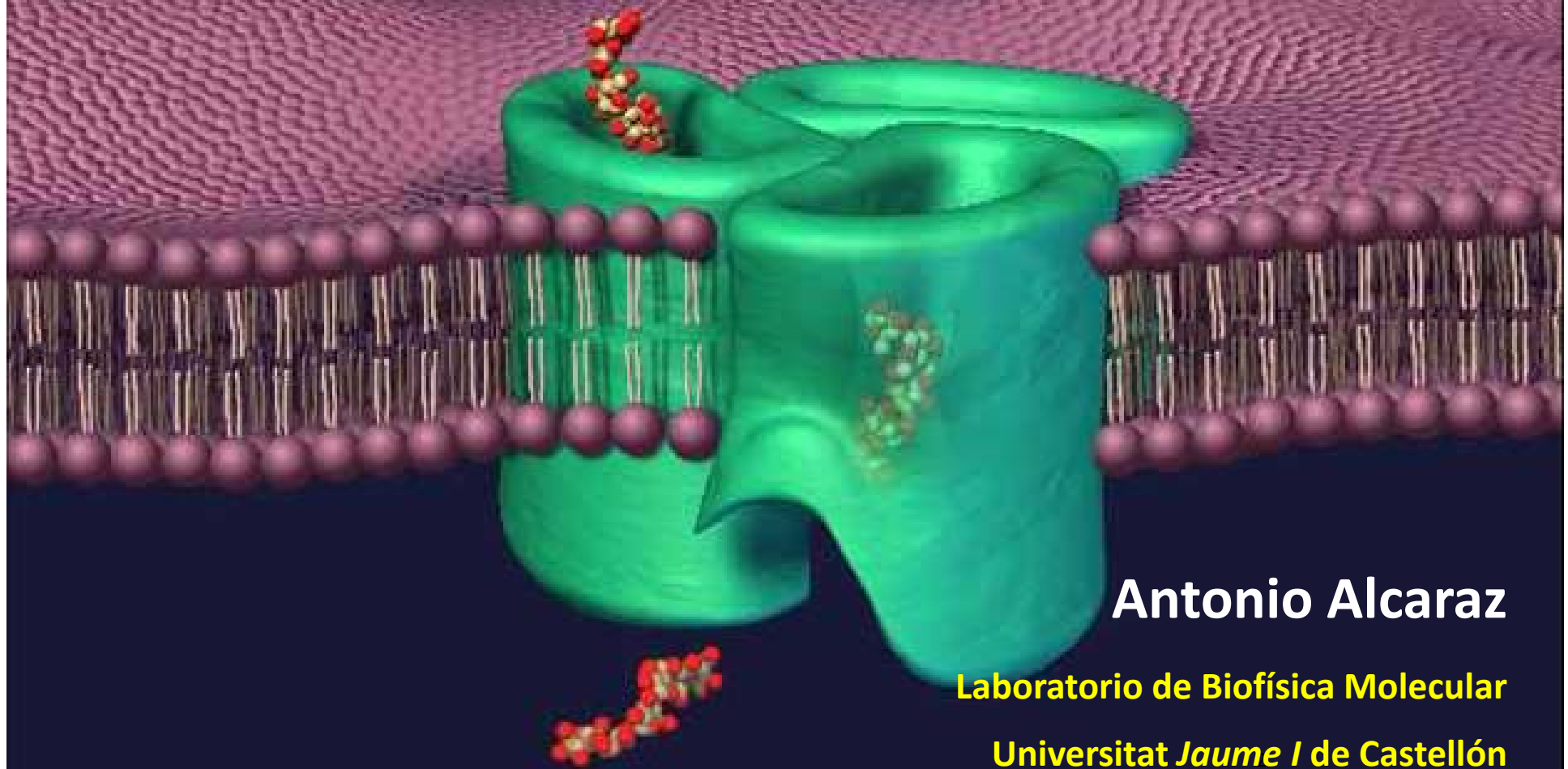


Biofísica de canales iónicos

Los sensores de la vida



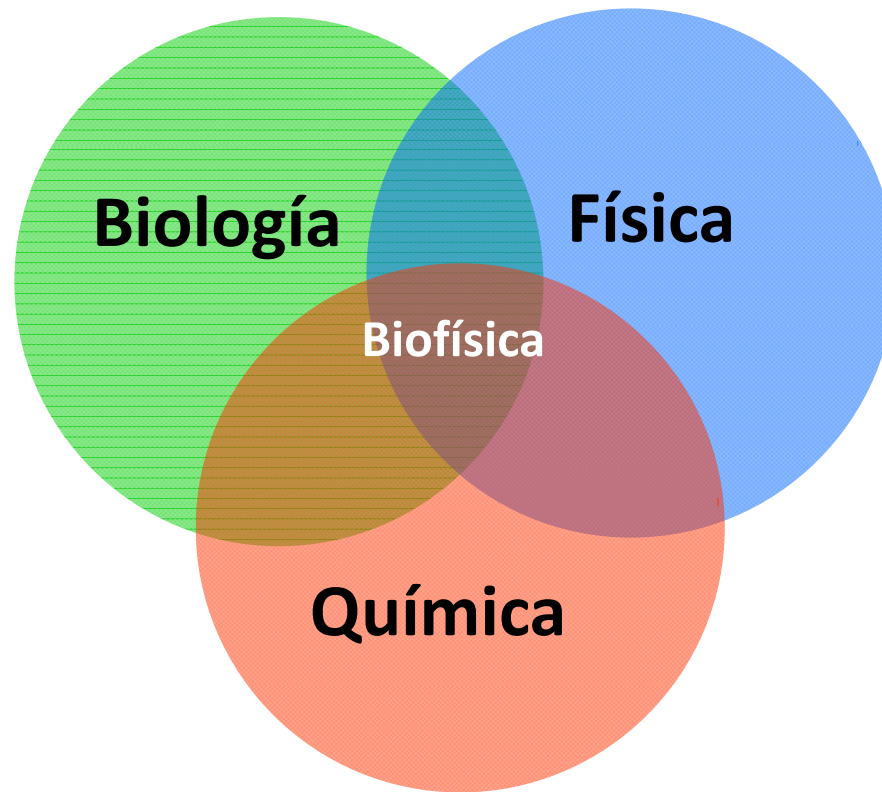
Antonio Alcaraz

Laboratorio de Biofísica Molecular

Universitat Jaume I de Castellón

Canales iónicos como Biosensores

- **Introducción a la Biofísica**
- **Canales iónicos: Qué son y cómo se estudian**
- **Caracterización de canales iónicos anchos: el poro bacterial OmpF**
- **Canales iónicos como Biosensores**

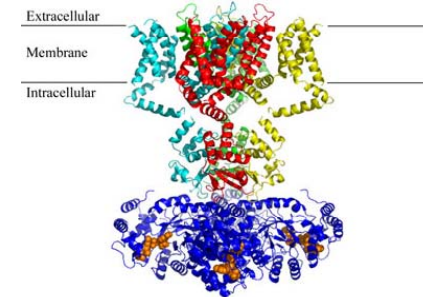
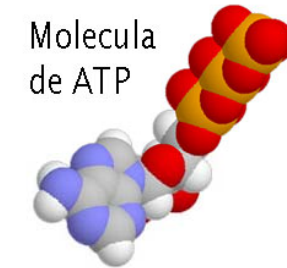


**Estructura
molecular** ↔ **Función
fisiológica**

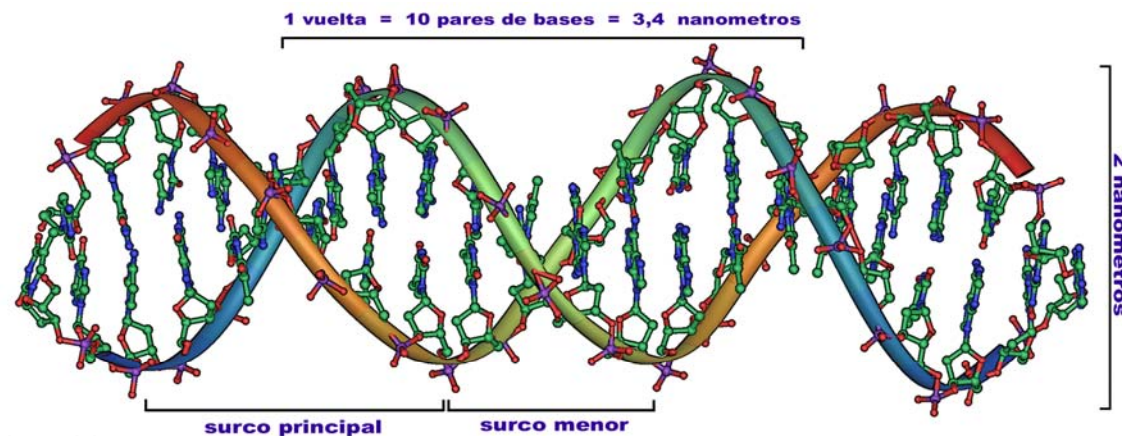
- Intenta entender sistemas biomoleculares y **explicar la función biológica en términos de estructura molecular**, organización estructural, y comportamiento dinámico en los **diversos niveles de complejidad**

Biofísica: Diversidad y complejidad

- iones ($\sim 0.1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$)
- pequeños ácidos grasos y azúcares ($\sim 1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)
- Macromoléculas: proteínas, polisacaridos, etc (5-10 nm)
- almidones ($> 1000 \text{ nm}$)

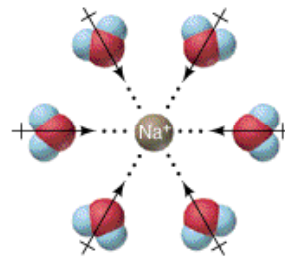
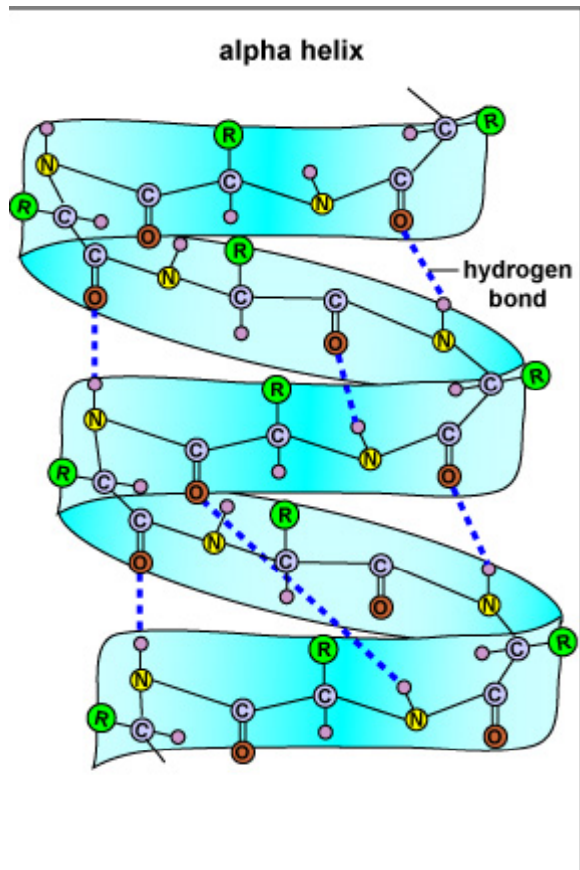


- **moléculas de ADN:** más de 10.000.000 nm = 1 cm de largo, pero sólo 2 nm de ancho

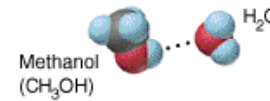


Watson, JD and Crick, FHC
Molecular Structure of Nucleic Acids
Nature, April 25, 1953

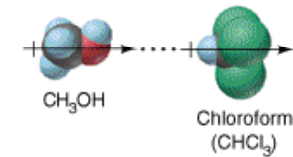
Biofísica: Diversidad y complejidad



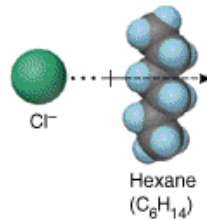
Ion-dipole



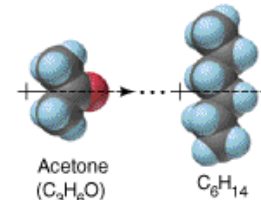
H bond



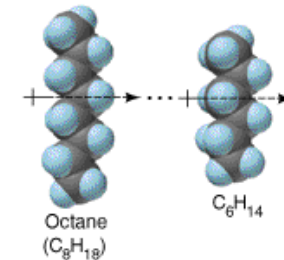
Dipole-dipole



Ion-induced dipole

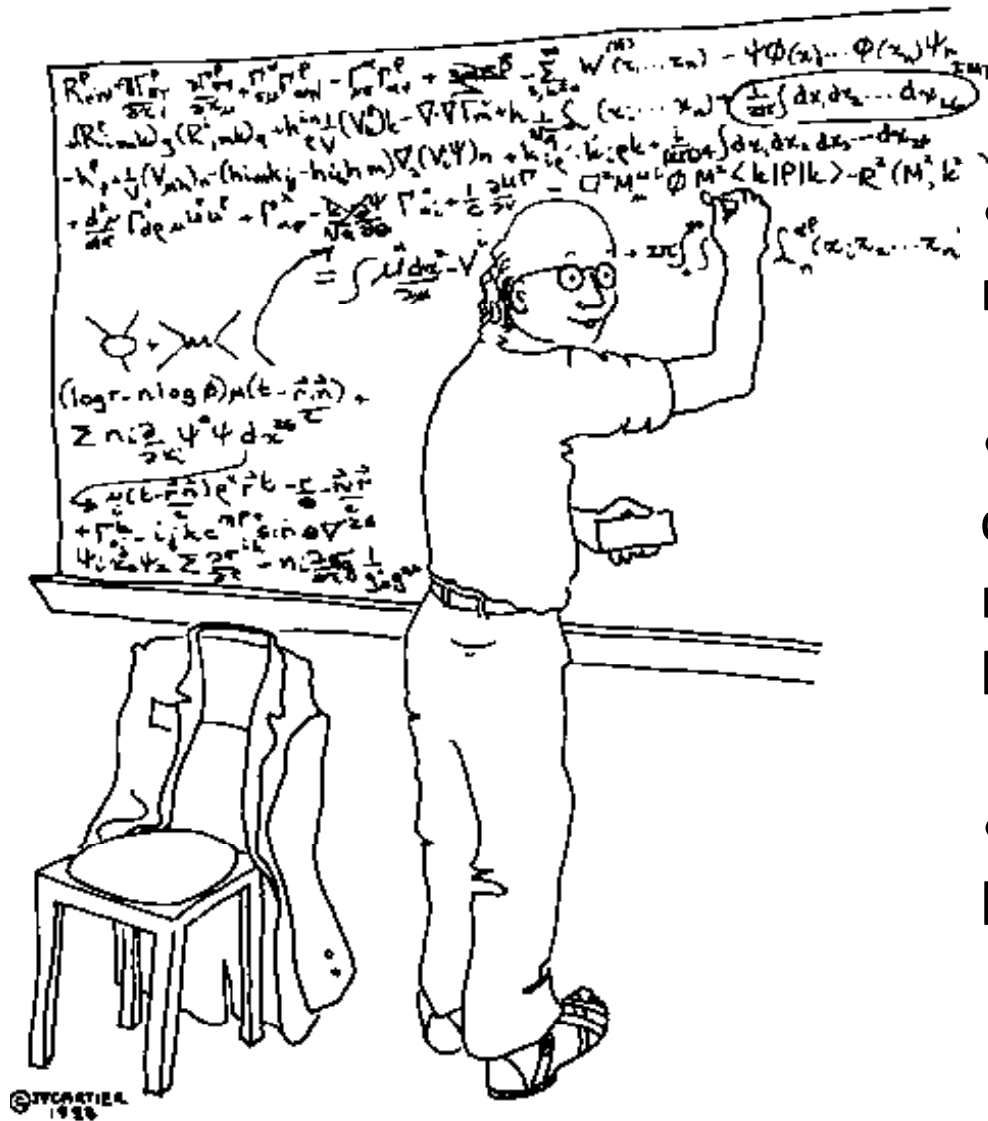


Dipole-induced dipole



Dispersion

Gran número de sistemas con un **comportamiento dinámico**

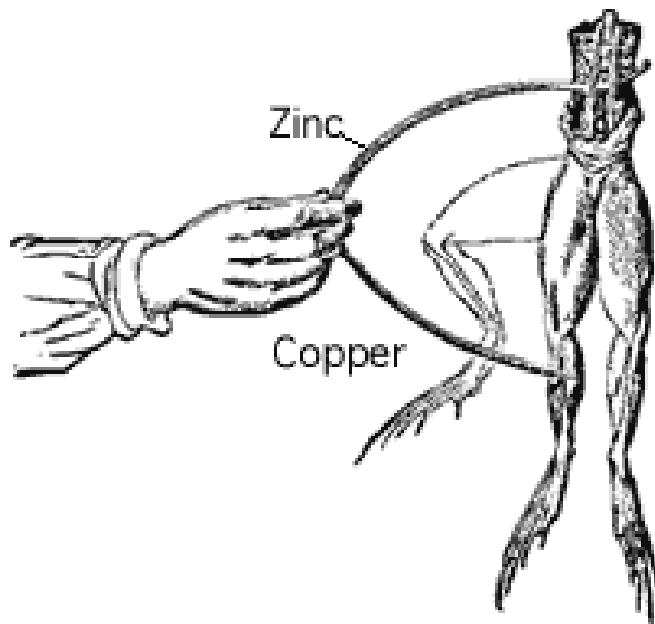


- ¿Son la física y la biología mundos tan separados?
- ¿Qué podemos medir, calcular, modelizar o representar que sea útil a los biólogos o médicos?
- ¿Qué tipo de preguntas se hace la biofísica?

"At this point we notice that this equation is beautifully simplified if we assume that space-time has 92 dimensions."

Electrofisiología: Un nexo entre Física y Biología

Experimento de Galvani



Pila de Volta

Física	Medicina
Estática. Elasticidad y resistencia de materiales	Ortopedia
Dinámica	Movimiento del corazón
Dinámica de fluidos	Presión sanguínea, sistema vascular
Tensión superficial	Acción capilar
Sonido y acústica	Estetoscopio, ultrasonidos, microscopio acústico
Electricidad	Bioelectricidad, transporte de iones en membranas
Magnetismo	Resonancia magnética
Luz y óptica	Microscopía con luz, terapia con laser, fibra óptica
Calor y Termodinámica	Balance y transferencia de calor
Teoría cinética y Mecánica Estadística	Movimiento Browniano, ósmosis, difusión de gases

Física	Medicina
Física Atómica y Espectroscopía	"Chemical shift" in NMR imaging, lasers
Física Molecular	Microscopía electrónica, estructura proteínas
Rayos UV e IR	Dermatología, Tratamiento de la piel
Rayos X	Radiología, tomografía
Mecánica Cuántica	Microscopio de difracción de electrones
Relatividad	Visualización por Radiación Sincrotrón
Cristalografía	Estructura de proteínas
Física del Estado Sólido y semiconductores	Bioinformática, gammagrafía
Física Nuclear	Radioisótopos, medicina nuclear, radioterapia
Radioactividad	Tomografía por emisión de positrones (PET)
Partículas elementales	Terapia con Piones
Aceleradores, ciclotrones, etc.	Tumores, enfermedad de Hodgkin
Astronomía y Astrofísica	Helio, tratamiento de asma (obsoleto)

FÍSICA, BIOLOGÍA Y MEDICINA

¿Sólo aplicaciones ? ¿Y las explicaciones?



