

UCH-FC
DOC-B
C 387

**MECANISMOS DE TRANSPORTE Y SELECTIVIDAD IONICOS
EN EL CANAL DE HEMOCIANINA**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología.**

**Facultad de Ciencias
Universidad de Chile**

por

XIMENA CECCHI URRUTIA

Santiago, Enero de 1985

Profesor Patrocinante: Dr. Osvaldo Alvarez A.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado de la candidata

Ximena Cecchi Urrutia

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 28 de Enero de 1985.

Patrocinante de Tesis

Dr. Osvaldo Alvarez



Comisión informante de Tesis

Dra. Rosa Devés



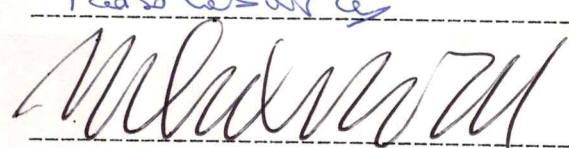
Dra. Cecilia Hidalgo



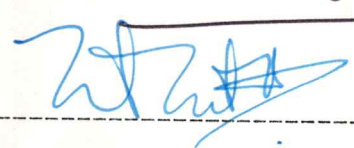
Dr. Pedro Labarca



Dr. Mario Luxoro



Dr. Tito Ureta



AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Osvaldo Alvarez por la paciencia y el cariño con que llevó a cabo su labor de maestro.

No puedo olvidar la satisfacción que significó realizar este trabajo gracias a la calidez humana y a la ayuda de tanta gente: entre ellos quiero recordar con especial cariño a Daniel Wolff, Osvaldo Alvarez, Juan Espinoza y Ricardo Bull. También mis agradecimientos más profundos a Ramón Latorre, Cecilia Vergara y Juan Bacigalupo por su invaluable amistad. Y a nuestros estudiantes, Carmen Alcayaga, Alfredo Villarroel, David Naranjo, Andrés Oberhausser y Ricardo Delgado, cuya llegada al laboratorio refrescó nuestras vidas.

Agradezco a Juan Valencia, Anita Godoy y Carmen Sandoval por su constante disposición a ayudarme y apoyarme con su amistad y con su ejemplo.

También mi gratitud a todos mis amigos que no pueden estar hoy en Chile, entre los cuales quiero mencionar con especial cariño a Mitzy Canessa y a Siegmund Fischer, que me iniciaron en este mundo de la Ciencia.

A Mario Luxoro, gracias por su cariño a gritos y su permanente presencia de maestro y amigo.

Por último, mi mayor gratitud a mi familia: mi esposo Daniel, mis padres y mis hijos, Verónica, Cecilia y Matías, cuyo cariño y paciencia infinitos han sido y son el más grande apoyo de mi vida.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	x
INTRODUCCION GENERAL	1
Mecanismos de transporte	2
Selectividad iónica	4
Objetivos generales	6
INTRODUCCION	7
METODOS	11
I. Experimentos diseñados para estudiar la selectividad del canal	16
II. Experimentos diseñados para estimar las dimensiones del canal	17
III. La corriente en función del potencial aplicado	20
IV. Experimentos diseñados para probar el modelo	25
RESULTADOS	28
Conductancia del canal único	28
Selectividad del canal	33
Estimación de las dimensiones del canal	37
Curvas corriente voltaje	50
Mediciones rápidas de corriente	55
El modelo de tres barreras	59
Los parámetros energéticos en función de la concentración iónica	64

Curvas corriente voltaje para todos los cationes alcalinos	67
Pruebas del modelo de tres barreras	69
Resumen de resultados	80
DISCUSION	81
La hemocianina como un canal asimétrico	81
La hemocianina como una enzima de transporte	83
Conductancia y permeabilidad en canales descritos por modelos de barreras	89
La contribución del potencial de superficie	95
Tamaño del poro del canal de hemocianina	99
¿Qué parte de la molécula de hemocianina forma el canal?	100
Representación pictórica del canal de hemocianina	102
La selectividad del canal de hemocianina	105
Relación entre las energías del ión y la estructura del canal	111
El potencial que surge debido a la carga de imagen	116
APENDICE	118
Ecuaciones generales de flujo	118
REFERENCIAS	122

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Conductancia máxima y $K_{0.5}$ del canal de hemocianina a los cationes alcalinos	32
TABLA 2. Razones de permeabilidad medidas por potenciales bioiónicos en membranas tratadas con hemocianina	36
TABLA 3. Conductancia del canal de hemocianina a varios cationes monovalentes	44
TABLA 4. Potenciales de flujo producidos por gradientes de noelectrolitos en membranas tratadas con hemocianina	49
TABLA 5. Parámetros energéticos del modelo de tres barreras para potasio	63
TABLA 6. Parámetros de energía del modelo de tres barreras para el canal de hemocianina	68
TABLA 7. Razones de permeabilidad entre cationes alcalinos y potasio en el canal de hemocianina	75
TABLA 8. Relación entre razones de conductancia, permeabilidad y constantes de disociación para los cationes alcalinos en el canal de hemocianina	94
TABLA 9. Distancias de Debye para distintas concentraciones de sulfato de potasio	98
TABLA 10. Diferencias entre energías de interacción alcalinos-agua y alcalinos con un ligando dipolar	115

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema de la cámara de bicapas	14
FIGURA 2. Esquema de las conexiones eléctricas de la cámara de bicapas	15
FIGURA 3. Esquema del circuito para suprimir las corrientes capacitivas transitorias	23
FIGURA 4. Incorporación de hemocianina en una bicapa lipídica	30
FIGURA 5. Relación conductancia concentración del canal de hemocianina a los distintos cationes alcalinos	31
FIGURA 6. Registro del potencial biiónico en una membrana tratada con hemocianina	35
FIGURA 7. Rapidez de incorporación de hemocianina a bicapas	40
FIGURA 8. Efecto de la concentración de hemocianina y del pH sobre la rapidez de formación de canales en bicapas de lípidos	41
FIGURA 9. Registro de potenciales de flujo en una membrana tratada con hemocinina	48
FIGURA 10. Curvas corriente-voltaje instantáneas para potasio	52
FIGURA 11. Curvas corriente-voltaje instantáneas para litio	53
FIGURA 12. Curvas corriente-voltaje del canal de hemocianina para todos los cationes alcalios	54
FIGURA 13. Rectificación instantánea	58
FIGURA 14. El modelo de tres barreras	61

