? *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspect.* 291:3–12.
41. Raspaud, E., J. Pelta, M. de Frutos, and F. Livolant. 2006. Solubility and charge inversion of complexes of DNA and basic proteins. *Phys. Rev. Lett.* 97:068103, 1–4.
42. Pittler, J., W. Bu, D. Vaknin, A. Travasset, D. J. McGillivray, et al. 2006. Charge inversion at minute electrolyte concentrations. *Phys. Rev. Lett.* 97:046102, 1–4.
43. van der Heyden, F. H. J., D. Stein, K. Besteman, S. G. Lemay, and C. Dekker. 2006. Charge inversion at high ionic strength studied by streaming currents. *Phys. Rev. Lett.* 96:224502, 1–4.
44. Faraudo, J., and A. Travasset. 2007. The many origins of charge inversion in electrolyte solutions: effects of discrete interfacial charges. *J. Phys. Chem. C.* 111:987–994.
45. Siwy, Z. S., M. R. Powell, E. Kalman, R. D. Astumian, and R. S. Eisenberg. 2006. Negative incremental resistance induced by calcium in asymmetric nanopores. *Nano Lett.* 6:473–477.
46. Bloomfield, V. A. 1998. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers/Nucleic Acids Sci.* 44:269–282.
47. Angelini, T. E., H. Liang, W. Wriggers, and G. C. L. Wong. 2003. Like-charge attraction between polyelectrolytes induced by counterion charge density waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:8634–8637.
48. Taheri-Araghi, S., and B.-Y. Ha. 2005. Charge renormalization and inversion of a highly charged lipid bilayer: effects of dielectric discontinuities and charge correlations. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 72:1–10.
49. Shklovskii, B. I. 1999. Screening of a macroion by multivalent ions: correlation-induced inversion of charge. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics.* 60:5802–5811.
50. MacInnes, D. A. 1961. *The Principles of Electrochemistry.* Dover, New York.
51. Perram, J. W., and P. J. Stiles. 2006. On the nature of liquid junction and membrane potentials. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8:4200–4213.
52. Sokalski, T., P. Lingenfelter, and A. Lewenstam. 2003. Numerical solution of the coupled Nernst-Planck and Poisson equations for liquid junction and ion selective membrane potentials. *J. Phys. Chem. B.* 107:2443–2452.
53. Harper, H. W. 1985. Calculation of liquid junction potentials. *J. Phys. Chem.* 89:1659–1664.
54. Borge, G., L. A. Fernández, and J. M. Madariaga. 1997. On the liquid junction potential for the determination of equilibrium constants by means of the potentiometric technique without constant ionic strength. *J. Electroanal. Chem.* 440:183–192.