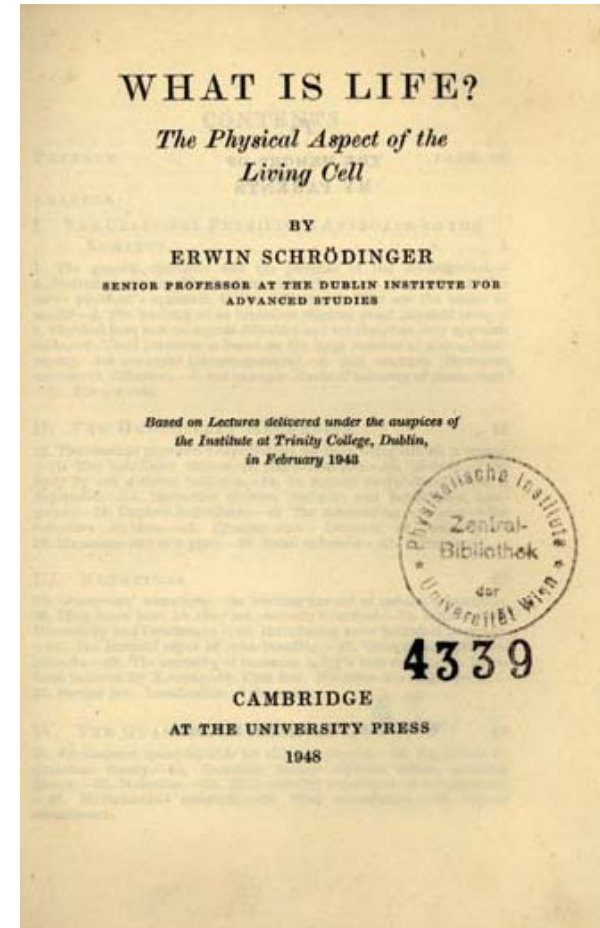
Hermann
von Helmholtz
(1821-1894)

Vitalismo



Biofísica

W. Nernst, M. Planck, A.V. Hill, B. Katz,
D. Goldman, A. L. Hodgkin, A. F. Huxley
E. Neher, B. Sackman, F. Crick,
J. D. Watson, R. Feynman, etc.



Físicos de primer nivel se han interesado por la Biología

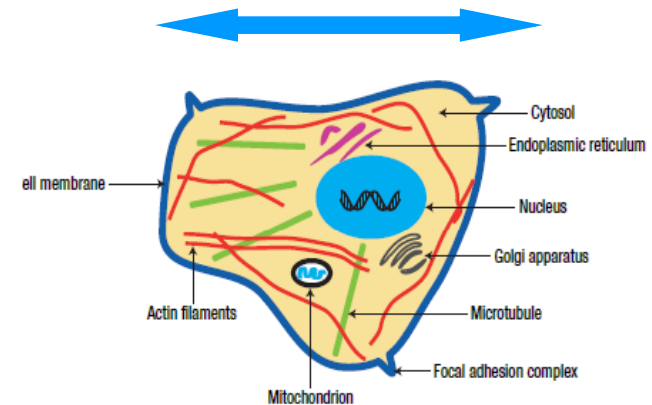
“Tres de las cuatro fuerzas conocidas son irrelevantes para la mayoría de procesos esenciales de la biología celular. La cuarta (fuerza electrostática) ha sido ignorada por la mayoría de biólogos hasta hace bien poco”

S. McLaughlin. *The electrostatic properties of membranes*
Annu. Rev. Biophys. Chem. 1989. 18: 113 - 136

“La deducción matemática casi no se ha utilizado en biología. La razón no ha sido que el sistema sea tan simple que pueda ser explicado sin matemáticas, sino todo lo contrario. Los sistemas biológicos son demasiado complicados para ser accesibles a un tratamiento matemático completo”

E. Schrödinger. *What is life?* 1944

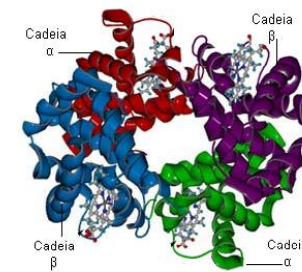
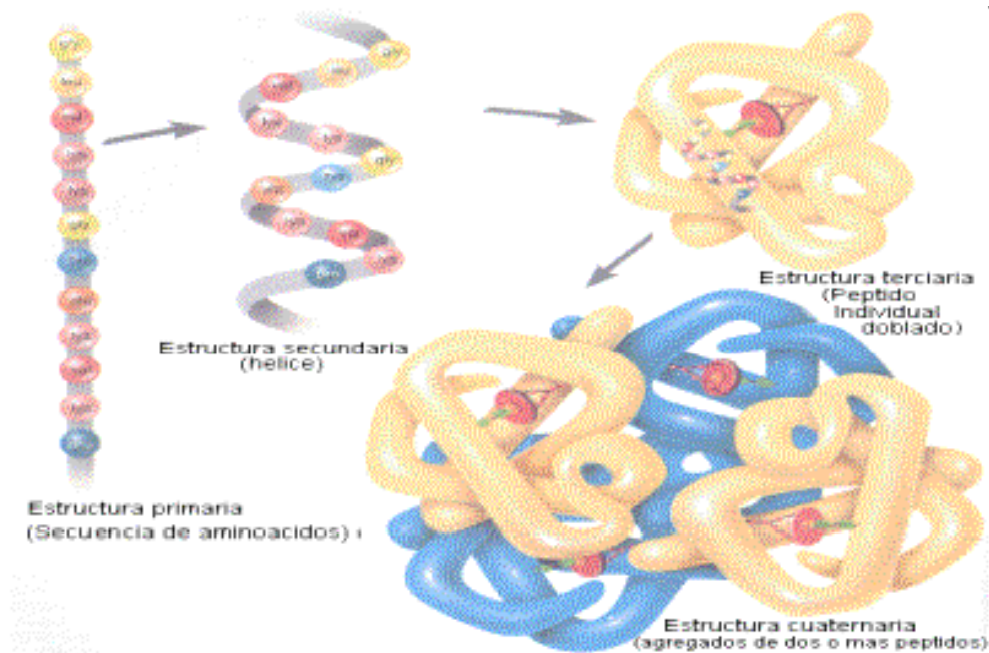
50 μm aproximadamente



¿Qué tipo de preguntas se hace la Biofísica?

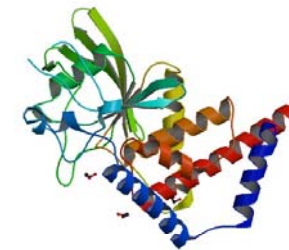
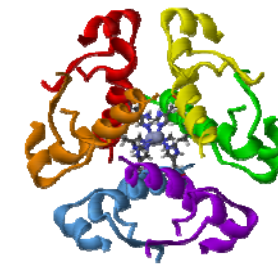
Biofísica – Estructura de Proteínas

- ¿Cómo es posible que los polímeros lineales de sólo 20 aminoácidos diferentes se puedan plegar en proteínas con estructuras tridimensionales precisas y funciones biológicas específicas?



Hemoglobina

Insulina



PTPN22
“House’s protein”

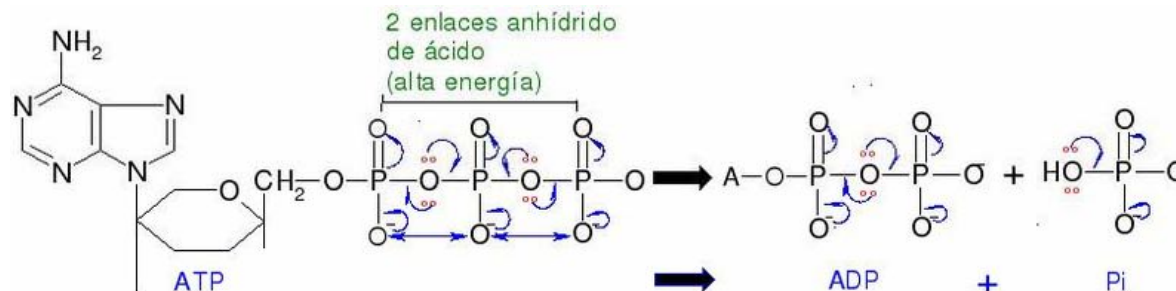
Biofísica - Neurofisiología

- ¿Cómo se consigue que ondas sonoras, fotones, olores, sabores, tacto, sean detectados por un cierto órgano y convertidos en impulsos eléctricos que proveen el cerebro de la información sobre el mundo externo?



Biofísica - Bioenergética

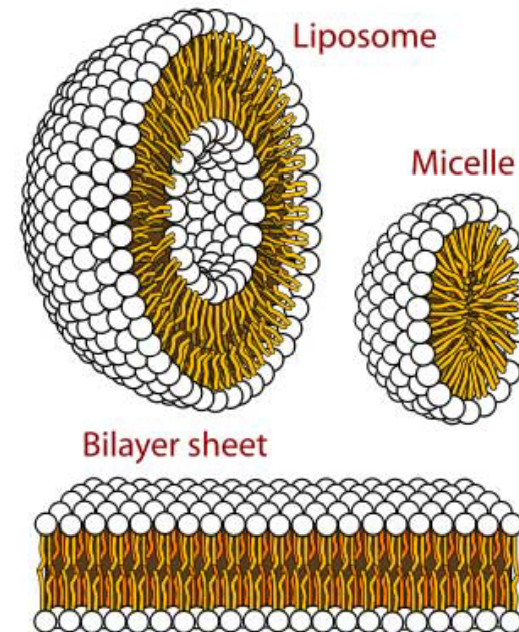
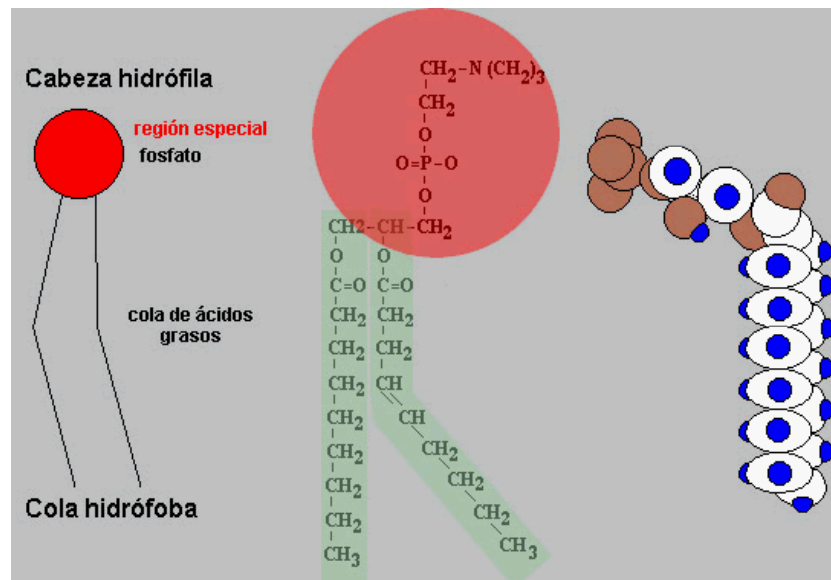
- ¿Cómo convierte una célula de un músculo la energía química de la hidrólisis de ATP en fuerza mecánica y movimiento?



Biofísica: Mecanismos de transporte

- ¿Cómo consigue la membrana celular, una barrera de lípido impermeable a moléculas solubles en agua, transportar selectivamente tales moléculas por su interior no polar?

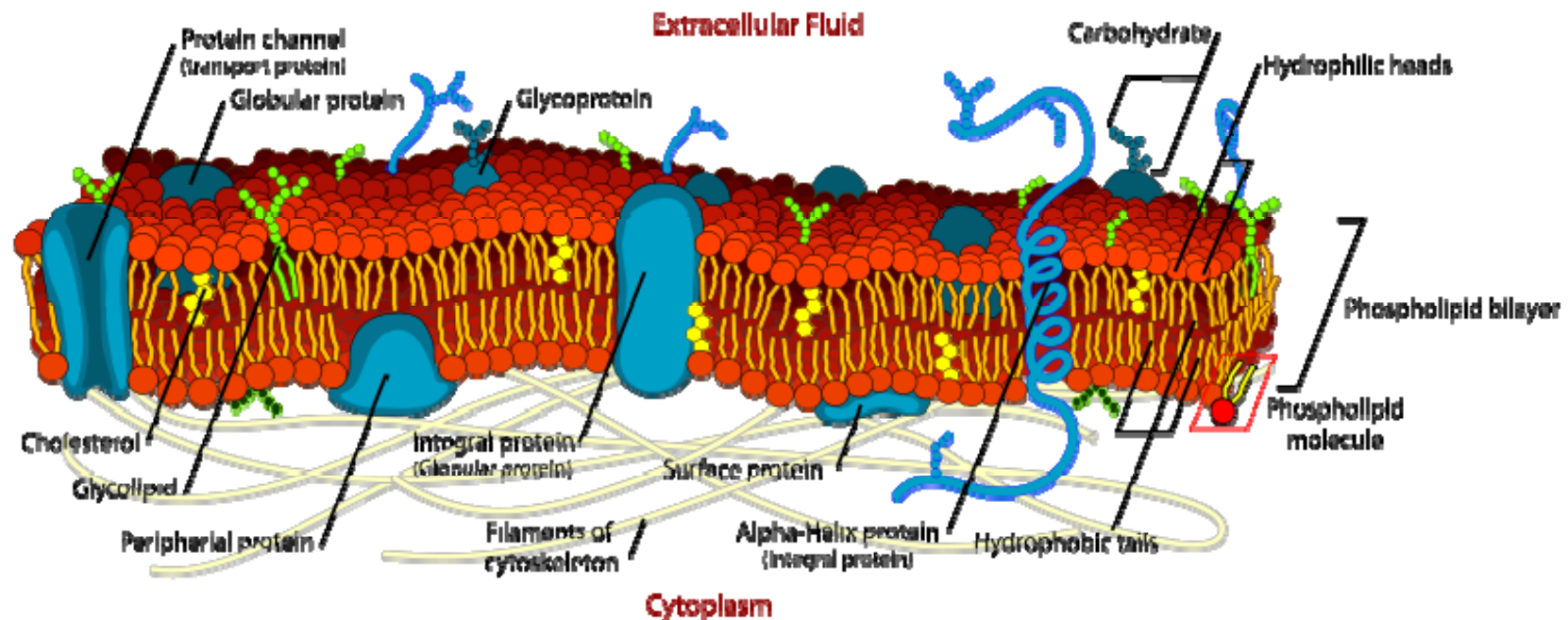
Moléculas anfipáticas



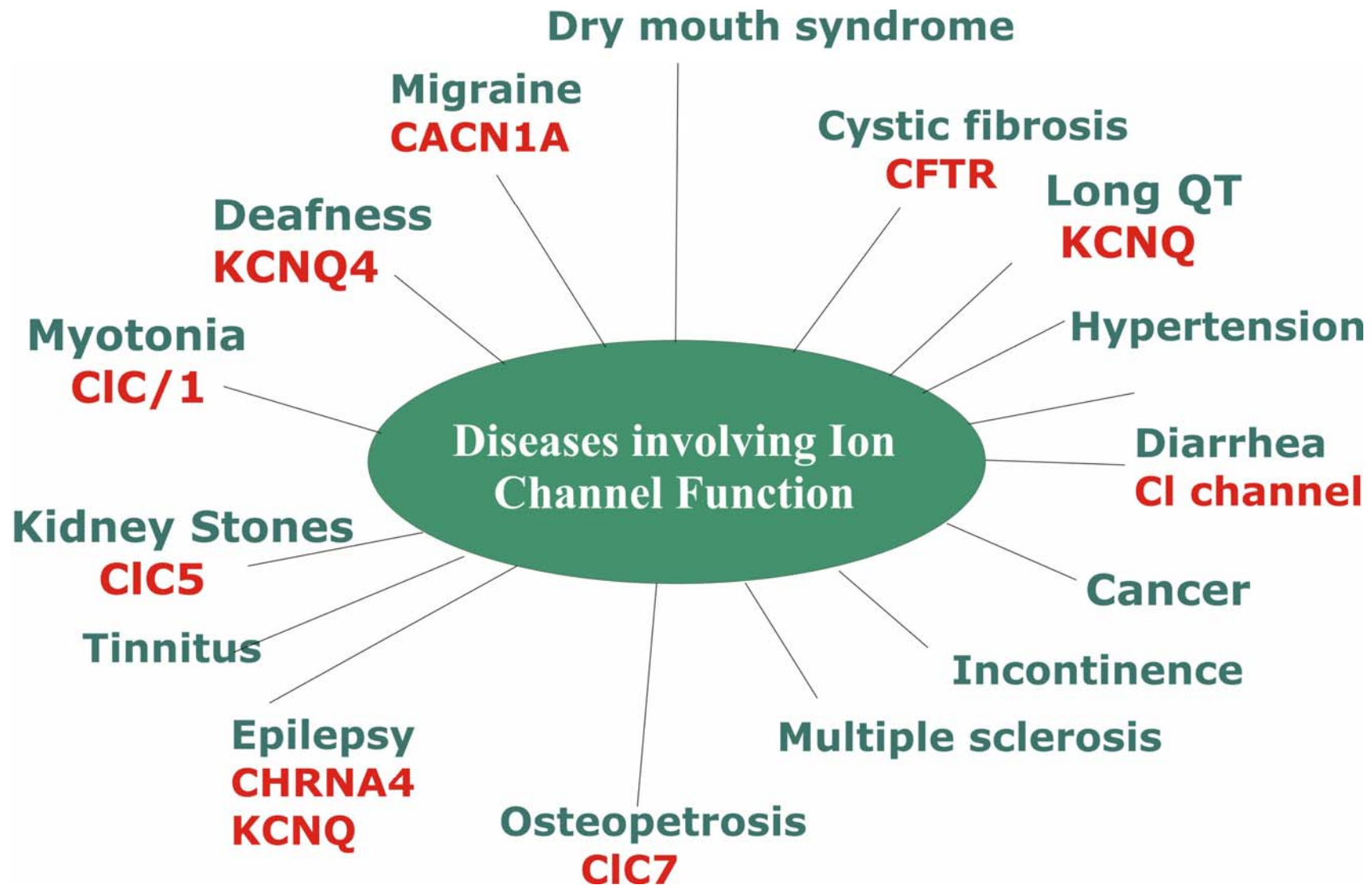
$$\beta_i = \frac{\bar{c}_i}{c_i} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \sim 10^{-30}$$

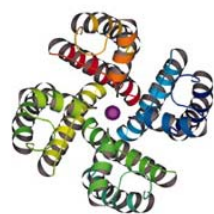
V. A. Parsegian. *Nature* **221** (1969) 844-846

Canales iónicos : proteínas con pequeños “agujeros aislados” que permiten que los iones y otros solutos se muevan a través de membranas impermeables

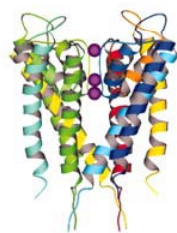


Constituyen la base molecular del sistema nervioso, regulan el transporte selectivo de iones y macromoléculas, comunican las células para formar tejidos funcionales y pueden transportar toxinas letales