FIGURA 15. Ajuste de las curvas corriente-voltaje del canal de hemocianina usando el modelo de tres barreras	62
FIGURA 16. Efecto de la carga de superficie de la bicapa sobre los parámetros del modelo del canal de hemocianina	66
FIGURA 17. Relación corriente-voltaje en el canal de hemocianina incorporado en una membrana sin carga de superficie	71
FIGURA 18. Relación conductancia-concentración en el canal de hemocianina	73
FIGURA 19. Potenciales biiónicos en membranas tratadas con hemocianina que separan soluciones de sulfato de potasio y de litio	76
FIGURA 20. Competencia entre potasio y litio en el canal de hemocianina	79
FIGURA 21. Esquema de un perfil de energía con un sitio de ligamen y dos barreras de energía	85
FIGURA 22. Esquema de un modelo de barreras para el paso de un ión a través de un canal que contiene dos sitios de ligamen separados por una barrera central	88
FIGURA 23. Esquema general de un modelo de sitios de ligamen y barreras en serie	93
FIGURA 24. Representación gráfica del canal de hemocianina	104
FIGURA 25. Esquema que representa la interacción de un catión monovalente con el agua y con otro ligando dipolar	109
FIGURA 26. Energía de unión entre los diferentes cationes alcalinos y un sitio hipotético de carga -1 , referida a la del cesio	110

RESUMEN

La hemocianina es una proteína plasmática de alto peso molecular que se encuentra en moluscos y crustáceos. La de moluscos está formada por un conjunto de alrededor de 20 subunidades de peso molecular cercano a 500.000. La hemocianina de *Megatura crenulata* interactúa con bicapas artificiales de lípidos y forma canales iónicos selectivos a cationes. El objetivo central de esta tesis es proponer un mecanismo que explique las características de transporte y selectividad del canal de hemocianina, que son:

1. La conductancia del canal es una función hiperbólica de la concentración de iones. Esto descarta que el mecanismo de conducción sea la electrodifusión en un poro acuoso y sugiere un mecanismo en el cual los iones se ligan a sitios saturables.
2. La relación entre corriente y voltaje no es lineal, como predice la electrodifusión. La conductancia es una función complicada del potencial aplicado.
3. La selectividad del canal a los cationes alcalinos es diferente si se determina con medidas de conductancia que si se hace midiendo los potenciales que surgen al poner soluciones de diferentes iones a ambos lados del canal. También se observa que la selectividad cambia con la concentración de iones y con el potencial aplicado.

Todas estas características de transporte y selectividad en el canal de hemocianina permiten postular un modelo de conducción, que, en términos generales, consiste en suponer que los iones, cuando pasan por el canal, se encuentran con uno o más sitios de ligamen y con barreras de energía que deben saltar en su paso. Los sitios y las barreras se encuentran en la zona donde cae el potencial aplicado, de donde surge la dependencia que muestra la conductancia con el potencial. La presencia de sitios de ligamen explica la saturación de la conductancia con la concentración de iones.

El modelo que mejor describe los resultados contiene dos sitios de ligamen y tres barreras de energía y sólo acepta un ión a la vez dentro del canal. Una vez planteado el modelo, se escriben las ecuaciones que definen a las constantes cinéticas del paso de los iones a través de las barreras, que dependen de las energías de los iones tanto en los sitios de unión como en las barreras. Estas energías se ven afectadas por el potencial aplicado dependiendo del lugar donde se encuentren dentro del canal. La corriente que pasa por el canal en estado estacionario es función de todas las constantes cinéticas, y, por ende, de las energías libres de los iones en los sitios y en las barreras.

Ajustando a los valores experimentales de corriente en función del voltaje curvas calculadas con el modelo por medio de un método de ajuste no lineal, se obtuvo como resultado las energías libres para todos los iones alcalinos dentro del canal. Con estos valores se pudo reproducir las curvas de conductancia en función de la concentración de iones y las razones de permeabilidad entre los cationes alcalinos y el potasio. El modelo predice que los iones compiten por los sitios dentro del canal, lo cual fue

corroborado experimentalmente. Como dato adicional que apoya la hipótesis que el canal acepta un solo ión a la vez, se encontró que la formación del canal involucra a una sola subunidad de la molécula de hemocianina y que las dimensiones del canal son pequeñas: no más de 0,24 nm de radio y 1 nm de longitud.

El modelo es, entonces, capaz de explicar satisfactoriamente las observaciones iniciales y sus predicciones se corroboran experimentalmente. Esto permite aceptarlo y utilizar los valores de energía obtenidos para sacar conclusiones acerca de las características de los sitios de unión.

El modelo reproduce bien las características de selectividad del canal. Las secuencias de energía encontradas para los iones alcalinos en los sitios de ligamen permiten postular que estos poseen grupos cargados capaces de generar campos eléctricos fuertes, parecidos al grupo carbonilo o al dipolo del agua. Las barreras de energía representarían zonas alejadas de los sitios de ligamen, donde el campo generado por sus grupos cargados se ha debilitado con la distancia.

ABSTRACT

Hemocyanin is a high molecular weight plasma protein present in the blood of molluscs and crustaceans. In molluscs it is formed by 20 subunits each with molecular weight around 500,000. Hemocyanin from *Megatura crenulata* interacts with artificial bilayer membranes to form cationic-selective ionic channels. The central goal of this thesis is to propose a mechanism that explains the transport and selectivity characteristics of this channel, which are:

1. Channel conductance is a hyperbolic function of ion concentration. This fact discards electrodiffusion across an aqueous pore as a possible mechanism and suggests that ions bind to saturable sites in the channel.
2. A non-linear function between current and voltage is found, which is not the prediction of electrodiffusion. Conductance is a rather complicated function of potential.
3. Channel selectivity to alkali cations is different when measured from conductance or permeability ratios. The selectivity changes with cation concentration and with applied potential, both facts in disagreement with electrodiffusion through an aqueous pore.

All these transport and selectivity characteristics allow to postulate a general model in which ions pass through the channel binding to one or more binding sites and "jumping" through energy barriers. The binding sites

and the energy barriers are placed in the zone where the electric potential falls, this explaining the dependence of the conductance on the potential. The presence of binding sites explains the saturation of the current with the ion concentration.

The model that best describes the experimental results contains two binding sites and three energy barriers, accepting only one ion at a time. The kinetic constants which describe the passage of ions through the energy barriers are functions of the ions free energies in the binding sites and in the barriers. They are affected by the electric potential in an extent which depends on the sites location inside the channel. Steady state current passing through the channel is a function of all kinetic constants, and so, on the free energy of ions inside the channel.

The free energy of ions at the binding sites and at the energy barriers can be estimated by fitting to the experimental current to voltage curves, theoretical curves calculated with the model, by using a least square non-linear fitting procedure. The best energy parameters obtained were able to reproduce the experimental conductance vs concentration relationship and the permeability ratios. The model predicts ion competition inside the channel, which was experimentally corroborated. As an additional support to the single channel occupancy postulated before, it was found that a single hemocyanin subunit participates in the channel formation and that the pore is small: no more than 0.24 nm in radius and 1 nm in length.

The model is able to explain the basic experimental observations and its predictions can be tested experimentally. It can be accepted as a good model for the mechanism of ion transport through this channel and the ion energies found can be used to draw some conclusions about the characteristics of the binding sites.

Selectivity characteristics are well reproduced by the model. The energy sequences found for the binding of alkali cations to channel sites allow to postulate that these sites have charged groups able to produce strong electric fields, such as carbonyl groups or dipoles similar to water. Energy barriers could be represented as distant zones where the sites electric field weakens with distance.

INTRODUCCION GENERAL.

Todas las membranas celulares tienen una estructura básica común que es una bicapa lipídica cuya continuidad está interrumpida por moléculas de proteínas (Singer y Nicholson, 1972). Estas proteínas probablemente interactúan hidrofóbicamente con los lípidos porque tienen una estructura terciaria que expone aminoácidos hidrofóbicos hacia el exterior, permitiendo la interacción con los lípidos y esconde sus zonas polares hacia el interior de la molécula. La presencia de estas proteínas permite postular que puedan ser responsables de la permeabilidad de la membrana a los iones, que podrían pasar a través de ellas: actuarían como canales iónicos. La naturaleza proteica de los canales iónicos ha sido demostrada indirectamente en axón (Rojas y Luxoro, 1963) y directamente en el canal aislado de Na (Weigele y Barchi, 1982), en el canal de K de retículo sarcoplasmático (Miller y Rosenberg, 1979), en el receptor de acetilcolina (Karlin, A., 1980), por citar algunos ejemplos.

Generalmente los canales iónicos no son estructuras estáticas sino que están constantemente cambiando de permeabilidad. Algunos canales, por ejemplo, el del receptor de acetilcolina en la placa motora de los músculos, fluctúa entre dos estados, abierto y cerrado (Schindler y Quast, 1980). Estas transiciones generan fluctuaciones de la corriente que pasa por la membrana, de las cuales se puede calcular la corriente que pasa por un canal individual (Neher y Sakmann, 1976).

La conductancia de los canales que han sido detectados en diferentes preparaciones van desde 5 - 10 pS para canales de Na y Ca (Huang *et al*, 1984, Ehrlich *et al*, 1984) hasta 300 pS para algunos canales de K de membranas de músculo de vertebrados (Latorre *et al*, 1982,). Estos últimos son, además, altamente selectivos a potasio.

Los canales iónicos son selectivos, no son compartidos como vías de paso por todos los iones (Latorre y Alvarez, 1981; Latorre y Miller, 1983). La selectividad de los canales explica algunos importantes fenómenos celulares, como por ejemplo, los potenciales de membrana que se observan en todas las células.

Mecanismos de transporte.

Es fácil imaginar al canal como un cilindro lleno de la solución que comunica un lado y otro de la membrana. Los iones pasarían por ese canal por mecanismos similares a los que los hacen moverse en el agua. En ese caso, se puede calcular el radio que debería tener el poro para dar cuenta de las conductancias encontradas experimentalmente. En este tipo de cálculo, se llega a que un poro de unos 100 pS de conductancia en una solución 0,1 M y del largo igual al espesor de la bicapa (5 nm), tendría un radio de unos 0,4 nm (Latorre y Miller, 1983). Es decir, no habría base para explicar la selectividad entre Na ($r= 0,095$ nm) y K ($r= 0,13$ nm) en términos del radio del poro.

Además de la selectividad, el modelo del cilindro lleno de agua tiene dificultades para explicar otros fenómenos observados. Por ejemplo, la

conductancia de la mayoría de los canales se satura con la concentración iónica (Miller, 1983, Latorre y Miller, 1983). Evidentemente, este comportamiento es inexplicable si es que los iones se mueven por simple difusión, ya que en este caso, la teoría predice que el flujo difusivo es una función lineal de la concentración (Goldman, D. E., 1943).

Por otra parte, para un poro acuoso el flujo de iones (corriente eléctrica) es una función lineal del potencial aplicado (Goldman, D. E., 1943). En muchos canales las curvas corriente-voltaje no son lineales, lo cual hace que la teoría de electrodifusión sea insuficiente para explicar el mecanismo del transporte (Coronado *et al*, 1980, White y Miller, 1979).