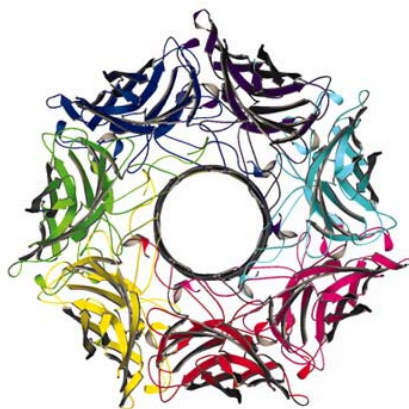




5 nm



K⁺ channel

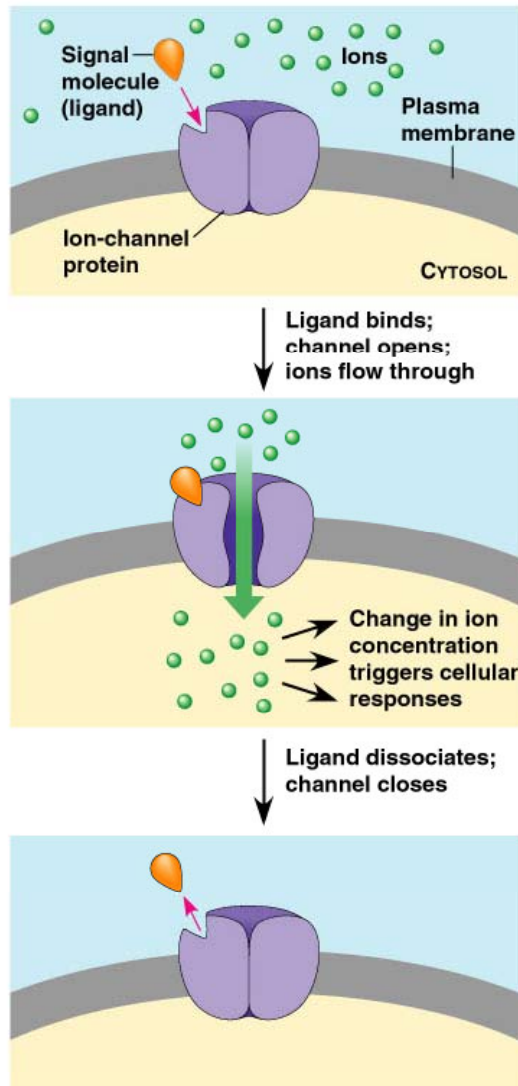


α -hemolysin

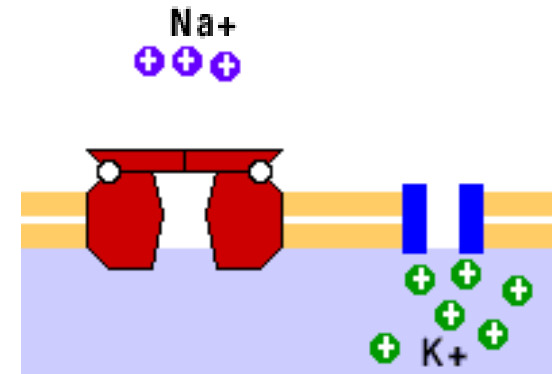
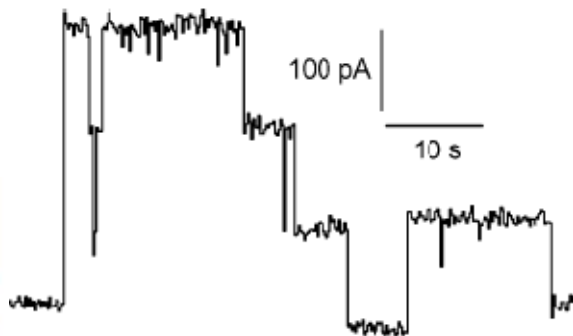
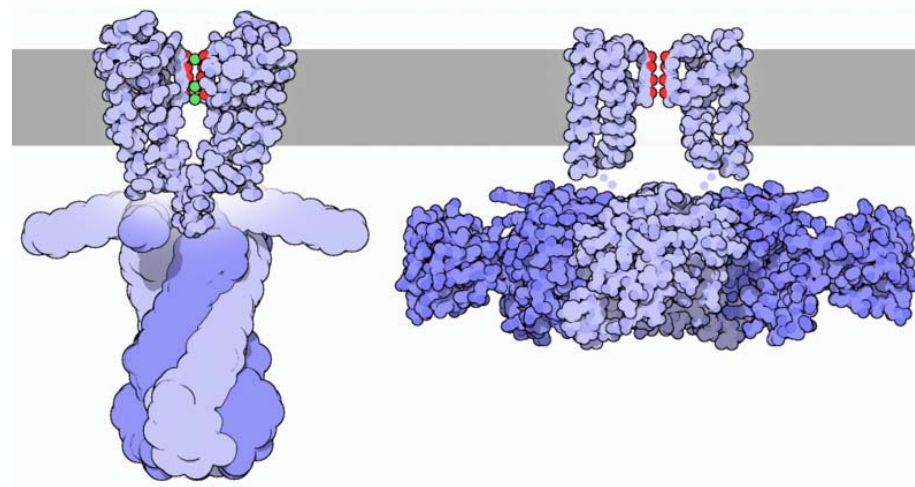


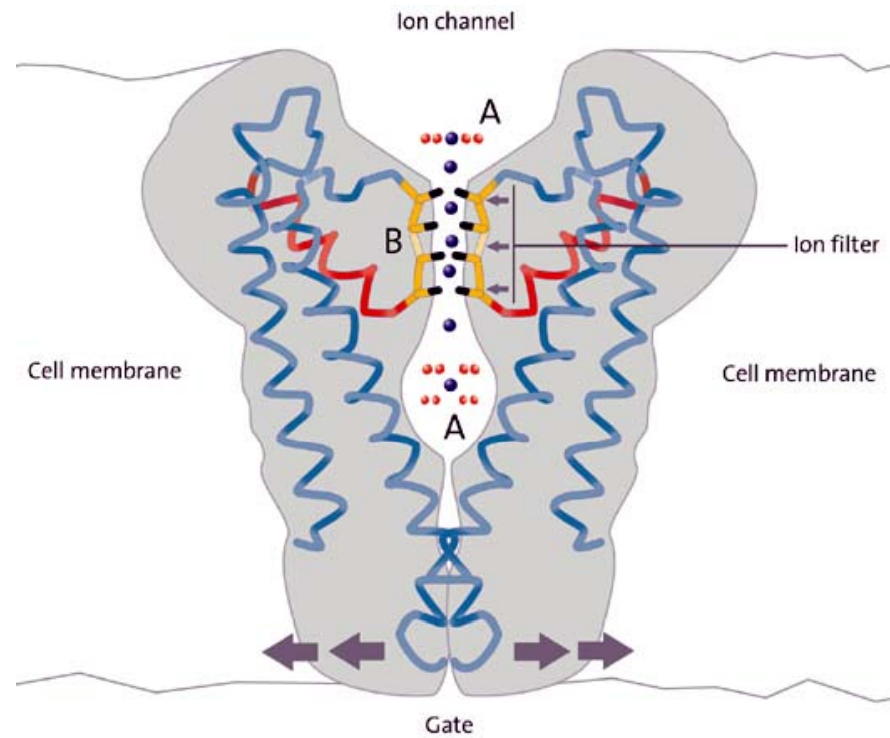
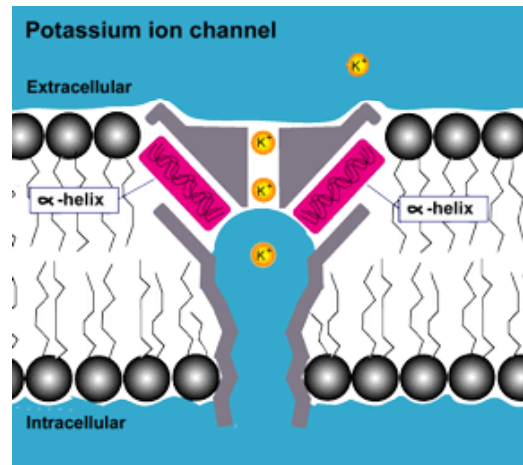
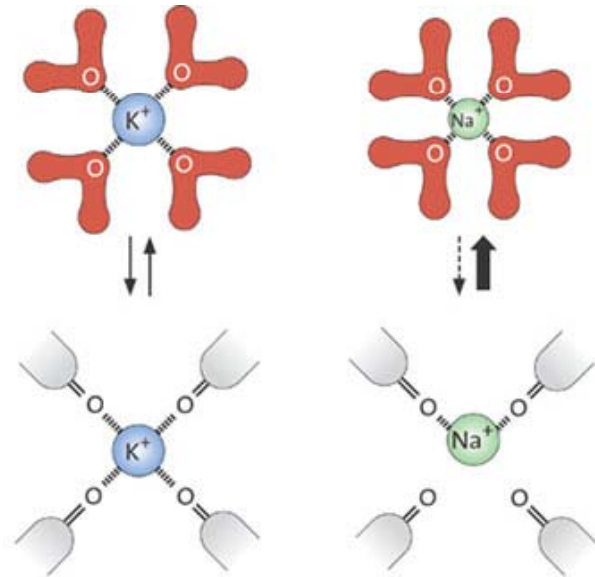
PA₆₃ channel

- canales activados por voltaje
- canales activados por ligandos
- canales mecanosensibles

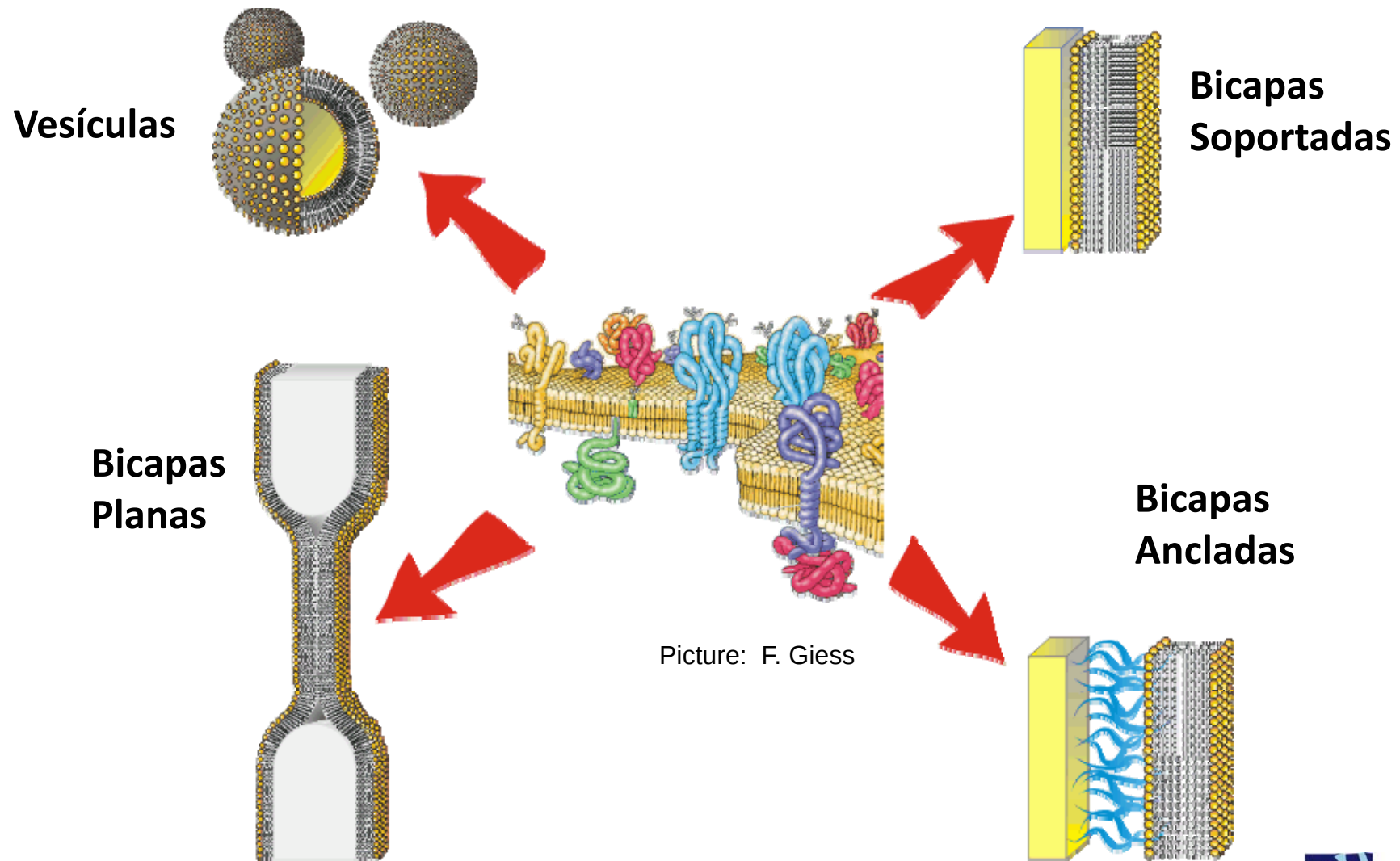


©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

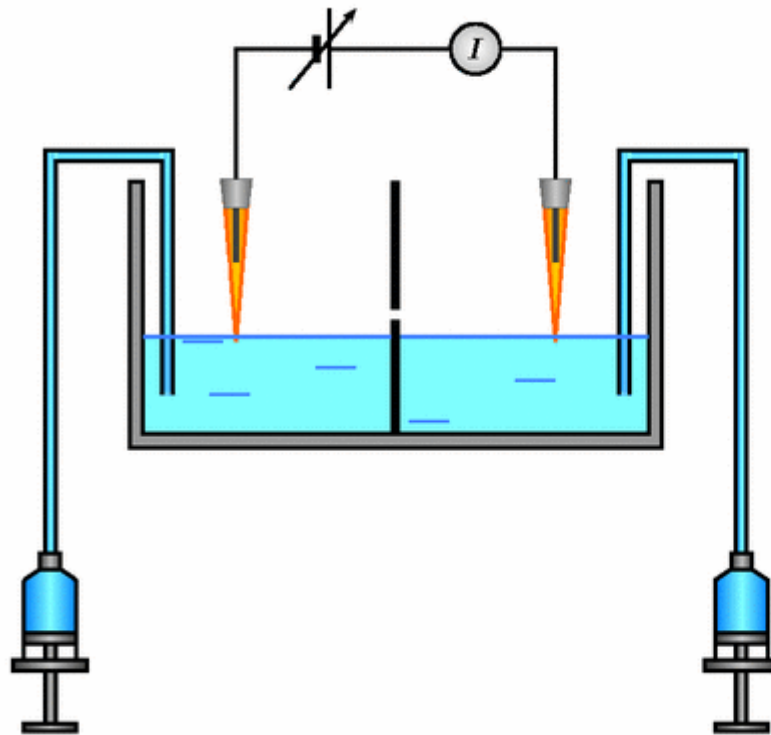




Investigando la función:
De las membranas biológicas a los sistemas modelo *in vitro*



Método para formar bicapas planas de lípido

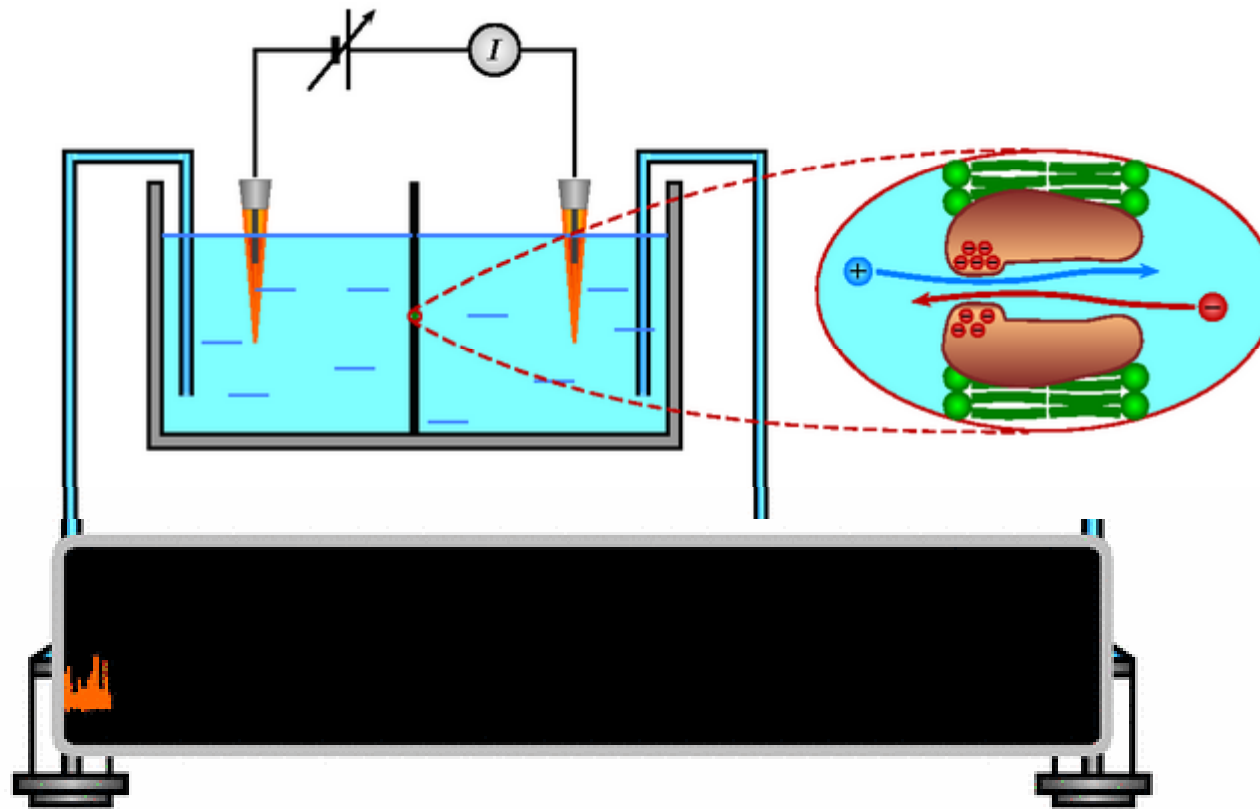


MONTAL M, MUELLER P

FORMATION OF BIMOLECULAR MEMBRANES FROM LIPID MONOLAYERS AND A STUDY OF THEIR ELECTRICAL PROPERTIES

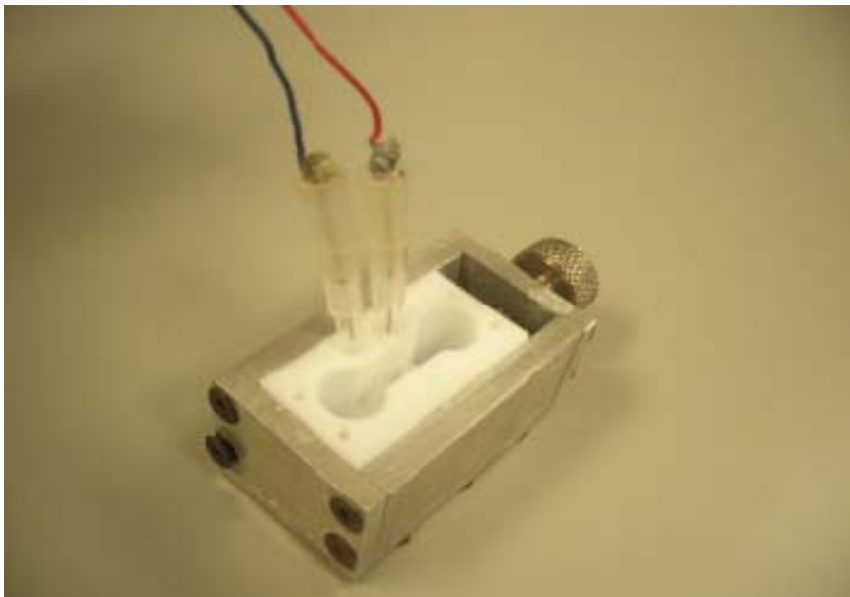
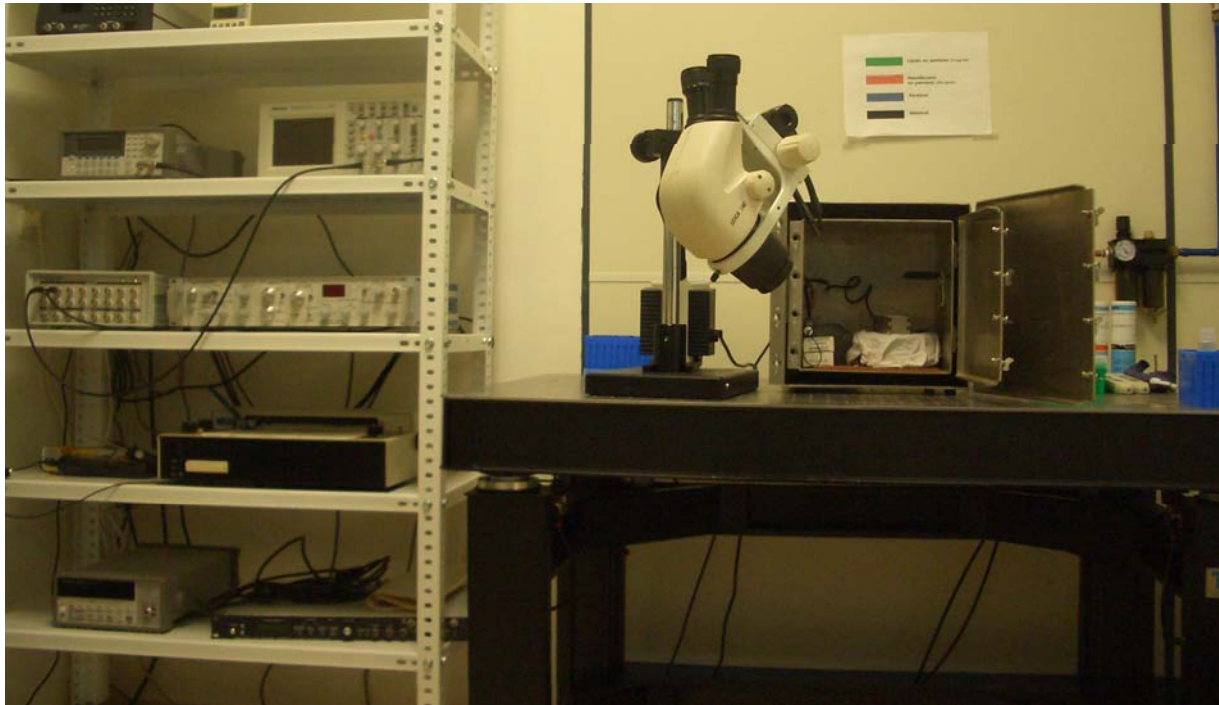
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 69 (12): 3561-3566 1972

Times Cited: [1077](#)



Inserción de una única proteína: $I \sim 1 \text{ pA} = 10^{-12} \text{ A}$
Resolución de eventos a escala molecular !!