Por último, estos canales no son sólo selectivos a los iones, sino que pueden ser bloqueados por iones que no pasan a través del canal o que lo hacen a velocidades muy bajas. En otras palabras, ocurren fenómenos de competencia entre los iones por el canal (Coronado y Miller, 1980; Coronado *et al*, 1980; Miller, 1983; White y Miller, 1981). Este comportamiento no tendría por qué observarse en un poro que dejase pasar libremente iones por difusión acuosa a través de él.

Una visión alternativa de un canal es imaginarlo como una enzima de transporte. Desde el punto de vista termodinámico y cinético, lo es, ya que es un "catalizador" que está disminuyendo la barrera de energía de activación desde unas 60 kcal/mol para la bicapa desnuda (Parsegian, 1969), a menos de 10 kcal/mol, que es el valor que podría dar cuenta de las conductancias iónicas encontradas experimentalmente. Mirados de esta manera, los canales quedarían representados por proteínas que tienen en su interior zonas que

actúan como "sitios de ligamen" a los iones. El mecanismo de transporte sería, entonces, en todo similar a los mecanismos de reacción enzimática desarrollados por los bioquímicos: presenta saturación, competencia e inhibición por análogos, es decir, por otros iones.

En síntesis, el canal se visualiza como una secuencia de sitios, representados por "valles" de energía libre para el ión, y de barreras de energía que el ión debe saltar en su paso por el canal.

Selectividad iónica

La selectividad de un canal visualizado como una secuencia de sitios y barreras estará dada por las diferencias de energía de interacción entre los diferentes iones y el canal. Cómo explicar que iones tan semejantes como, por ejemplo, sodio y potasio puedan interactuar en forma cuantitativamente diferente con el mismo sitio?

La energía de interacción entre un ión y el ligando de un sitio es de origen electrostático y depende de la magnitud del campo eléctrico generado tanto en torno al sitio como en torno al ión que se liga. Los iones pequeños siempre van a interactuar más fuertemente con sitios cargados, ya que la magnitud del campo eléctrico depende inversamente del radio del ión. Si consideramos, por ejemplo, a los cationes alcalinos, las energías de interacción serán mayores para el litio ($r = 0,06$ nm) y menores para el cesio ($r = 0,17$ nm).

Un ión que se prepara a pasar a través de un canal debe abandonar

parcialmete el agua que lo rodea. Suponiendo que remplace una de sus aguas de hidratación por el ligando del sitio, la "preferencia" por el sitio estará dada por la diferencia entre la energía de hidratación y la de interacción con el sitio. En aquellos sitios que generan campos eléctricos fuertes, la diferencia entre la energía de unión al sitio y al agua es máxima para el litio y decrece a medida que aumenta el radio iónico. Cuando el sitio tiene una baja fuerza de campo, ocurre lo contrario: la secuencia de selectividad comienza con el cesio y decrece hasta llegar al litio. En situaciones de energías de campo intermedias, se generan secuencias de selectividad intermedias, que no son monotónicas con el radio de los iones; de todas las posibles secuencias imaginables sólo 11 pueden surgir de este modelo y son las únicas que se encuentran experimentalmente (Eisenman, 1965).

La aplicación de estos conceptos al transporte de iones a través de canales permite generar una explicación para el fenómeno de selectividad, si se acepta el mecanismo de transporte a través de un sistema de sitios de ligamen y barreras en serie. La simple interacción electrostática de los iones y el canal genera un discriminador iónico, no por su tamaño sino por la magnitud del campo eléctrico generado a su alrededor.

Objetivos generales.

El objetivo del presente trabajo es explicar, en términos de un modelo de barreras de energía, las propiedades de transporte y selectividad de bicapas de lípidos tratadas con una proteína formadora de canales, la hemocianina. A pesar que esta proteína no está formando canales iónicos en los organismos en que se encuentra, los canales iónicos que forma cuando interactúa con bicapas artificiales de lípidos tienen una conductancia dramáticamente dependiente del potencial eléctrico y esta conductancia se satura con la concentración iónica (Latorre *et al.*, 1975). Estas membranas artificiales tienen igual estructura a la que creemos que tienen las membranas biológicas y particularmente el canal de hemocianina, tiene características de conducción comparables a las de muchos canales de membranas biológicas, por lo que hacen al sistema un buen modelo. Tiene la gran ventaja sobre estos últimos que es muy fácil incorporarlo a la bicapa y que se obtiene comercialmente en forma pura. Por estas razones, es un sistema muy adecuado para desarrollar modelos de transporte que más adelante pueden ser fácilmente aplicados a canales de interés biológico.

La mayor parte de los resultados que aparecen en esta tesis se obtuvieron entre 1980 y 1983 y dieron origen a una serie de publicaciones (Cecchi *et al.*, 1981, 1982, 1984). En esta tesis se presenta una recopilación de ellos y se discuten globalmente desde la perspectiva general de los mecanismos que explican el transporte y la selectividad de los canales iónicos.

INTRODUCCION

La hemocianina es una proteína que se encuentra disuelta en el plasma de crustáceos y moluscos. Es un transportador de oxígeno, de alto peso molecular (alrededor de 1.000.000 en crustáceos y 10.000.000 en moluscos), que contiene cobre en su molécula. Cuando la hemocianina se incubaba a $\text{pH} > 8$, se disocia en subunidades (Van Bruggen *et al*, 1962, 1963) y el tamaño de la subunidad depende de la especie de donde se obtenga la hemocianina, siendo este entre 75.000 en crustáceos y alrededor de 500.000 en moluscos (Senozan, 1976).

Cuando se agrega hemocianina de lapa (*Megatura crenulata*) a la solución acuosa que baña un lado de una bicapa de lípidos, se produce un aumento de la conductancia iónica de la bicapa (Pant y Conran, 1972). Alvarez *et al* (1975) demostraron que la conductancia aumentaba a saltos discretos, es decir, formaba canales iónicos, y la conductancia del canal se saturaba con la concentración iónica de la solución. El canal es selectivo a los cationes alcalinos (Alvarez *et al*, 1977), pero su selectividad no sigue la secuencia de las movilidades de los iones alcalinos en agua: el litio presenta una permeabilidad del 40% de la esperada de su movilidad en agua. Una membrana que contiene muchos canales de hemocianina muestra una curva corriente-voltaje en estado estacionario que se aleja mucho de la linealidad, en el intervalo de potenciales mayores que 50 mV. La corriente que pasa por el canal a potenciales negativos

mayores que 50 mV es siempre mucho mayor que la que se mide a potenciales positivos de la misma magnitud. Cuando el potencial se cambia desde cero a un potencial positivo, la corriente se relaja hasta su valor de estado estacionario por medio de un proceso que tarda segundos o minutos. Sin embargo, si se observa la corriente a tiempos muy cortos después de aplicado el potencial, cuando no ha habido tiempo para que ocurra la relajación, la conductancia a potenciales positivos es todavía mucho menor que a potenciales negativos, y las curvas corriente-voltage siguen siendo no-lineales (Latorre *et al*, 1975).

Estas curvas corriente-voltage contienen información relativa a los mecanismos de transporte y estructura del canal. El objetivo de este trabajo es revelarla, para lo cual se necesita construir un modelo. La hipótesis de trabajo propone al canal como una secuencia de dos sitios de ligamen que presenta el canal a los iones, separados de las soluciones acuosas y entre sí por barreras de energía. Un solo ión es permitido a la vez dentro del canal, restricción que surge inicialmente de consideraciones electrostáticas que señalan que la cercanía de dos iones del mismo signo dentro del canal es energéticamente desfavorable (Lauger, 1973). Este modelo de barreras de energía permite escribir las ecuaciones que describen el flujo iónico en función de la concentración iónica y del potencial aplicado, y cuyos parámetros son los valores de la energía libre del ión en los sitios de ligamen y en las barreras.

Es necesario realizar una serie de mediciones tendientes a apoyar la idea inicial que el canal puede aceptar un solo ión en un momento determinado. Estas son:

a) Establecer cuál especie es la que forma el canal (la subunidad o el agregado) y cuántas de ellas intervienen. La idea es que si fuera un molécula de varios millones de peso molecular sería difícil imaginar que aceptara un solo ión.

b) Estimar el diámetro del canal. La manera de hacerlo es determinando su conductancia a cationes monovalentes de diferentes tamaños. Aquel catión de menor diámetro que produzca una conductancia igual a cero da una medida aproximada del tamaño del canal. Experimentos de medidas de coeficientes de reflexión osmóticos usando noelectrolitos de diferentes tamaños dan una medida independiente del diámetro del canal. La idea es que si el canal es muy ancho no se puede suponer que aloje un solo ión.

c) Estimar la longitud del canal para lo cual se determina la magnitud del potencial eléctrico generado cuando se establece una gradiente osmótica con no electrolitos que no pasen a través de la membrana. La idea es que si el canal es muy largo no es posible suponer que todo el mecanismo de transporte pueda ser modelado por el salto de una sola barrera.

Una vez comprobado que las dimensiones del canal no son contradictorias con la hipótesis de un sólo ión a la vez, se construirá el modelo para lo cual se necesita:

1.- Hacer curvas corriente voltaje experimentalmente a diferentes concentraciones de iones.

2.- Escribir ecuaciones cinéticas que den cuenta de las curvas corriente-

voltage medidas. Obtener, por ajuste de curvas, los parámetros energéticos de los sitios de unión y de las barreras del canal, para diferentes iones.

3.- El conjunto de parámetros encontrados de esa manera se utiliza para hacer algunas predicciones que se comprueban mediante experimentos independientes y que son:

- a) Curvas conductancia-concentración en un amplio rango de concentraciones.
- b) Competencia entre iones que se conducen a velocidades diferentes.
- c) Curvas corriente-voltaje en membranas hechas de diferentes clases de lípidos, que tienen diferentes potenciales de superficie.
- d) Razón de permeabilidades a los diferentes cationes alcalinos, que surge de la medición de potenciales bioiónicos.

Una vez que se comprueba la validez del modelo, analizar los valores de las energías encontradas en términos de la interacción de los iones con la hemocianina, para obtener información sobre el tipo de ligandos que constituyen el canal.

METODOS

Todos los experimentos se realizaron incorporando el canal de hemocianina en bicapas de lípidos. Para ello, primero se forma la bicapa en una cámara de de dos compartimientos separados por una lámina de teflón con una perforación central de 0.3 mm de diámetro (ver Figura 1). Ambos compartimientos se llenan con 3 ml de una solución que consiste rutinariamente en la sal de sulfato de cualquiera de los cationes monovalentes empleados, tamponada con Tris-Cl 5 mM, pH 7,0. Sobre las soluciones se forma una monocapa agregando 10 - 20 μ l de una solución de lípidos de frejol de soya (Asolectin, Sigma Chemical Co.) y colesterol (Sigma Chemical Co.) (1/1, razón molar) en hexano con 5% de decano. Subiendo los niveles de las soluciones mediante jeringas, se consigue formar una bicapa de lípidos en el agujero que queda separando ambos compartimientos (Takagi *et al*, 1965 y Montal y Mueller, 1972). Mediante un par de electrodos de Ag/AgCl se conecta un lado de la cámara a un generador de funciones comandado por un computador digital (lado *trans*) y el otro a un conversor corriente-voltage que mantiene a potencial cero a este lado de la cámara (lado *cis*). Con este par de electrodos es posible fijar la diferencia de potencial y registrar la corriente que circula a través de la membrana. El conversor produce un potencial a su salida (V_0) proporcional a la corriente que pasa por la membrana, con una sensibilidad de 1 nA/V. La salida del conversor es amplificada y puede entregarse a un osciloscopio, un sistema de adquisición de datos comandado

por el computador o a un registrador de papel (ver Figura 2).