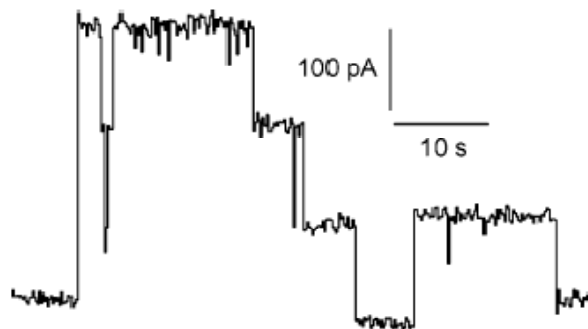
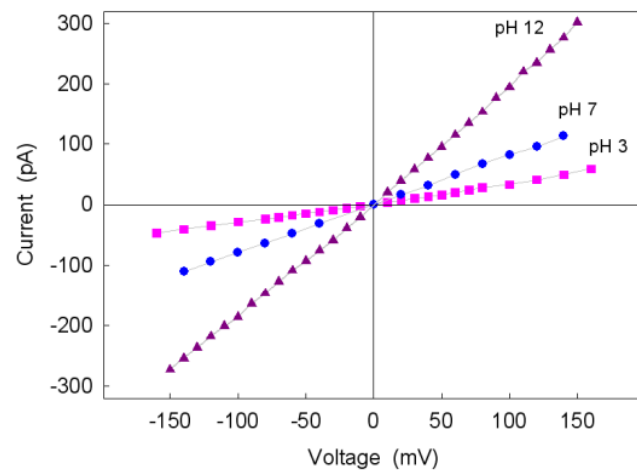
Concentraciones típicas $c = 10^{-14} \text{ M}$



Laboratorio de Biofísica
Molecular de la Universitat
Jaume I

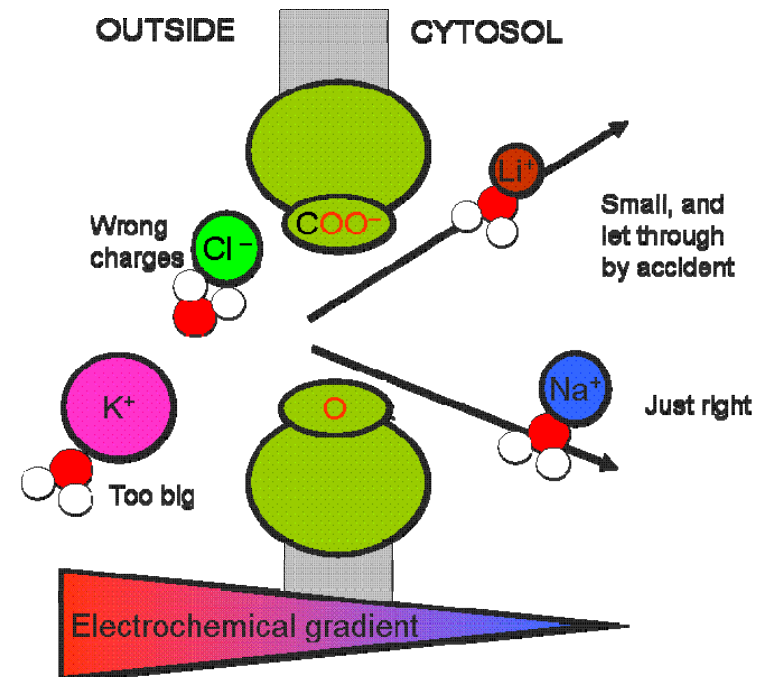
La caracterización funcional de los canales iónicos se hace casi esencialmente mediante técnicas de reconstitución

Curvas I-V



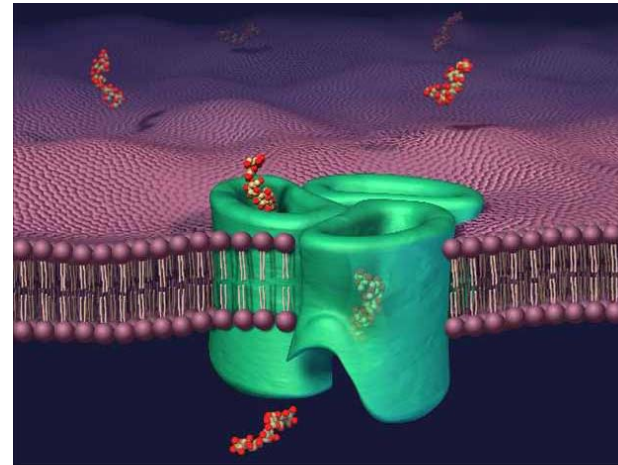
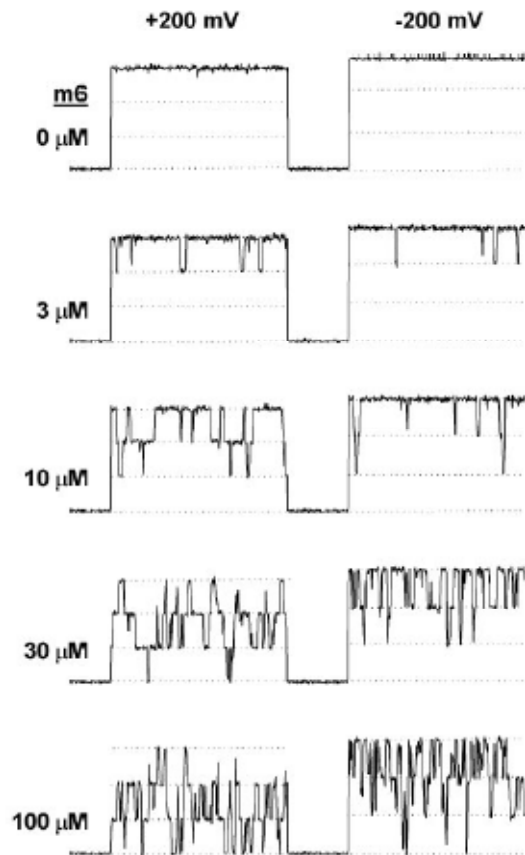
Voltage Gating

Selectividad

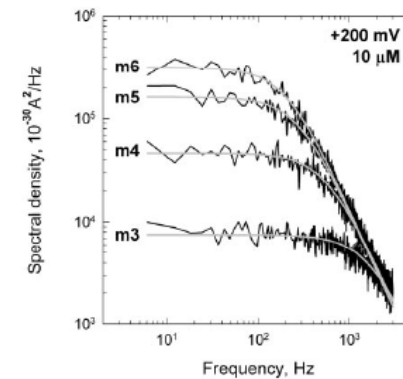


La caracterización funcional de los canales iónicos se hace casi esencialmente mediante técnicas de reconstitución

Transporte de Sustrato



Análisis de ruido - Cinética



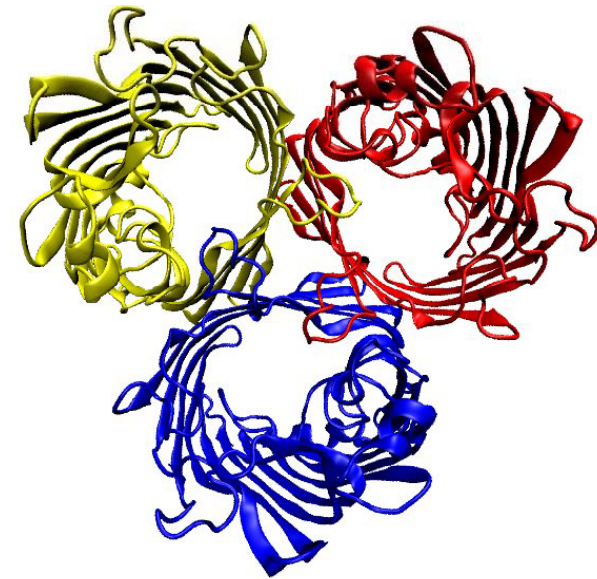
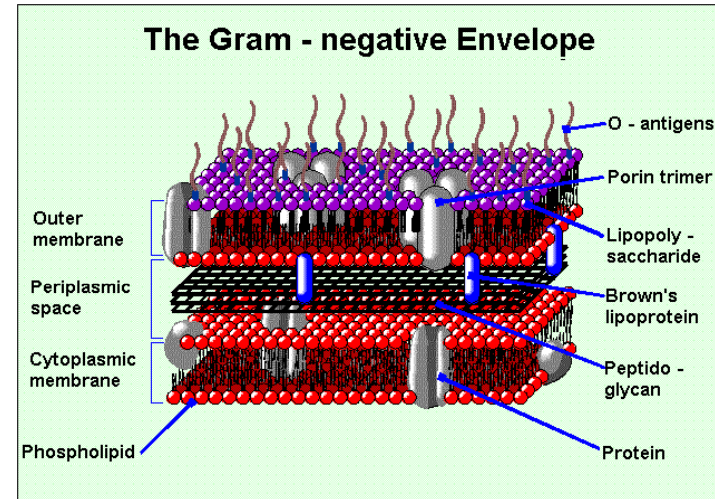
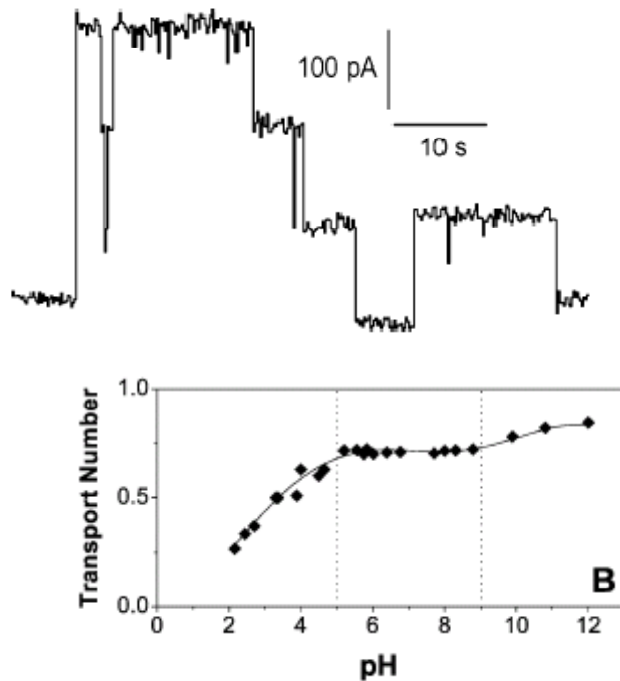
Estudio de un sistema modelo: el canal OmpF

Canal para físicos: Poca relevancia fisiologica,
pero...

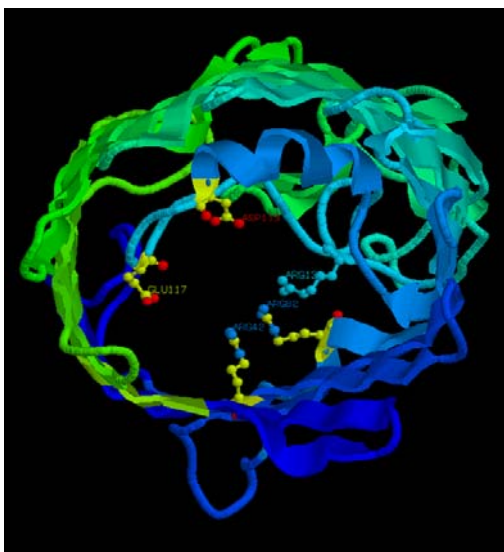
estructura conocida a 2.4 Å, poco selectivo,
transporte multiiónico regulado por interacciones
electrostáticas. Permite el uso de tratamientos
contínuos Poisson-Nernst-Planck

Outer membrane protein F in *Escherichia Coli*

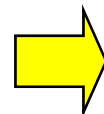
Reconstituido en membranas lipídicas
OmpF forma canales triméricos



Cada monómero tiene forma de reloj de arena, y es débilmente selectivo a cationes a pH neutro

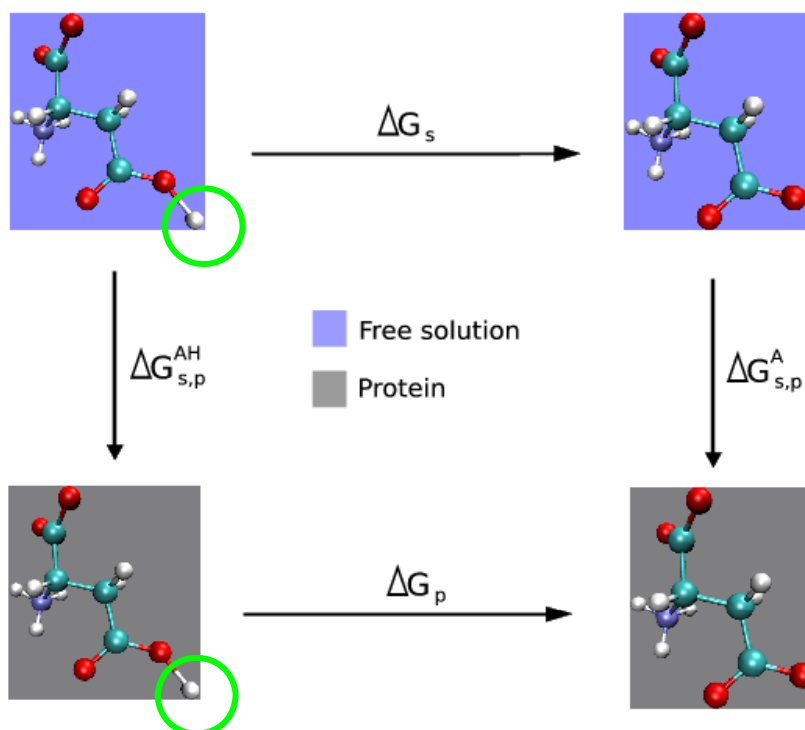


Ionización de Residuos :
¿Qué residuos estan
cargados a un pH dado?



pK_a

pK_a tabulados para disolución libre



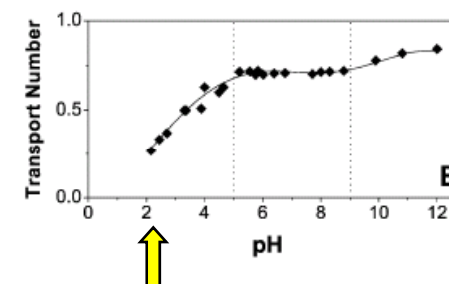
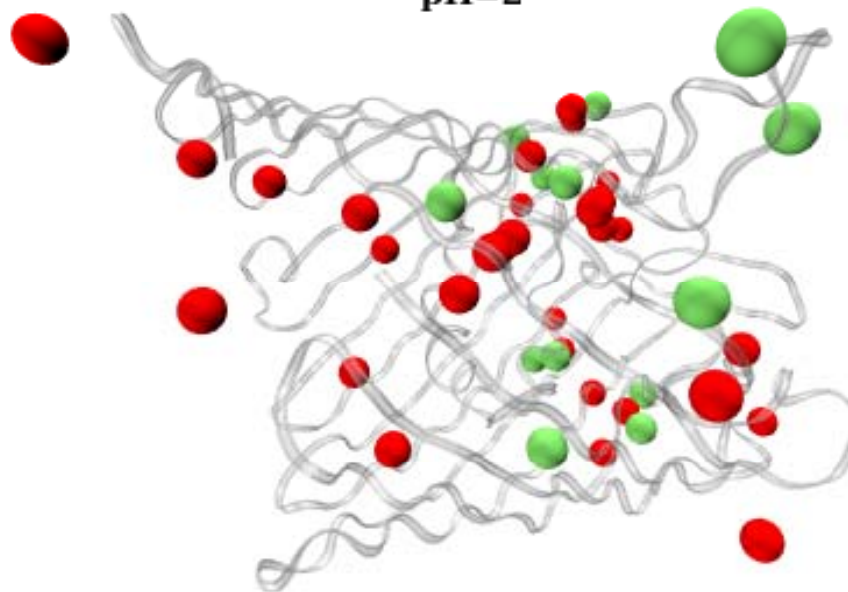
- (1) Entorno dieléctrico
- (2) Interacción entre cargas parciales y entre residuos diferentes

Los cálculos involucran a 1020
resíduos, de los cuales 302
son ionizables

● + 177

● -42

pH=2

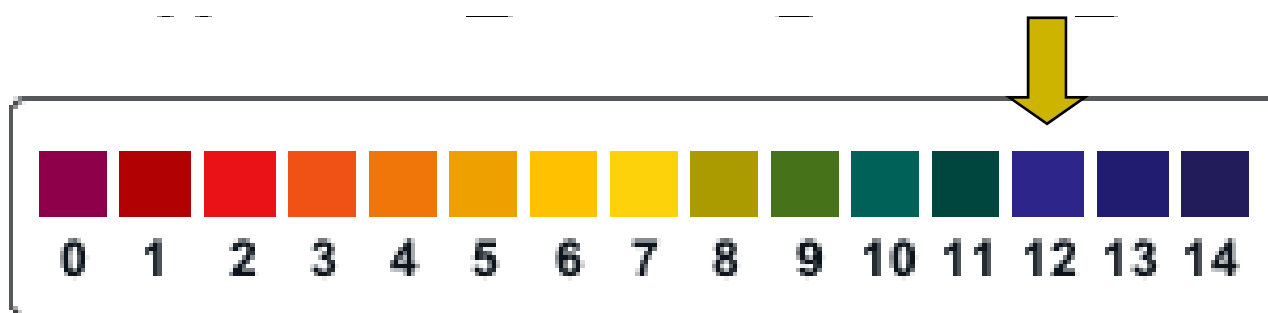
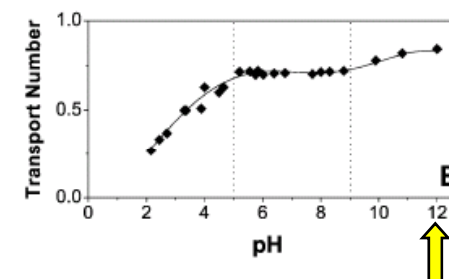


pH color chart

● + 159

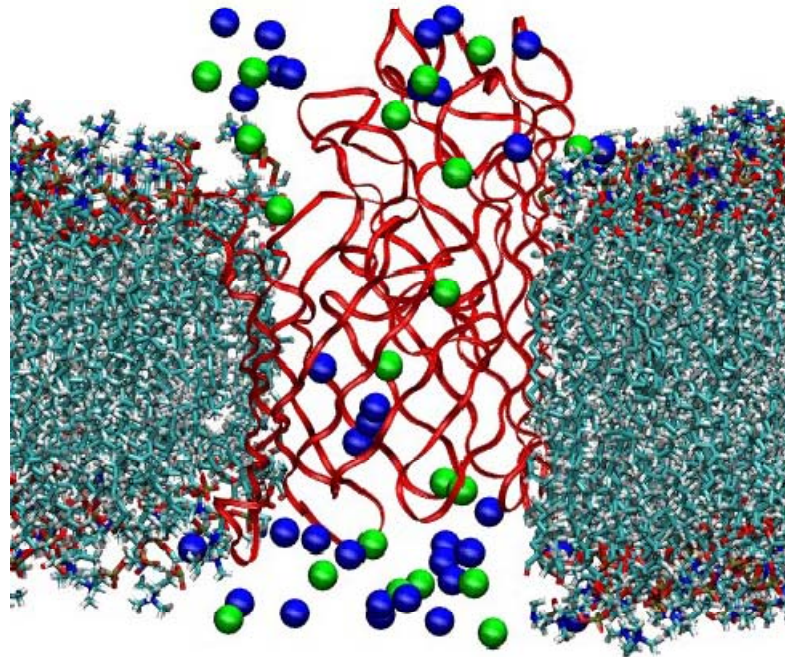
● - 129

pH=12



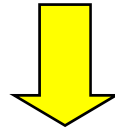
pH color chart

- Dificultades Computacionales ↔ Débil selectividad de OmpF
- El proceso de permeación involucra un elevado número de iones correlacionados (típicamente unos 20 a 1 M KCl)
- La escala temporal necesaria para obtener promedios significativos de las propiedades iónicas en el poro reduce el número de posibles cálculos



Im & Roux, *Journal of Molecular Biology* **322** (2002)
Tieleman & Berendsen, *Biophysical Journal* **74**(1998)
Danelon, Winterhalter et al. *Biophysical Chemistry* **104** (2003)

- Modelo teórico que permita conocer el comportamiento del sistema en diferentes condiciones de concentración, pH, tipo de electrolito, etc



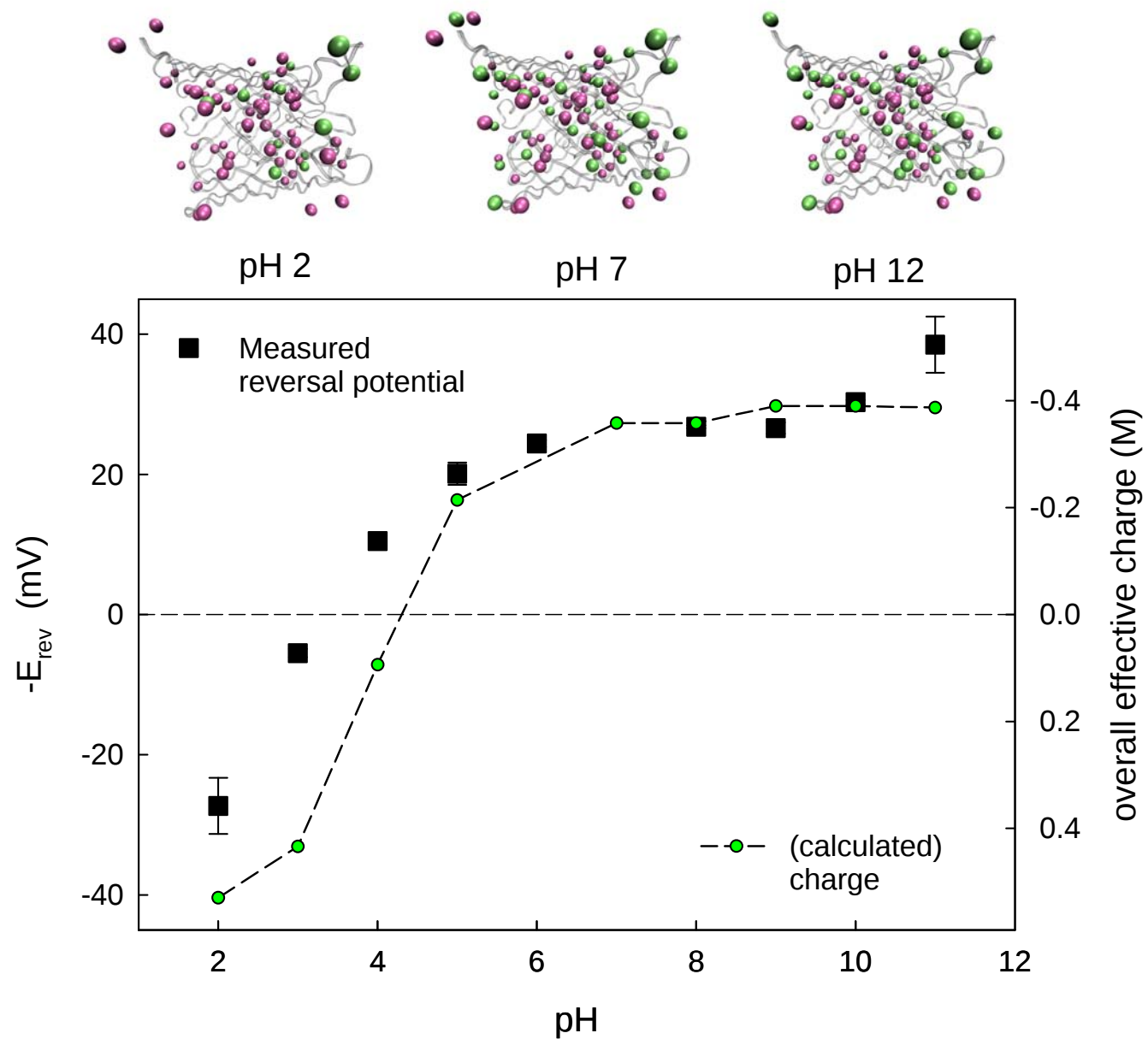
Primera aproximación: modelos de BAJA resolución

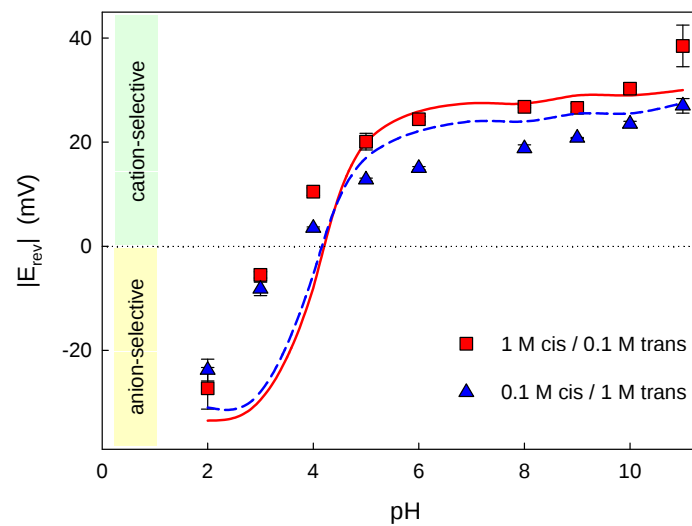
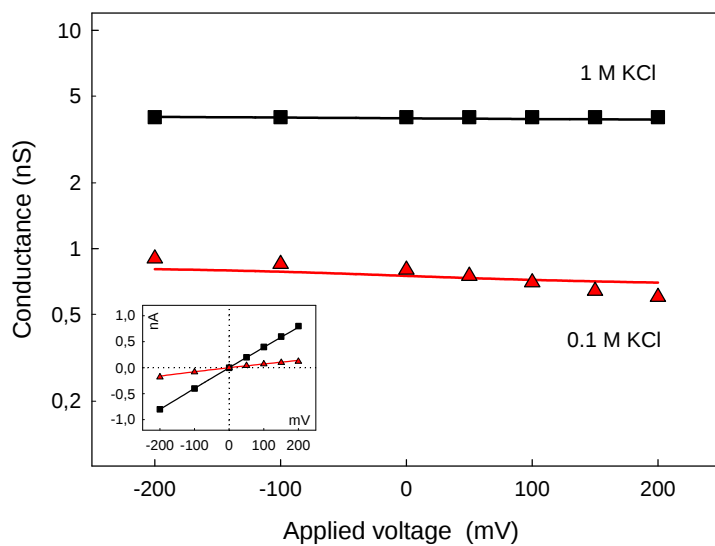
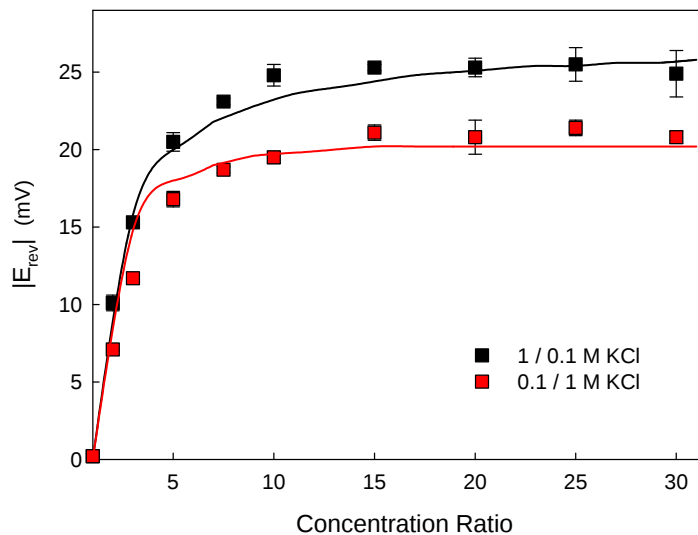
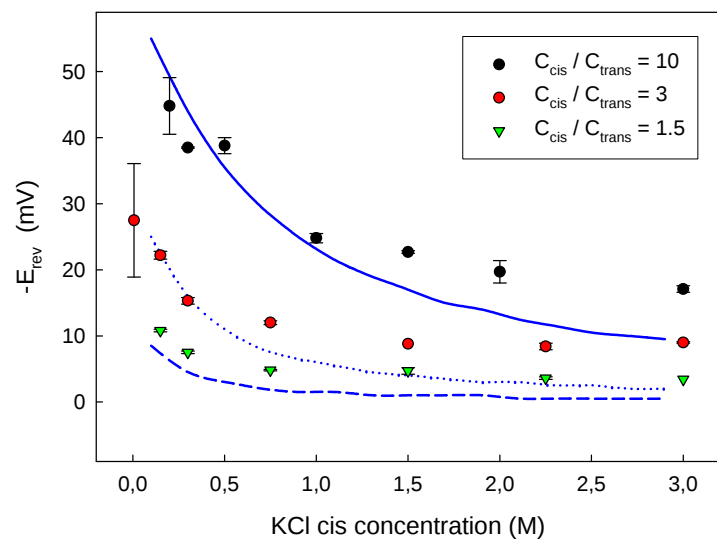
Un modelo simple continuo : ecuaciones Poisson-Nernst-Planck

$$\vec{J}_i = -D_i \left[\vec{\nabla} c_i(z) + \frac{e}{kT} q_i c_i(z) \vec{\nabla} \phi(z) \right] \quad \text{Nernst-Planck}$$

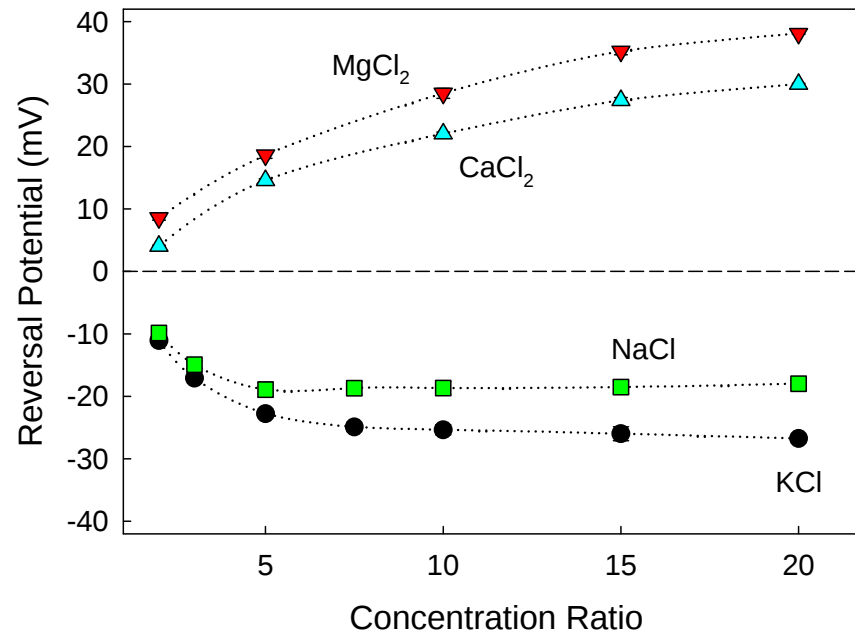
$$\vec{\nabla} \left[\epsilon_s \vec{\nabla} \phi(z) \right] = -\rho_f(z) - e N_A \sum_i q_i c_i(z) \quad \text{Poisson}$$

$$c_i(z) = c_i^{bulk} \exp \left[-\frac{e}{kT} q_i (\phi(z) - V^{bulk}) \right] \quad \text{Equilibrio Donnan en las interfases}$$





No solo caracterización biofísica -> “Hot topics” en Física



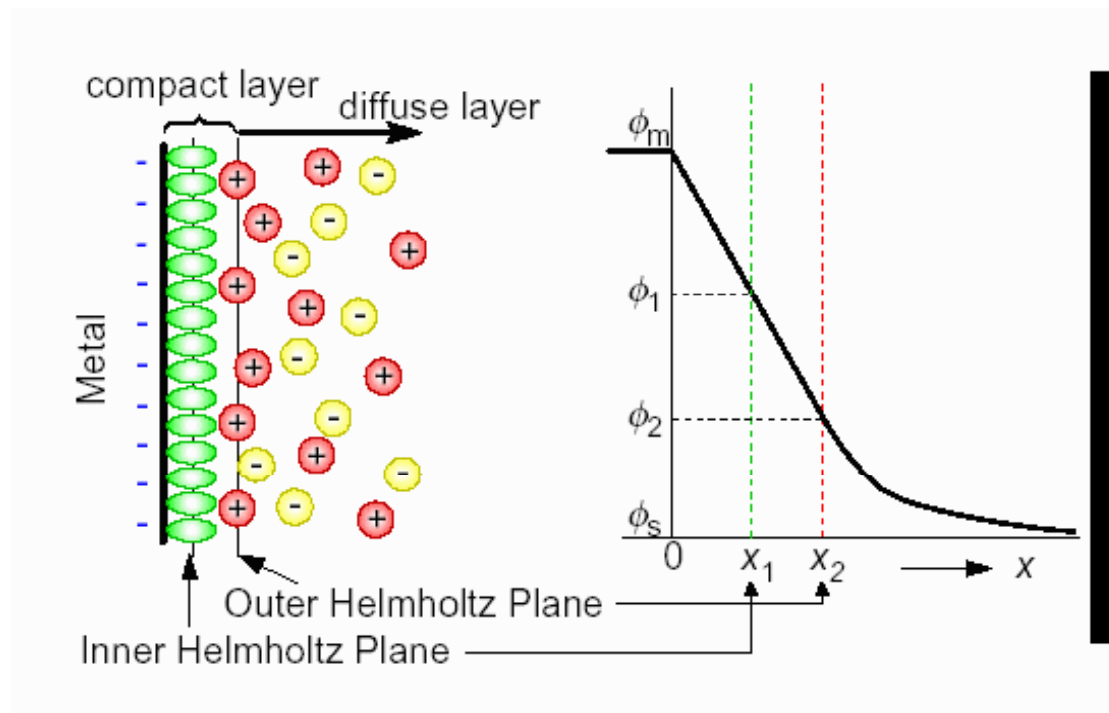
Selectivo a aniones

Selectivo a cationes

¿Inversión de la carga?

Alcaraz, A., E. Nestorovich, M.L. López, E. García-Giménez, S.M. Bezrukov and V.M. Aguilera.
Biophysical Journal 2009. 96, 56-66.

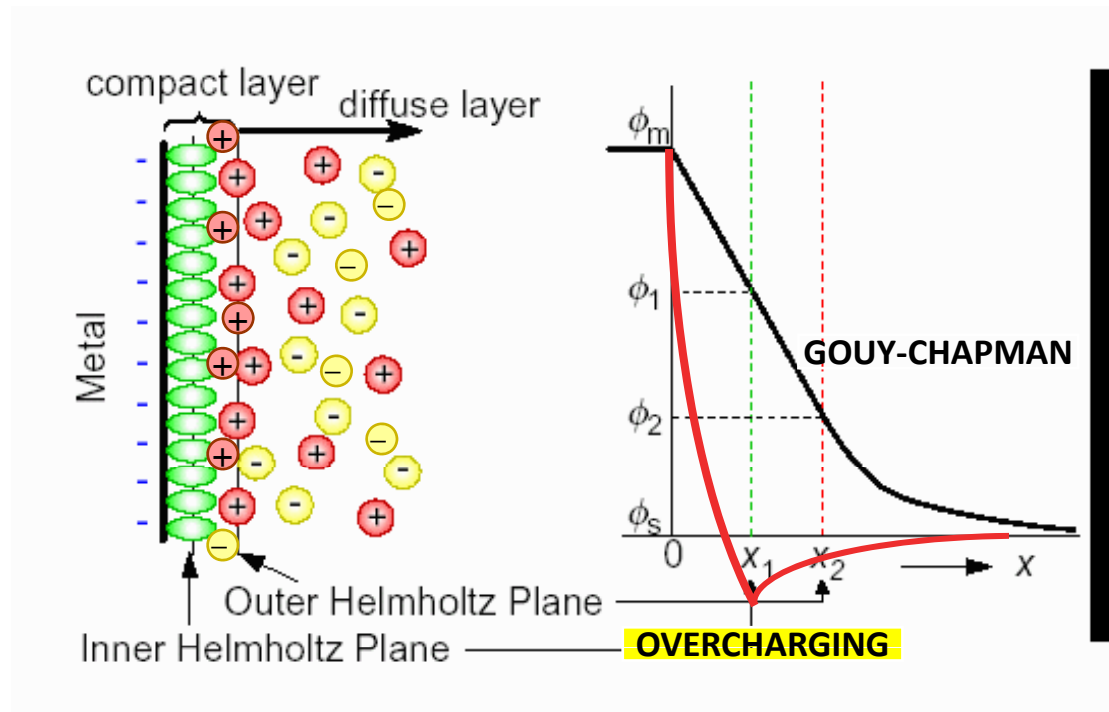
Doble capa eléctrica – Helmholtz, Gouy-Chapman, Stern



INVERSION DE LA CARGA

Overcharging = Charge Reversal = Charge inversion

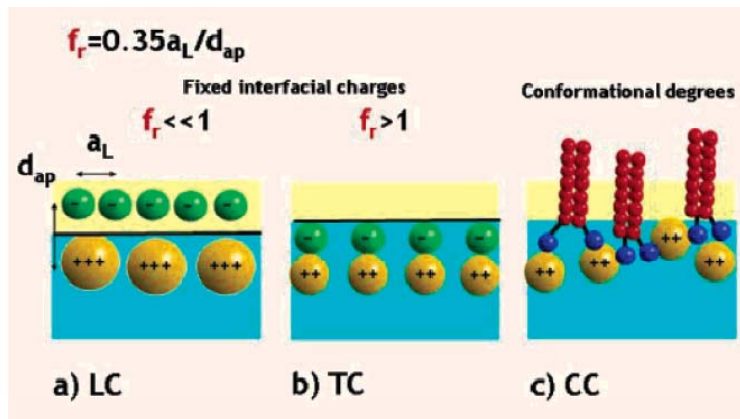
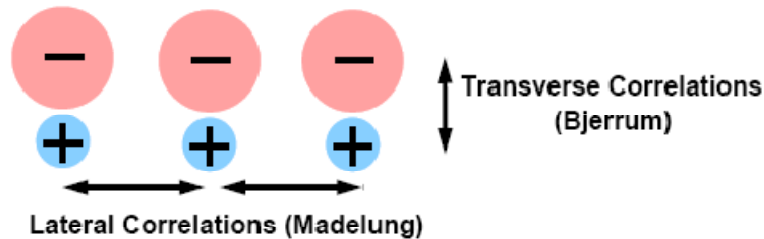
cargas interfaciales atraen contraiones en exceso de su propia carga nominal



El objeto en su conjunto es neutro, pero la carga de los contraiones parece ser mayor que la propia carga de la superficie