La formación de la bicapa se visualiza aplicando un tren de pulsos cuadrados de potencial eléctrico de poca amplitud (alrededor de 1-10 mV) y mirando la corriente que sale del amplificador en el osciloscopio. Estos pulsos generan corrientes capacitivas transitorias en la membrana en el borde inicial y el borde final de los pulsos, de cuya integral se puede calcular la capacidad eléctrica de la membrana en formación. El diámetro del agujero se determinó con un microscopio provisto de un ocular graduado para calcular el área de la membrana. Todos los experimentos se realizaron en bicapas cuya capacidad era mayor que $0,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. La conductancia basal de la membrana así formada se determinaba midiendo la corriente que circulaba a través de ella al aplicar un potencial constante de -50 mV. Todos los experimentos se realizaron en bicapas cuya conductancia basal fuera inferior a 20 pS.

Una vez hecha la bicapa, se agregaba la hemocianina en el lado *cis* de la cámara, hasta alcanzar concentraciones finales que variaban entre 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, según fuera necesario. La hemocianina (99% pura) se mantuvo disuelta en KCl 0,5 M. La incorporación de la hemocianina se visualizaba como un incremento de la corriente que pasa a través de la bicapa al aplicar un potencial estable de -50 mV. Dependiendo de la sensibilidad del amplificador de corriente a la salida del conversor, este incremento aparecía como un aumento gradual de la corriente (con baja sensibilidad) o se resolvía en saltos discretos de corriente, canales individuales (con alta sensibilidad).

Se define como corriente positiva a aquella producida por un flujo de

caciones desde el lado *trans* hacia el lado *cis* (en respuesta a un potencial positivo aplicado al lado *trans*).

(El texto continúa después de la Fig. 2).

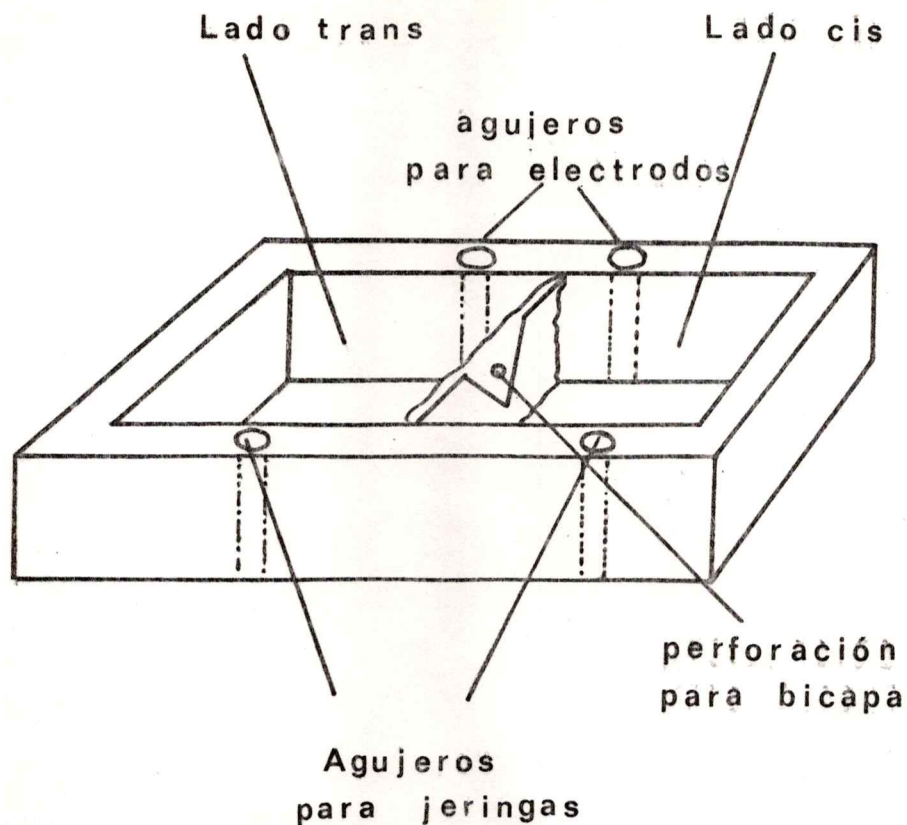


FIGURA 1

Esquema de la cámara de bicapas.

La cámara consiste de dos compartimientos de 3 ml cada uno separados por un septum rígido de teflón al cual se adhiere una lámina de teflón delgado con una perforación central. Las paredes de la cámara están perforadas y los agujeros se conectan con la solución interior para colocar las jeringas y los electrodos (ver Texto).

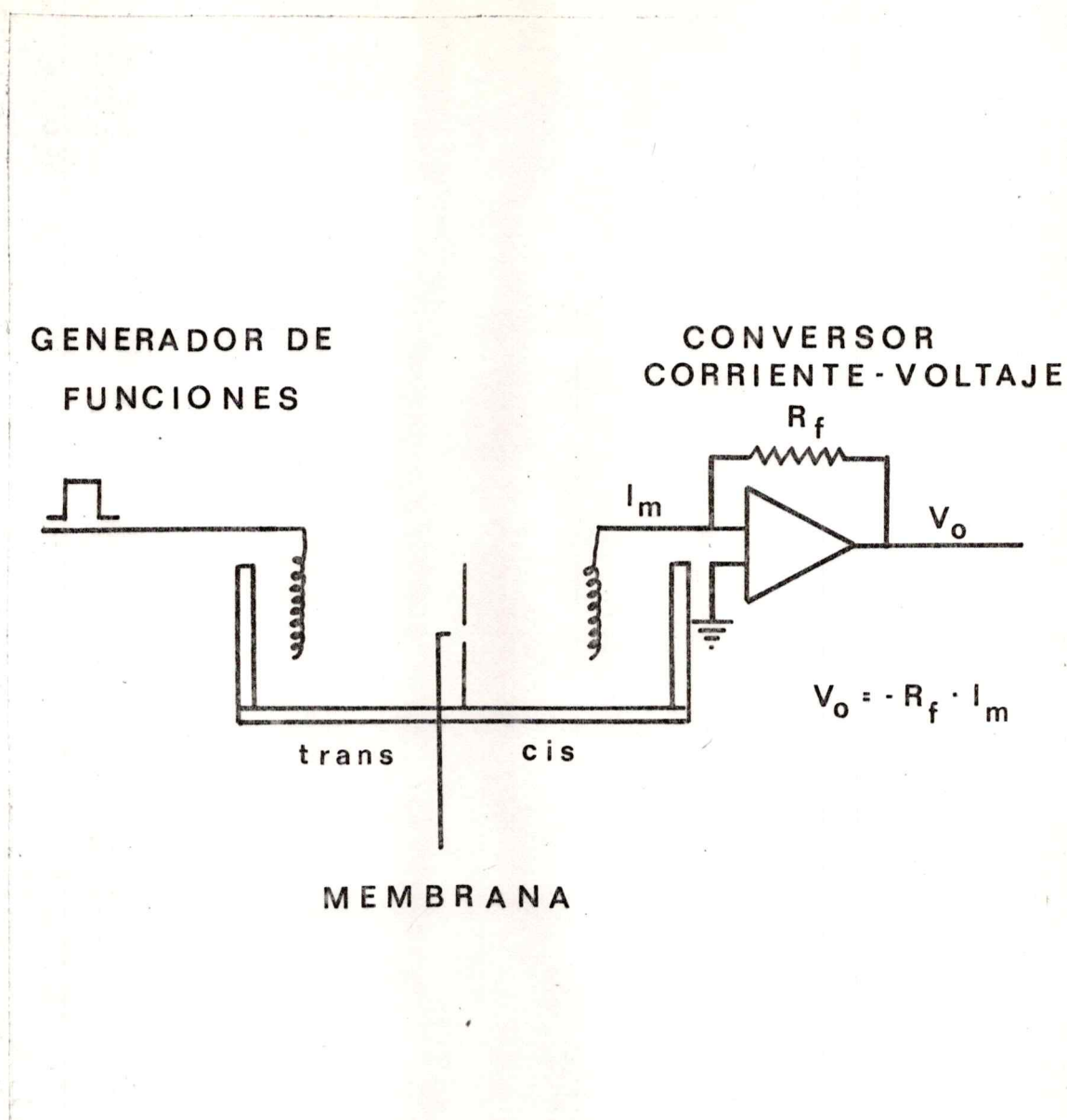


FIGURA 2

Esquema de las conexiones eléctricas de la cámara de bicapas.

Los electrodos son de Ag/AgCl. El generador de funciones consiste en un conversor digital-análogo comandado por un computador digital, construído en el laboratorio para tal efecto.

I. Experimentos diseñados para estudiar la selectividad del canal.

La selectividad se estudió midiendo la conductancia del canal único en todos los cationes alcalinos y calculando la razón de permeabilidades a partir de la medición del potencial que se genera cuando la bicapa separa soluciones de la misma concentración, pero diferente catión (potencial biiónico).

1. Medición de la conductancia del canal único.

Una vez agregada la hemocianina, se mantuvo el potencial constante de -50 mV y se esperó registrando continuamente la corriente, para lo cual se utilizó un amplificador con sensibilidad de 10 pA/V. La señal era filtrada a la salida con un filtro pasa bajo de 50 Hz y con el sistema era posible medir corrientes tan chicas como 2 pA. La incorporación de canales se visualizaba como saltos en el nivel de corriente. Un sistema de adquisición de datos comandado por el computador estaba encargado de almacenar los resultados en cinta magnética o disco para posterior medida de la amplitud de la corriente de estos saltos. El estudio de conductancia del canal único se hizo para todos los iones alcalinos y amonio en concentraciones de las sales de sulfato de 10 , 20 , 50 , 100 , 250 y 500 mM.

2. Medición de potenciales biiónicos.

En estos experimentos, la bicapa se formó separando soluciones 50 mM de sulfato de potasio a un lado y del sulfato de cualquiera de los iones alcalinos en el otro, a la misma concentración. Un interruptor conectaba el electrodo del lado *cis* con el conversor corriente-voltaje

descrito en la Fig. 2 o con un electrómetro de alta impedancia de entrada (Keithley Inst. Co. Modelo 602) para medir la diferencia de potencial entre ambos compartimientos. Después de agregar la hemocianina, se medía la corriente y se esperaba hasta que se hubieran incorporado a lo menos 100 canales; entonces, la membrana se conectaba al electrómetro y se medía el potencial que surgía en estas condiciones de circuito abierto. Luego se rompía la membrana para medir el potencial en ausencia de ella, debido a posibles diferencias de potencial entre los electrodos. Se hicieron las correcciones necesarias debidas al potencial de juntura que surge al romper la membrana cuando los dos cationes en estudio tienen diferente movilidad en agua.

II. Experimentos diseñados para estimar las dimensiones del canal.

El tamaño del canal se estimó determinando la especie química que lo forma (la subunidad, de peso molecular 800.000 o el agregado, de peso molecular mayor que 10.000.000) y estimando directamente el diámetro y la longitud del poro. Esto último se llevó a cabo midiendo la conductancia a cationes orgánicos grandes y determinando la magnitud del potencial de flujo producido por gradientes de noelectrolitos de tamaños conocidos.

1. Determinación de la especie que forma el canal.

Se llevó a cabo midiendo la rapidez de incorporación de canales en función de la concentración de hemocianina, en membranas de glicerolmonooleato : colesterol 1/1 (razón molar). La hemocianina se preincubó a pH 7,0 ó 8,5, según el caso, durante 24 horas antes de

agregarla a la bicapa. Las medidas se hicieron en KCl 0,1 M, Tris-Cl 5 mM, pH 7,0. Una vez formada la membrana, se agregaba hemocianina y la membrana se sometía a un tren de pulsos de -10 mV de amplitud y 5 s de duración, con una frecuencia de uno por minuto, durante por lo menos, 10 minutos. La corriente que circulaba a través de la bicapa se amplificaba con un sistema de baja sensibilidad (100 pA/V) y se registraba en papel. Las mediciones se hicieron a varias concentraciones de hemocianina. De los gráficos de corriente en función del tiempo se calculaba la rapidez de incorporación de hemocianina a la bicapa en función de la concentración de hemocianina.