INVERSION DE LA CARGA

Overcharging = Charge Reversal = Charge inversion



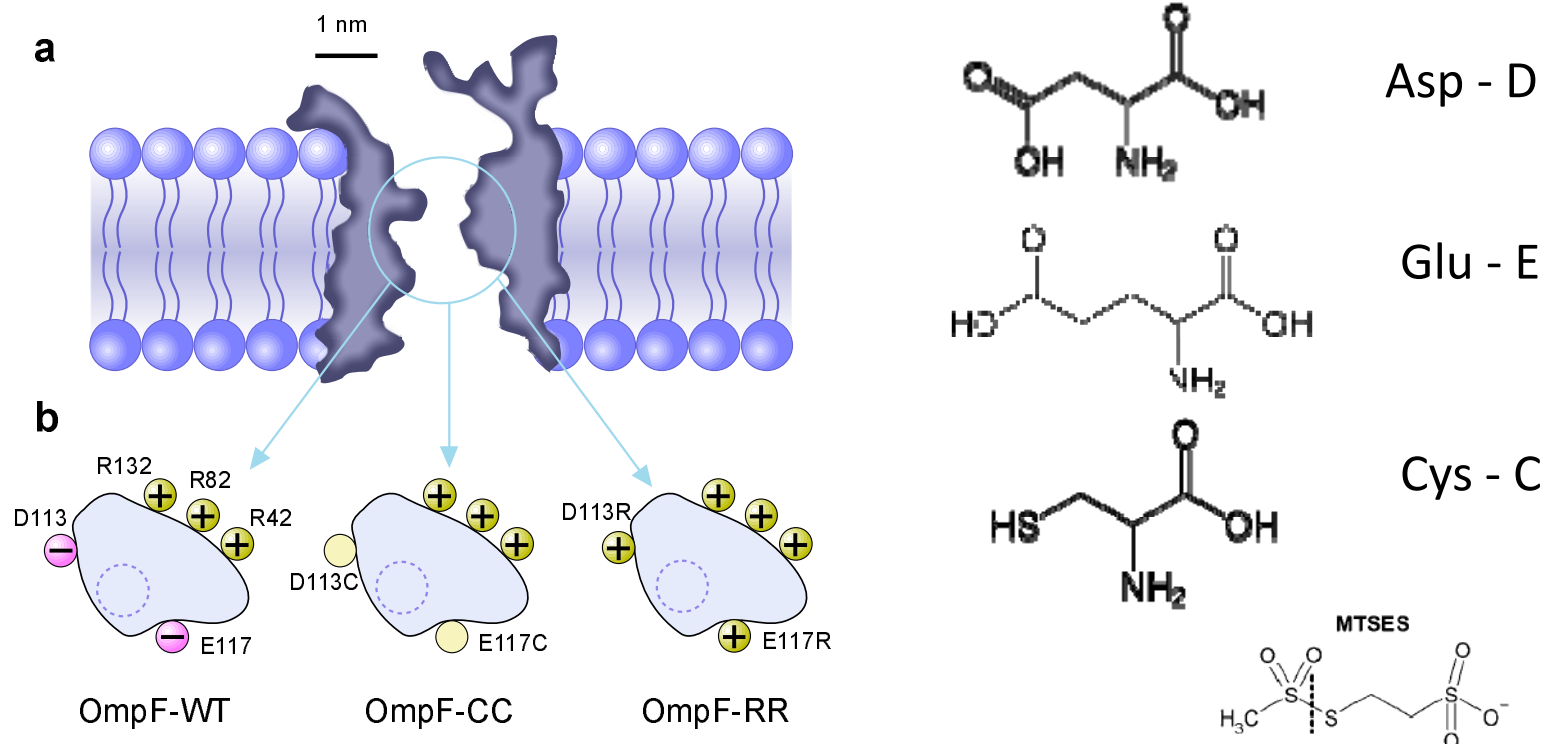
Descrito ya en 1940, pero despues en:

- vesículas lípido
- coloides
- monocapas Langmuir
- membranas nanofiltracion
- polielectrolitos flexibles
- nanoporos de estado sólido
- nanoporos poliméricos
- Canales iónicos ??

Grosberg, A. Yu., T. T. Nguyen, and B. I. Shklovskii. 2002. *Review of Modern Physics* 74:329-345.

Lyklema, J. 2006. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 291:3-12

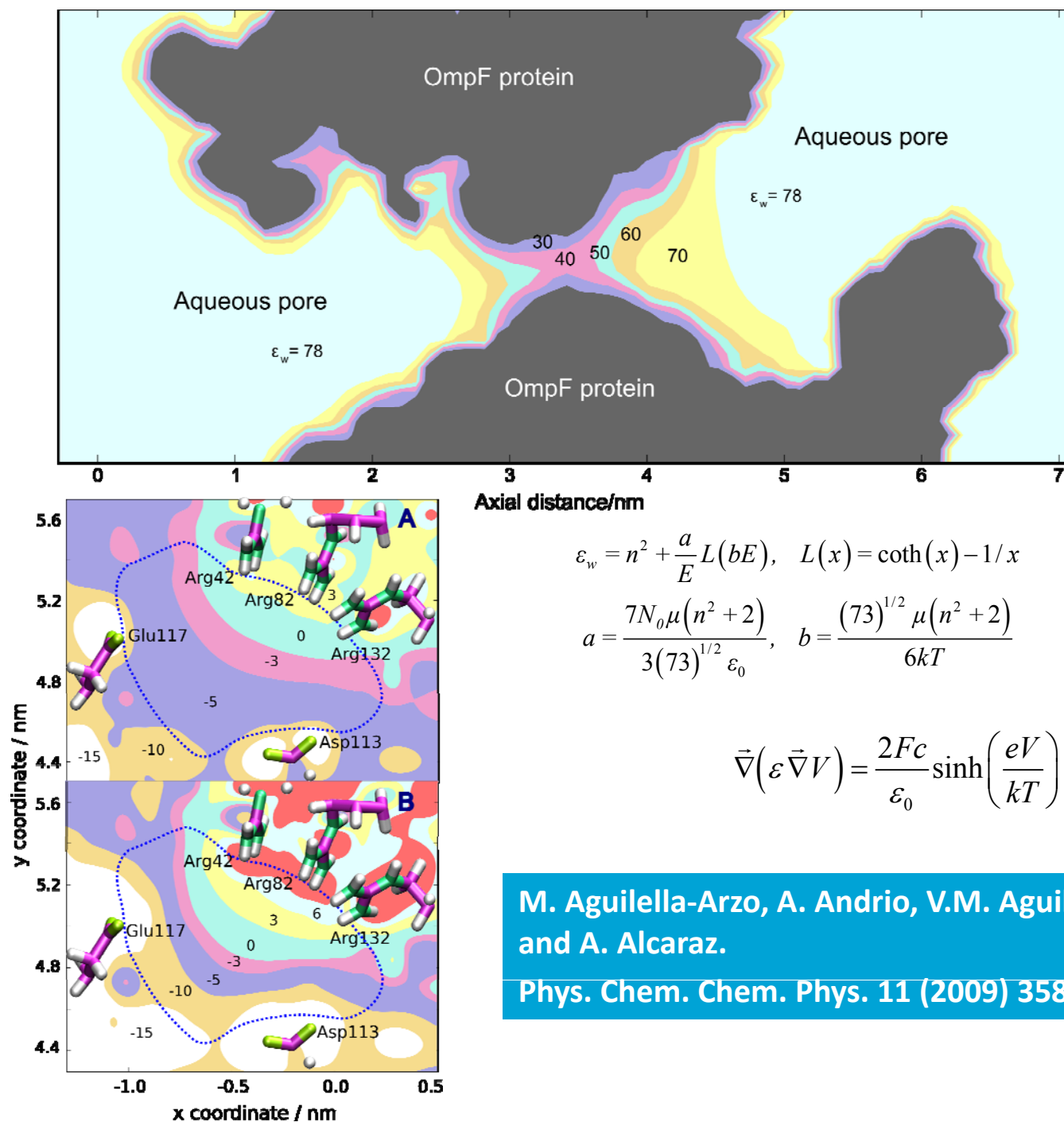
Faraudo, J., A. Travesset. 2007. *J. Phys. Chem. C* 111:987-994.



* Δ Charge: Net charge compared to WT OmpF

Protein	Δ Charge*	E_{rev} (mV) in 1/0.1 M KCl	E_{rev} (mV) in 1/0.1 M $CaCl_2$	Selectivity Inversion
WT OmpF	0	-25.4 ± 0.8	22.1 ± 0.7	Yes
CC	+2	-23.8 ± 0.8	30.1 ± 1.1	Yes
CC-MTSES	0	-50.1 ± 0.7	-6.7 ± 1.0	No
RR	+4	31.9 ± 1.0	35.4 ± 1.7	No

E.García-Giménez et al. *Physical Review E* **81** (2010) 021912.



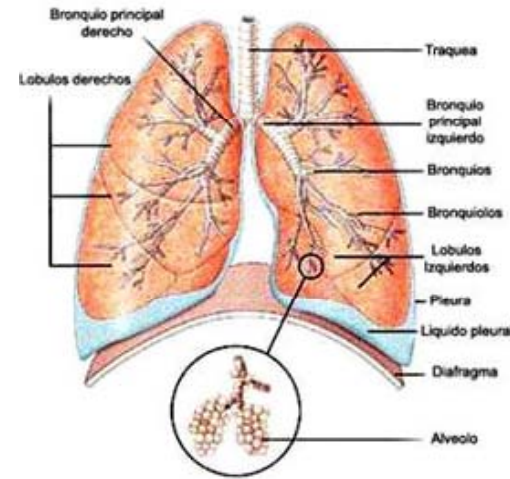
M. Aguilera-Arzo, A. Andrio, V.M. Aguilera
and A. Alcaraz.

Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 358.

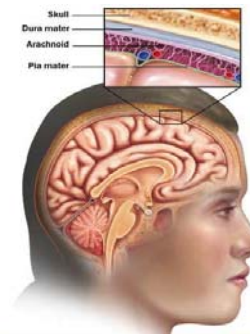
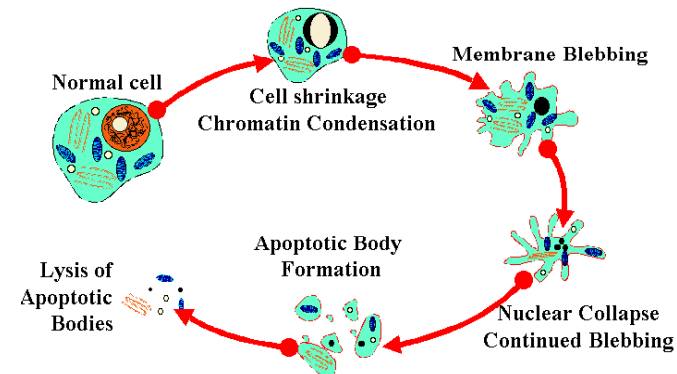
– **Departamento de Bioquímica. Universidad Complutense de Madrid.** análisis de las proteínas que forman parte del surfactante pulmonar.

– **Unidad de Biofísica del centro mixto Universidad del País Vasco-CSIC:** formación de canales iónicos por proteínas apoptóticas de tipo Bax.

– **Departamento de Microbiología. Universidad de Santiago de Compostela:** Estudio conjunto del poro bacteriano PorA/C1 de la bacteria *Neisseria Meningitidis*.



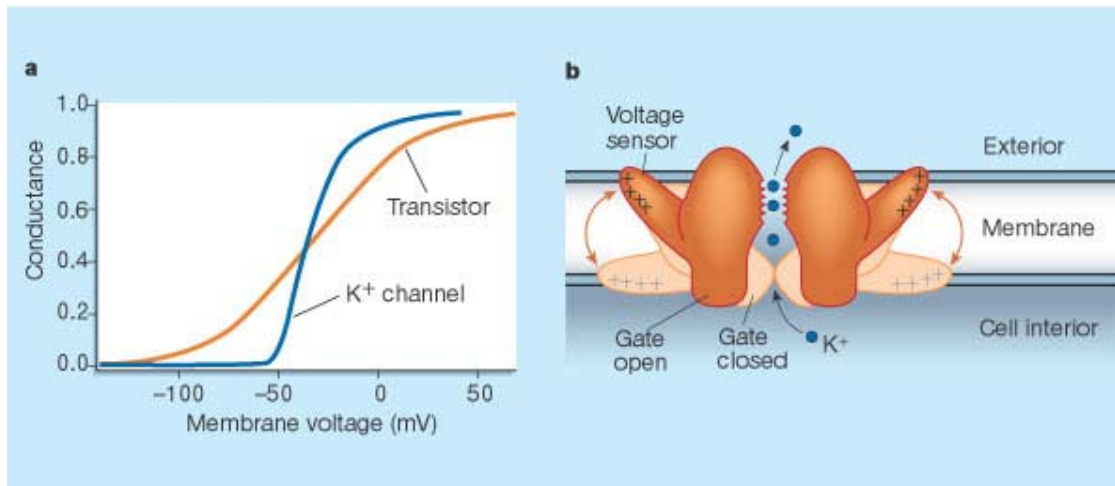
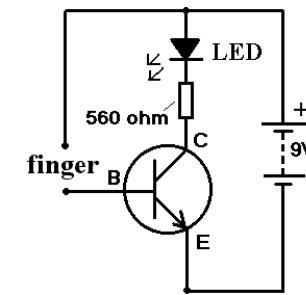
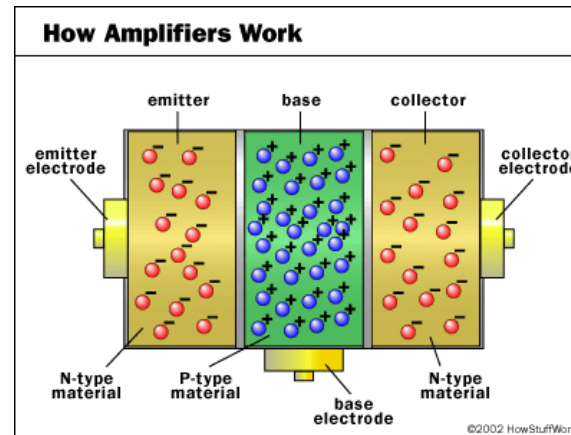
Apoptosis (Programmed Cell Death)



Canales iónicos: los sensores de la vida

Los canales iónicos juegan en biología un papel análogo al de los transistores en la electrónica, usando unos principios físicos similares

cumple funciones de amplificador, oscilador, conmutador o rectificador



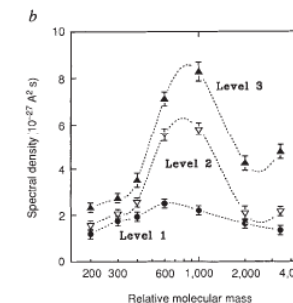
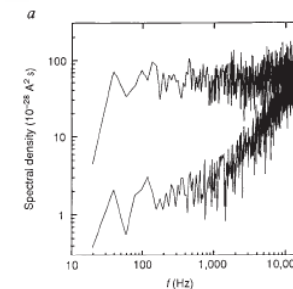
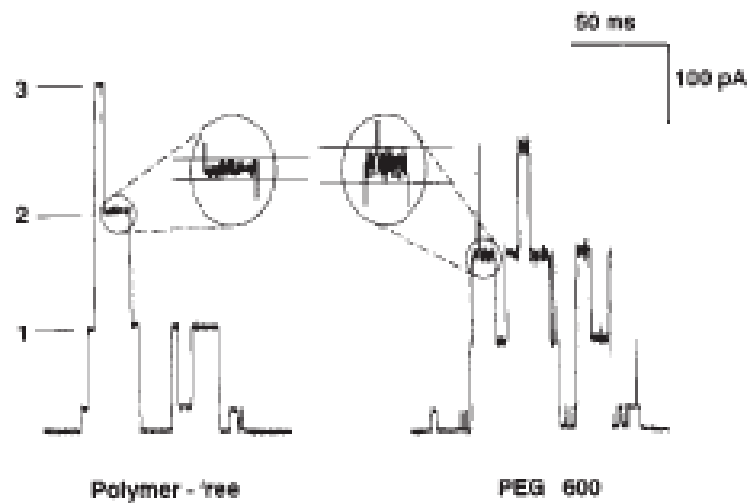
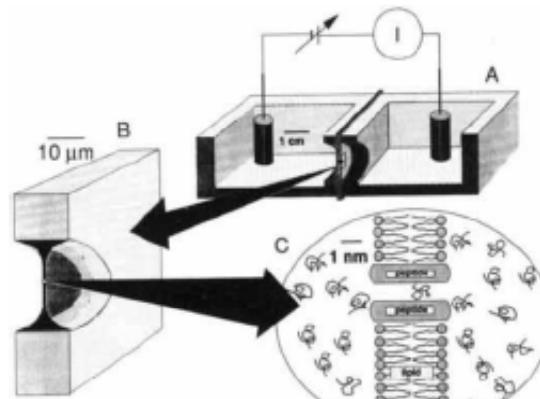
Counting polymers moving through a single ion channel

Sergey M. Bezrukov^{*†}, Igor Vodyanoy^{*‡}
& V. Adrian Parsegian^{*§}

NATURE · VOL 370 · 28 JULY 1994

Detección de
partículas 5 – 15 Å

Molecular Coulter counter

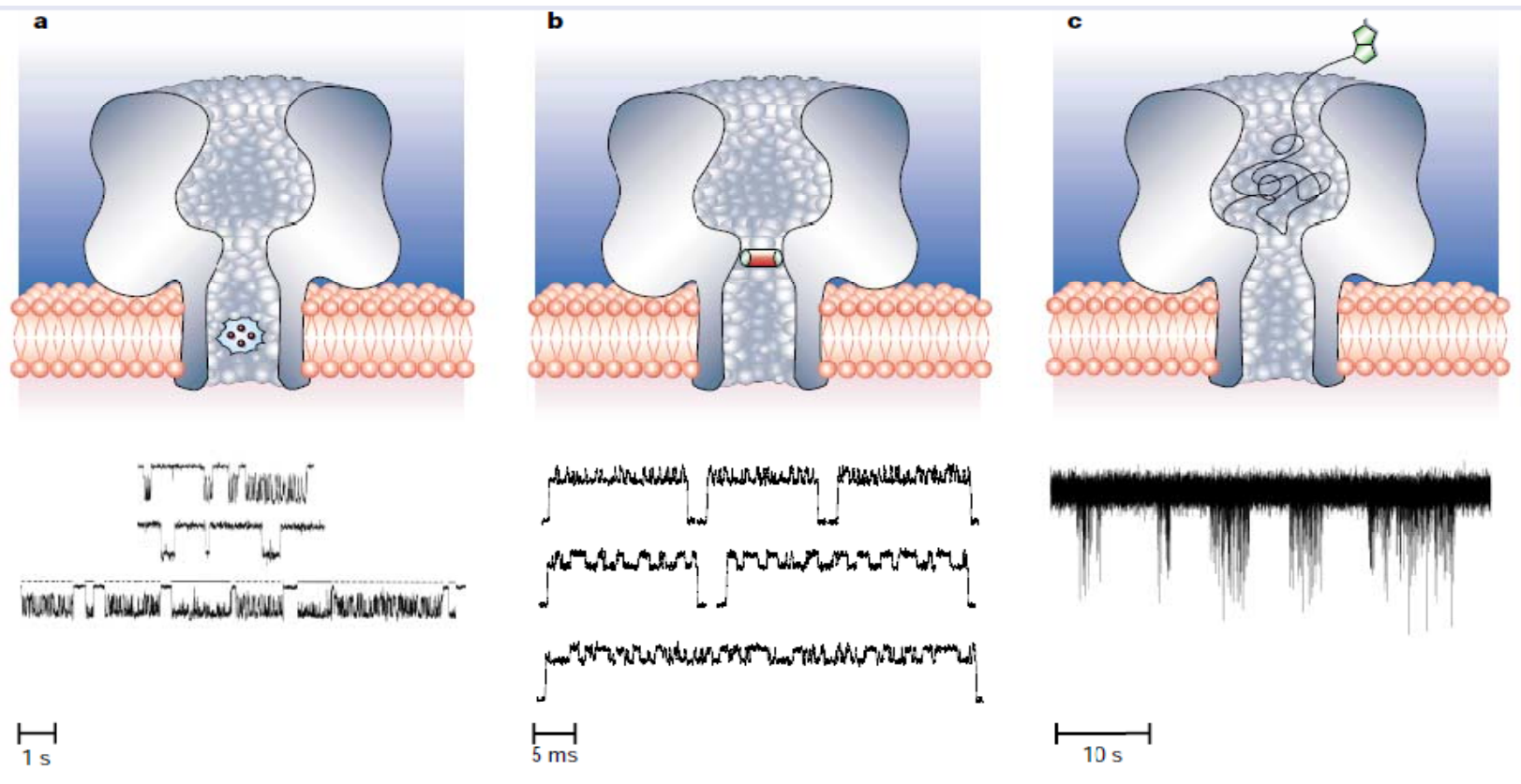


Stochastic sensors inspired by biology

Hagan Bayley*^{†‡} & Paul S. Cremer^{†‡}

*Department of Medical Biochemistry & Genetics, The Texas A&M University System Health Science Center, College Station, Texas 77843-1114, USA (e-mail: bayley@tamu.edu)

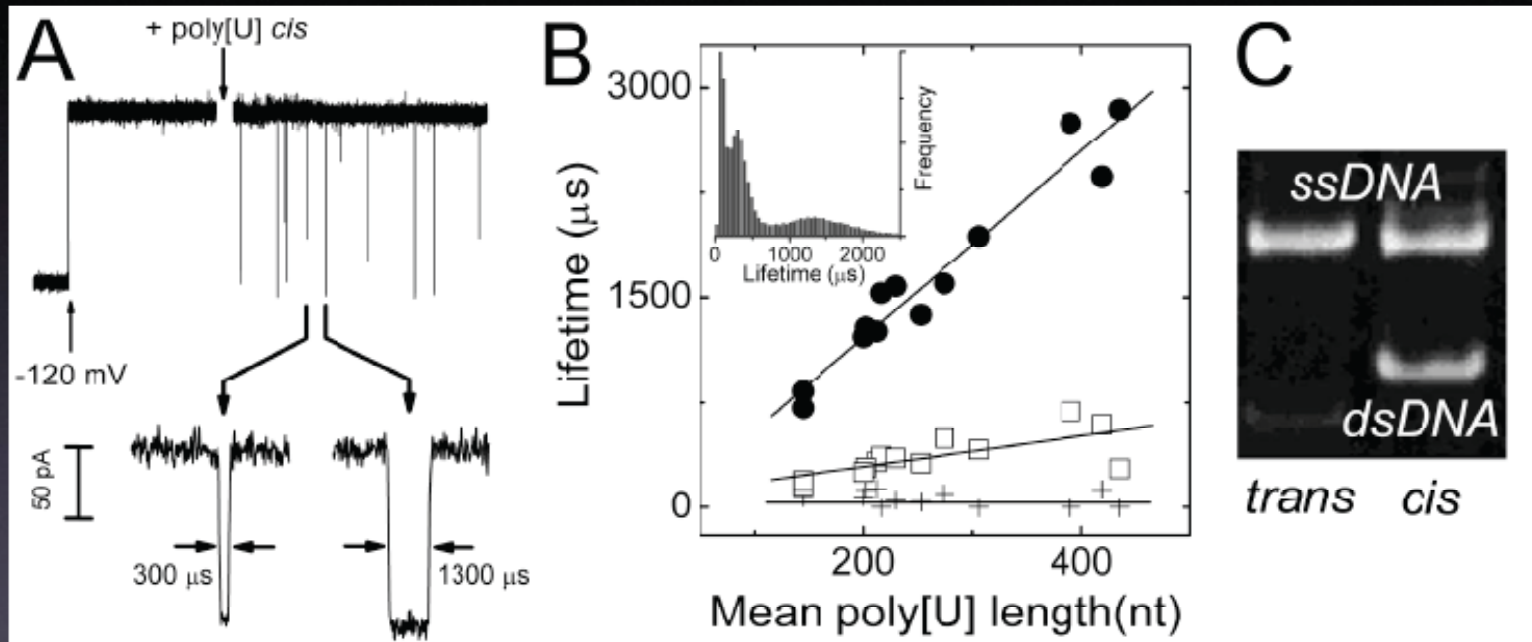
[†]Department of Chemistry, and [‡]Center for Integrated Microchemical Systems, Texas A&M University, College Station, Texas 77843-3255, USA



Detección de iones metálicos, moléculas orgánicas e incluso biomoléculas que son demasiado grandes para entrar en el poro

DNA Transport Through a Single Nanopore

Permits transit of ssDNA but not dsDNA

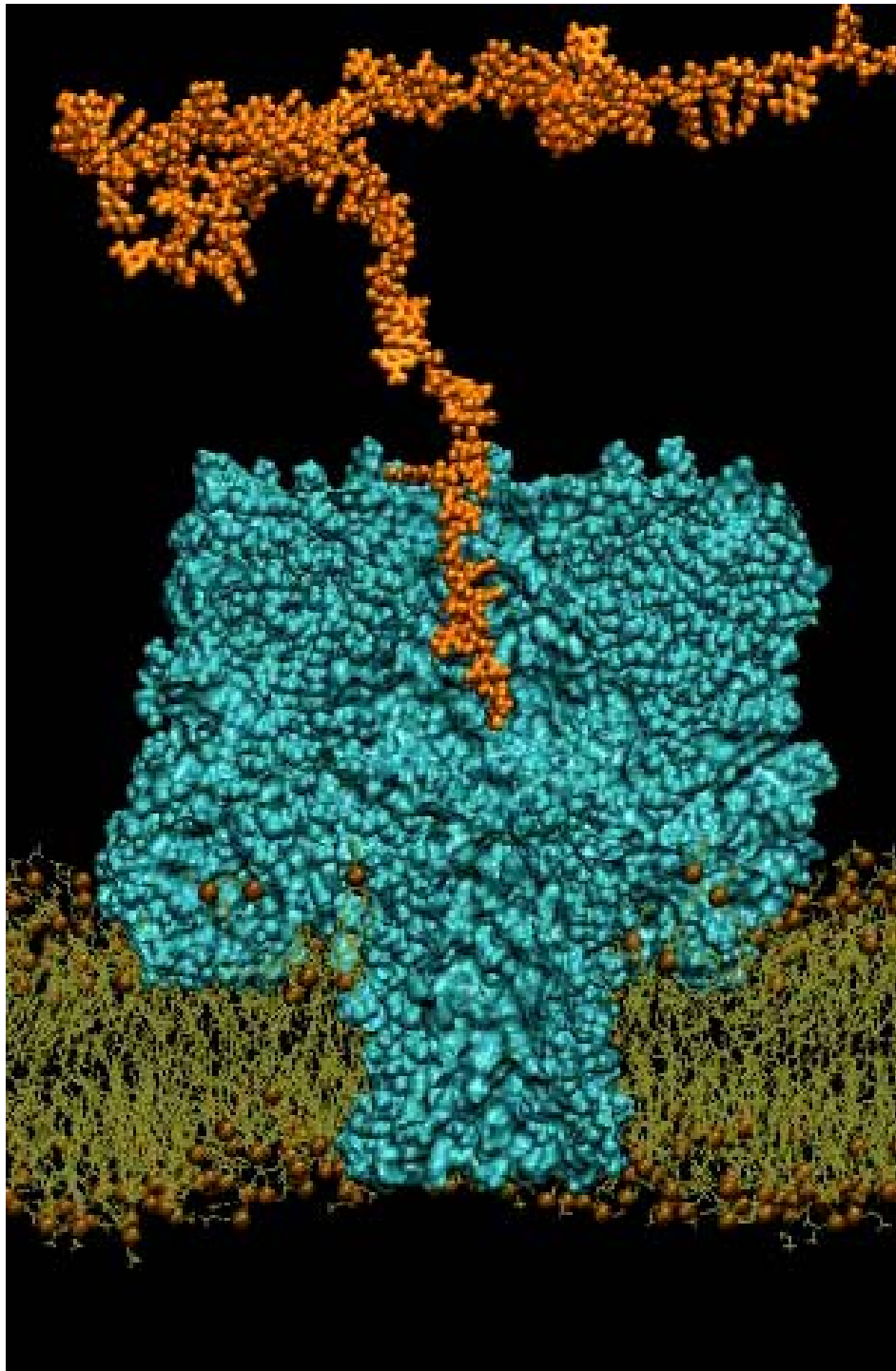


Typical polynucleotide-induced events

Lifetime histogram
Lifetime ~ polymer length

PCR results

Kasianowicz, J.J., et al. 1996. PNAS **93**, 13770

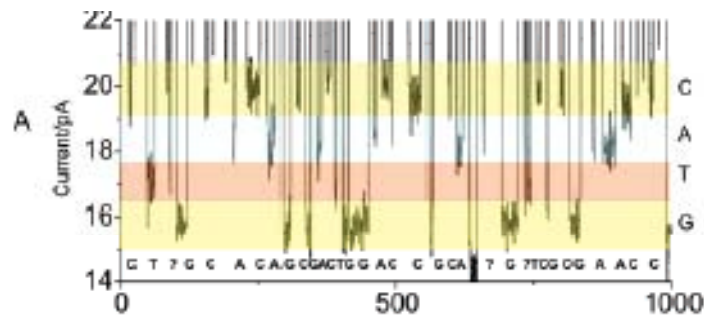
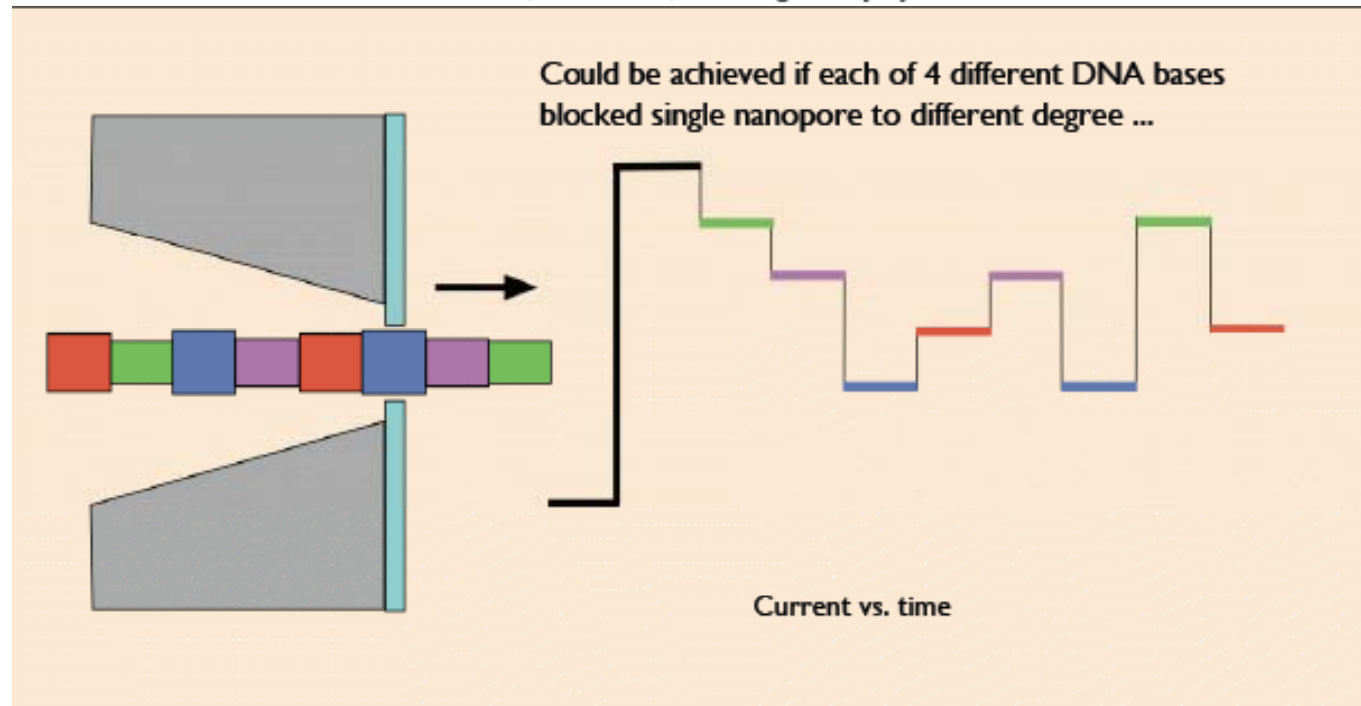


Aleksij Aksimentiev and Klaus Schulten
University of Illinois at UC

Electrophoretically-driven
translocation of a 58-
nucleotide DNA strand
through the transmembrane
pore of alpha-hemolysin.

Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter

Yann Astier, Orit Braha, and Hagan Bayley*



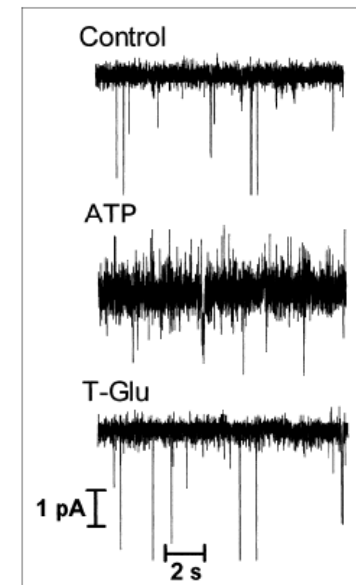
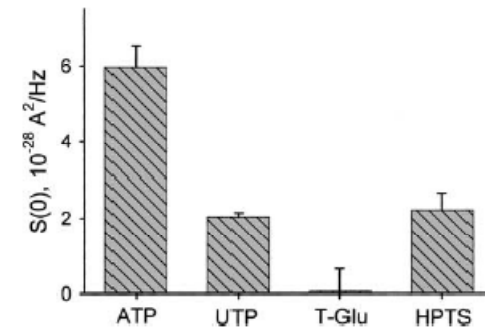
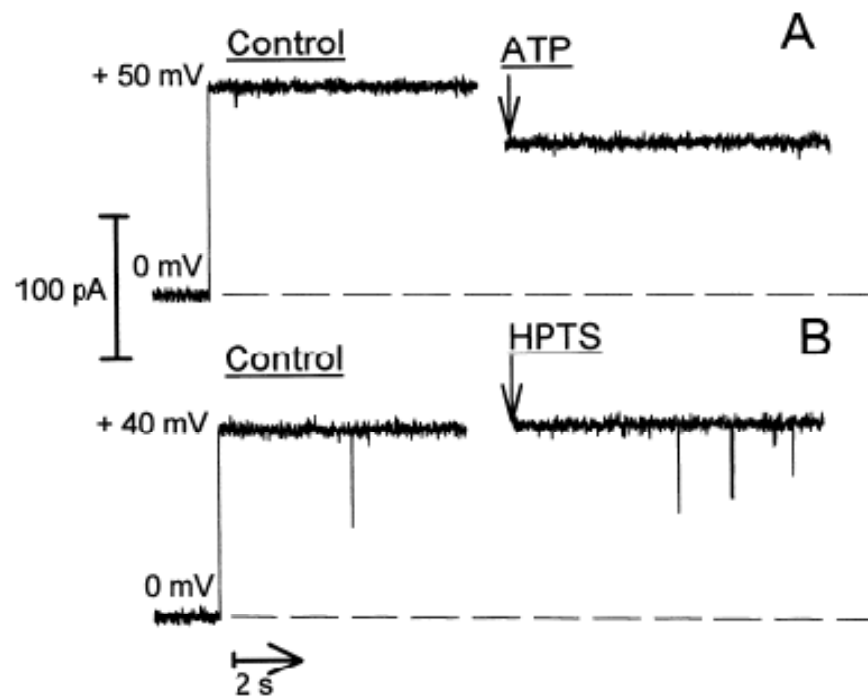
J. AM. CHEM. SOC. 2006, 128, 1705–1710 ■ 1705

Los canales iónicos pueden diferenciar entre metabolitos naturales y moléculas sintéticas similares

J. Membrane Biol. 184, 147–156 (2002)

VDAC Channels Differentiate between Natural Metabolites and Synthetic Molecules

T.K. Rostovtseva¹, A. Komarov^{2,3}, S.M. Bezrukov^{2,3}, M. Colombini¹



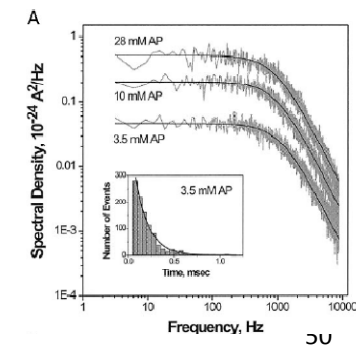
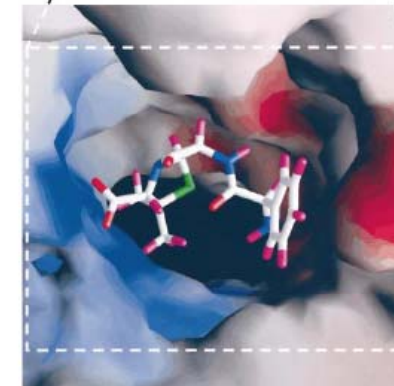
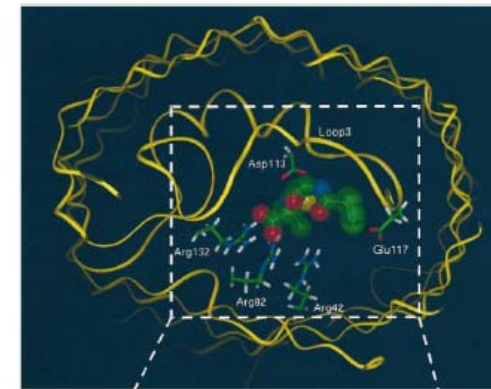
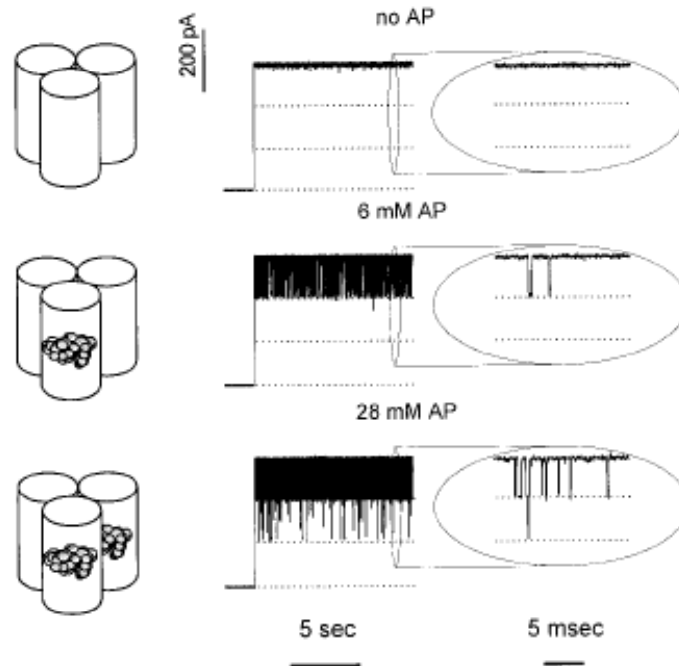
Translocacion Antibióticos

Designed to penetrate: Time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores

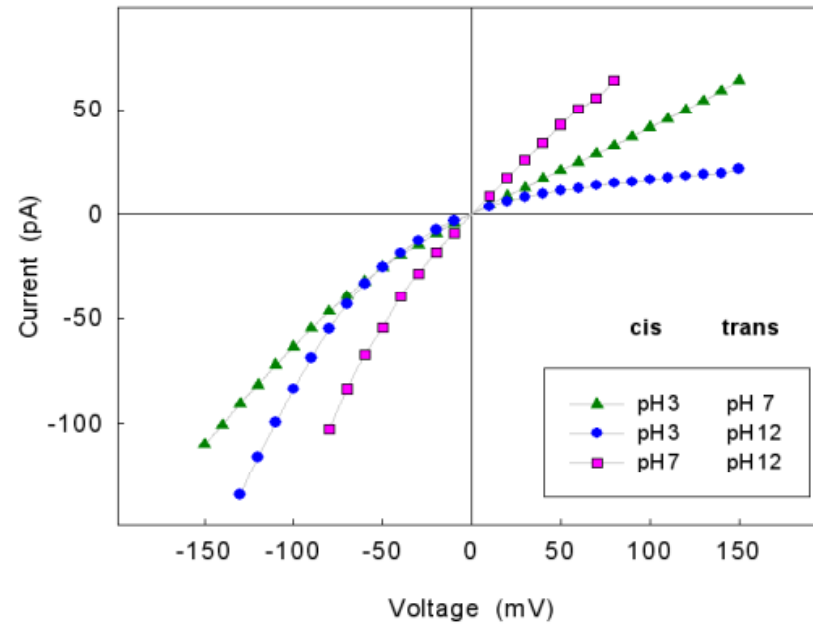
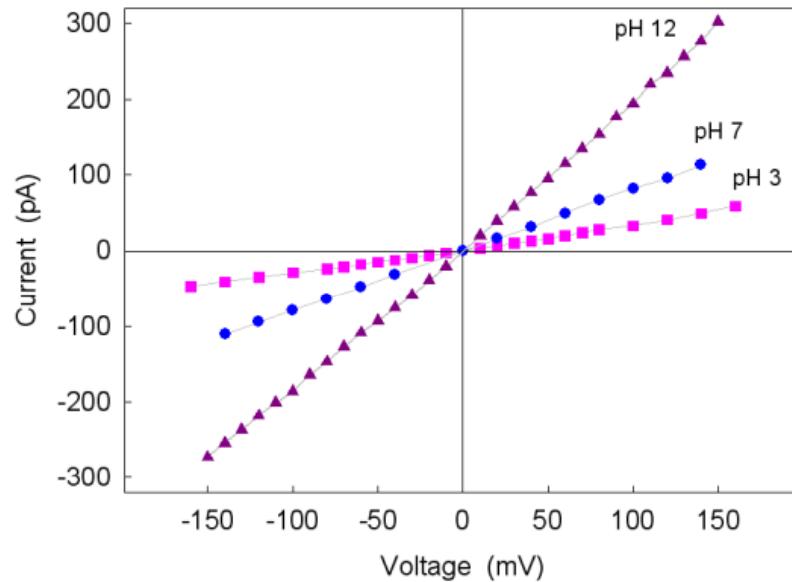
Ekaterina M. Nestorovich*, Christophe Danelon†, Mathias Winterhalter†, and Sergey M. Bezrukov**§

*Laboratory of Physical and Structural Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Building 9, Room 1E-122, Bethesda, MD 20892-0924; †Institut Pharmacologie et Biologie Structurale, 31 077 Toulouse, France; and **St. Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina 188350, Russia

PNAS | July 23, 2002 | vol. 99 | no. 15 | 9789–9794



Diodo Líquido biológico controlado mediante el pH

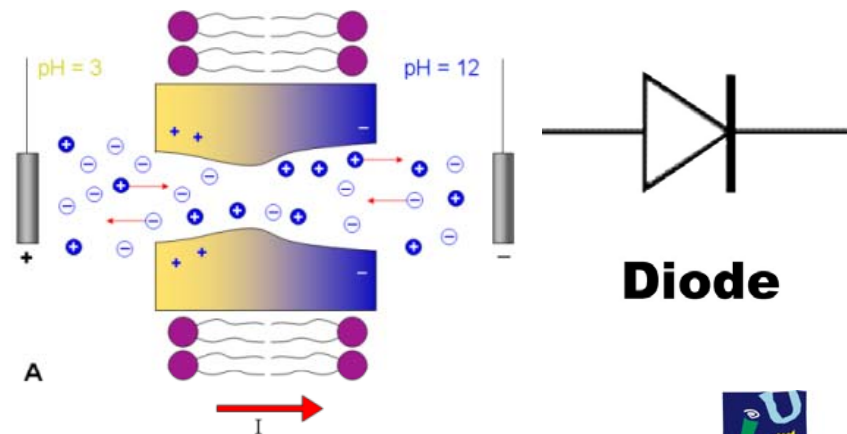


J. Phys. Chem. B **2006**, *110*, 21205–21209

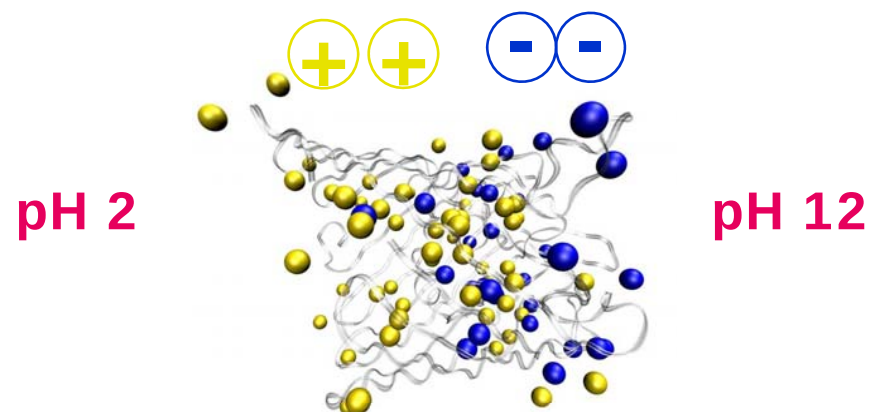
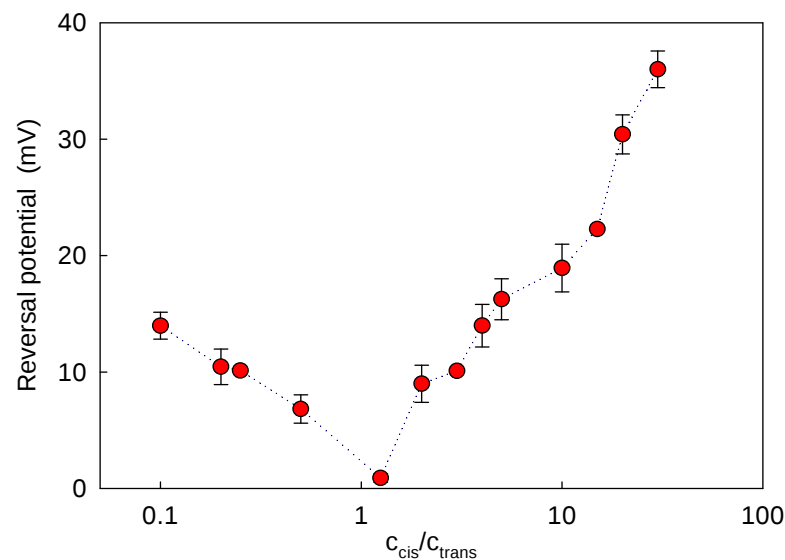
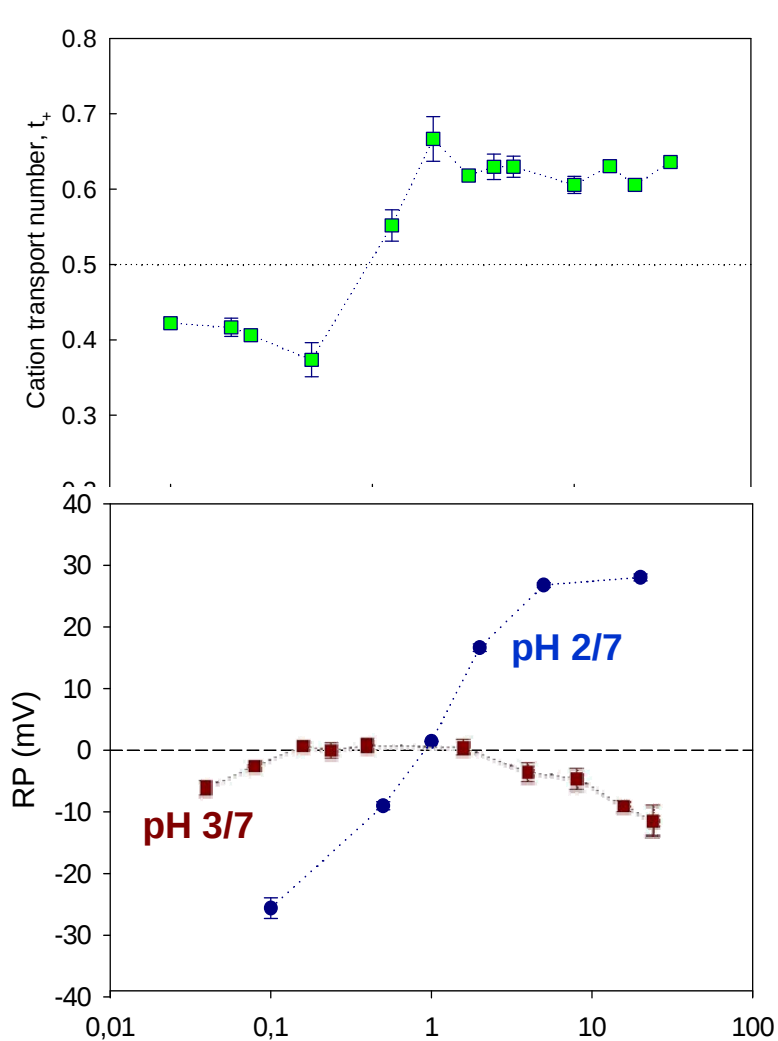
A pH-Tunable Nanofluidic Diode: Electrochemical Rectification in a Reconstituted Single Ion Channel

Antonio Alcaraz,[†] Patricio Ramírez,[‡] Elena García-Giménez,[†] M. Lidón López,[†] Andreu Andrio,[†] and Vicente M. Aguilera^{*,†}

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



Diodo Líquido biológico con selectividad direccional

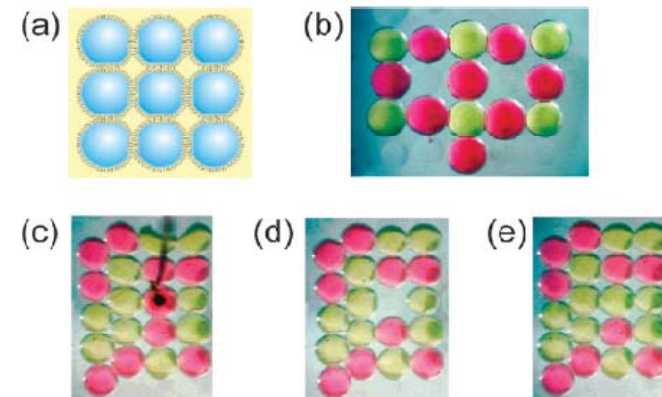
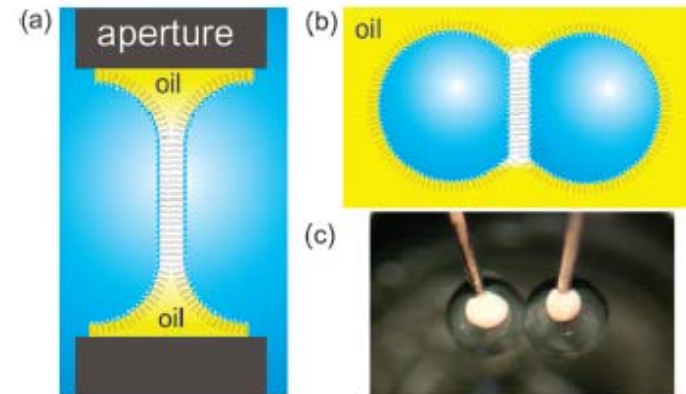
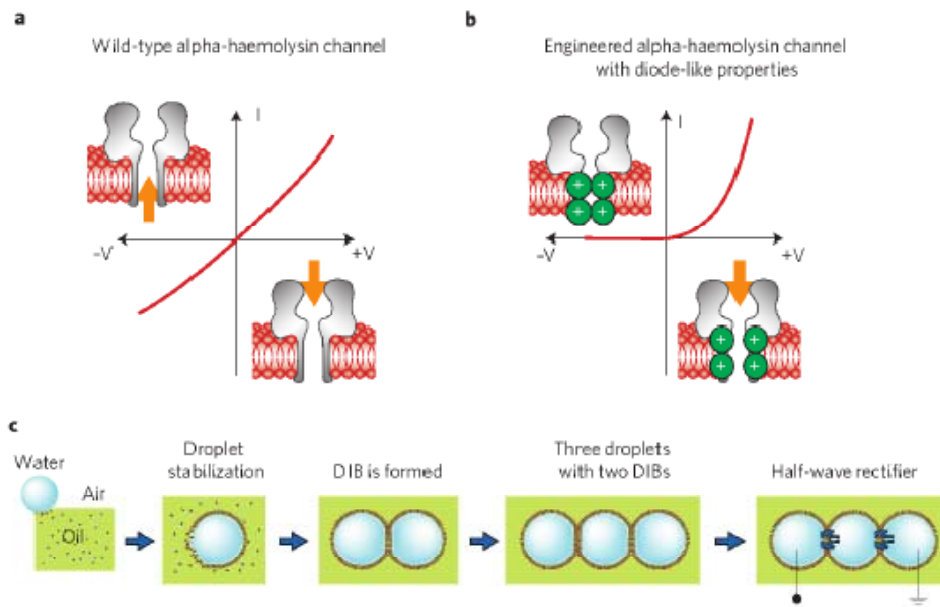


E. García-Giménez, A. Alcaraz, V.M. Aguilera and P. Ramírez. J. Membr. Sci. 331 (2009) 137.

Droplet interface bilayers

Hagan Bayley,* Brid Cronin, Andrew Heron, Matthew A. Holden,†
William L. Hwang, Ruhma Syeda, James Thompson and Mark Wallace

Mol. BioSyst., 2008, 4, 1191–1208 | 1191



NANOBIOTECHNOLOGY

A fluid approach to simple circuits

Using simple components such as oil, salt water, lipids and proteins, plus routine genetic engineering techniques, it is possible to create simple nanofluidic circuits.

Vicente M. Aguilera and Antonio Alcaraz

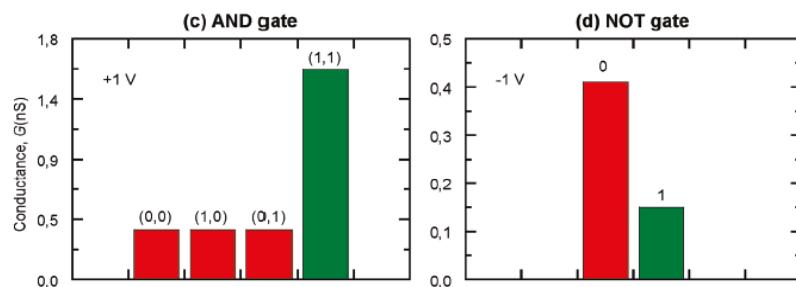
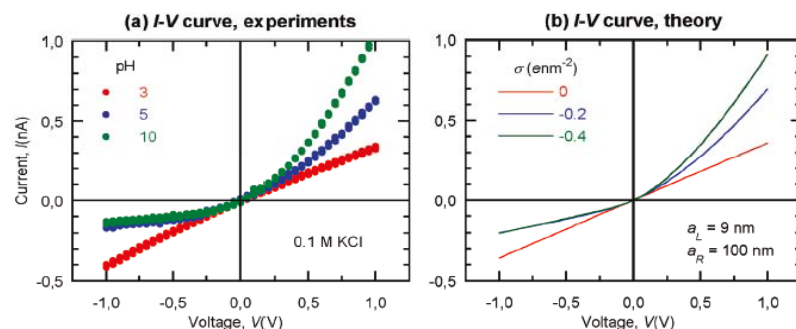
NATURE NANOTECHNOLOGY | VOL 4 | JULY 2009 |

Logic Gates Using Nanofluidic Diodes Based on Conical Nanopores Functionalized with Polyprotic Acid Chains

Langmuir 2009, 25(20), 11993–11997

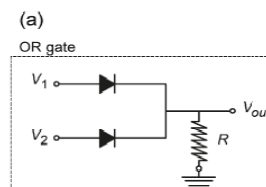
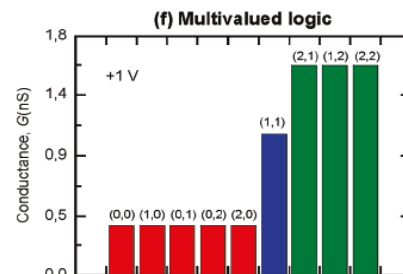
Mubarak Ali,[†] Salvador Mafe,[‡] Patricio Ramirez,^{*§} Reinhard Neumann,^{||} and Wolfgang Ensinger[†]

[†]Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Material-u. Geowissenschaften, Fachgebiet Chemische Analytik, Petersenstrasse 23, D-64287 Darmstadt, Germany, [‡]Departament de Física de la Terra i Termodinàmica, Universitat de València, E-46100 Burjassot, Spain, [§]Departament de Física Aplicada, Universidad Politécnica de Valencia, E-46022 Valencia, Spain, and ^{||}GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Planckstrasse 1, D-64291 Darmstadt, Germany

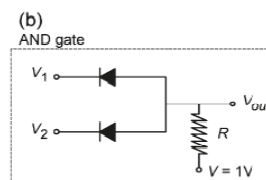


(e) Multivalued logic (truth table)

Entry	Input A	Input B	Output
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0	1	0
4	0	2	0
5	2	0	0
6	1	1	1
7	2	1	2
8	1	2	2
9	2	2	2



V_1 (V)	V_2 (V)	$V_{out}(\text{pH } 5)$ (V)	$V_{out}(\text{pH } 10)$ (V)
-0.1 (0)	-0.1 (0)	-0.06 (0)	-0.07 (0)
-0.1 (0)	2.0 (1)	1.08 (1)	1.28 (1)
2.0 (1)	-0.1 (0)	1.08 (1)	1.28 (1)
2.0 (1)	2.0 (1)	1.47 (1)	1.58 (1)



V_1 (V)	V_2 (V)	$V_{out}(\text{pH } 5)$ (V)	$V_{out}(\text{pH } 10)$ (V)
-0.1 (0)	-0.1 (0)	0.22 (0)	0.17 (0)
-0.1 (0)	2.0 (1)	0.55 (0)	0.42 (0)
2.0 (1)	-0.1 (0)	0.55 (0)	0.42 (0)
2.0 (1)	2.0 (1)	1.58 (1)	1.53 (1)

- **Interdisciplinariedad:** La Biofísica es una disciplina amplia y diversa, que recoge conocimientos de la Biología, Química y Física.
- **Complejidad y Diversidad:** de la estructura atómica a la función biológica
- **Instrumentación:** Desarrollo de técnicas experimentales pioneras
- **Modelización:** Necesidad de combinar diferentes niveles de resolución
- **Aplicación:** Los canales iónicos se usan como “biosensores” para detectar iones, pequeñas moléculas, proteínas y diversos polinucleótidos
- **Oportunidad:** canales iónicos y nanotecnología

Laboratorio de Biofísica Molecular. Universitat Jaume I, Castellón

**Vicente M. Aguilera
Elena García-Giménez
M. Lidon López
Andreu Andrio
Marcel Aguilera Arzo
María Queralt-Martín**



**Laboratory of Physical and Structural Biology, NICHD.
National Institutes of Health. Bethesda, Maryland. USA**

**Sergey M. Bezrukov
Ekaterina Nestorovich**



Departamento de Termodinámica. Universitat de Valencia

**Salvador Mafé
Javier Cervera
José A. Manzanares**



Departamento de Física Aplicada. Universitat Politècnica de Valencia

Patricio Ramírez



Biophysics Group (UJI) - Mozilla Firefox

Fitxer Edita Visualitza Història Adreces d'interès Eines Ajuda

http://www.gm.uji.es/

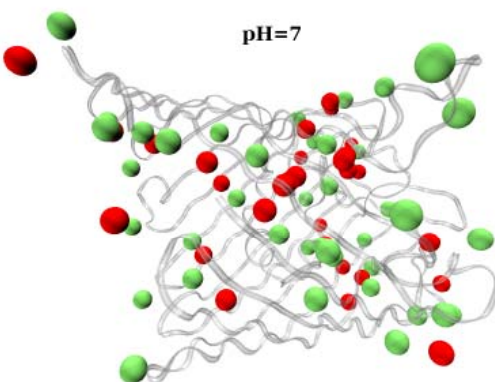
McAfee SiteAdvisor

Biophysics Group (UJI)

 **Biophysics Group of the University Jaume I** 

HOME RESEARCH MEMBERS LOCATION LINKS PICTURES PUBLICATIONS

RESEARCH



pH=7

Biophysics Group
Departament de Física
Universitat Jaume I
Campus de Riu Sec
12080 Castelló de la Plana (Spain)
Fax. +34 964 729218

Updated April 13th, 2009.

<http://www.gm.uji.es/>

http://www.gm.uji.es/research.html

Inicio Bandeja de entrada - Mo... Microsoft PowerPoint - [...] Physics and biology-1.do... Memoria_Alcaraz0302.d... MCT-10 Biophysics Group (UJI...

15:06