2. Estimación del diámetro por medición de la conductancia en cationes monovalentes grandes.

Se determinó la conductancia del canal único en membranas hechas en soluciones de sulfato de los siguientes cationes orgánicos: hidroxilamonio (OH-NH_3^+), etanolamonio ($\text{CH}_2\text{OH-NH}_4^+$), tetrametilamonio ($(\text{CH}_3)_4\text{-N}^+$), y Tris (tris-hidroximetil-aminometano). La medición de la conductancia se hizo de la misma forma descrita anteriormente para los cationes alcalinos (ver punto I1).

3. Estimación del diámetro y la longitud por medición de potenciales de flujo.

Se midieron los potenciales de flujo generados por gradientes osmóticos de no electrolitos de diferentes tamaños en membranas con hemocianina. La membrana se formaba separando soluciones asimétricas: el

lado *cis* contenía sulfato de potasio 50 mM y el *trans*, esta misma solución más el noelectrolito en concentraciones de alrededor de 2 M. Los noelectrolitos usados fueron: glucosa, urea, acetamida y formamida. La hemocianina se agregaba al lado *cis*. Cuando se habían incorporado más de 100 canales, la cámara se conectaba a un electrómetro de alta impedancia (de la misma forma descrita anteriormente para la medición de potenciales biiónicos en el punto I2), y se medía el potencial a través de la membrana. Luego, la membrana se rompía y se medía el potencial en ausencia de ella para restar posibles diferencias de potencial entre los electrodos. Se tomaban muestras de la solución de noelectrolito para determinar su osmolaridad en un osmómetro de presión de vapor (Wescor Inc., UT, modelo 5100 B, gentileza del Dr. José Valencia). También se midió el potencial de dilución generado por la permeabilidad de la bicapa al agua, determinando el potencial en bicapas tratadas con valinomicina. Este último potencial se restó a aquel medido en presencia de hemocianina (ver explicación de este punto en Resultados).

Los potenciales de flujo fueron utilizados para estimar tanto el diámetro como la longitud del poro. El diámetro se estima directamente conociendo el diámetro del noelectrolito más pequeño que muestra un coeficiente de reflexión menor que uno. La longitud se puede calcular de la magnitud del potencial generado por noelectrolitos que no pasan por el canal de acuerdo a Rosenberg y Finkelstein, 1978.

III. La corriente en función del potencial aplicado.

1. Curvas corriente-voltaje instantáneas.

En los experimentos descritos hasta ahora, el factor temporal de la medición no era importante: solamente se quería medir la amplitud de la corriente en estado estacionario, sin importar el tiempo que demoraba en establecerse la corriente a través de la membrana. Los potenciales usados hasta ahora han sido siempre negativos y menores que 50 mV : a estos potenciales, la conductancia del canal es constante en el tiempo.

En los experimentos que describiré a continuación, diseñados para estudiar la relación corriente-voltaje instantánea, se recorrerá el intervalo de potenciales entre ± 250 mV. Está demostrado que a potenciales positivos la conductancia del canal cambia en el tiempo (Latorre *et al*, 1975). Por lo tanto, es necesario hacer las curvas i/V instantáneas midiendo la corriente a tiempos muy cortos después de aplicar el pulso de potencial, para que el proceso que hace cambiar la conductancia a los potenciales positivos no tenga tiempo de ocurrir.

Las curvas se hicieron midiendo la corriente que pasaba a través de una bicapa con muchos canales (de manera que se pudieran medir corrientes del orden de los nanoamperes) cuando se le aplicaban pulsos de amplitud variable y de 1,5 ms de duración. En esta escala temporal, las corrientes capacitivas que surgen en el borde inicial y el borde final de los pulsos interfieren con las corrientes iónicas que interesa medir y, por lo tanto, hay que eliminarlas. Para ello, se aplicaban los mismos pulsos de potencial a la

membrana y a un circuito que la simulaba mediante resistencias y condensadores variables. La corriente capacitiva que salía de ambos sistemas se entregaba a sendos conversores corriente-voltaje cuyas salidas se entregaban a un amplificador diferencial de corriente, de acuerdo al circuito descrito por Alvarez y Latorre, 1978 (Ver Figura 3), que tenía un tiempo de respuesta de 1τ . Para calibrar, se hacía la membrana y se sometía a un tren de pulsos de 100 mV de amplitud con una duración de unos 10 ms y una frecuencia de 100 s^{-1} . La corriente que salía del amplificador diferencial se miraba en un osciloscopio y los valores de R y C del circuito simulador se variaban hasta abolir la corriente capacitiva transitoria en el borde inicial y en el borde final de los pulsos. Con este sistema, se aseguraba que las corrientes a la salida del amplificador diferencial fuesen solamente aquellas debidas al flujo de iones a través de la membrana.

Luego se agregaba hemocianina hasta obtener corrientes del orden de 1 nA y se aplicaba un tren de pulsos de potencial eléctrico que variaban entre -250 y +250 mV, con intervalos de 1 mV, y de 1,5 ms de duración. Un sistema de adquisición de datos comandado por el computador tomaba una muestra de la corriente a la salida del amplificador diferencial a cada potencial, 1 ms después de aplicar cada pulso y la almacenaba en forma digital en una memoria donde podía ser sumada con muestras de experimentos sucesivos.

Con este método se obtuvieron curvas corriente voltaje en membranas hechas con lípidos de frejol de soya en soluciones de sulfato de todos los cationes alcalinos a diferentes concentraciones, y se normalizaron con el

valor de la conductancia del canal único a -50 mV que había sido determinado anteriormente, ya que la magnitud absoluta de la corriente en estos experimentos depende del número de canales en la membrana, variable incontrolable, y por lo tanto, no pueden ser comparadas directamente al cambiar de ión y de concentración.

(El texto continúa después de la Fig. 3).

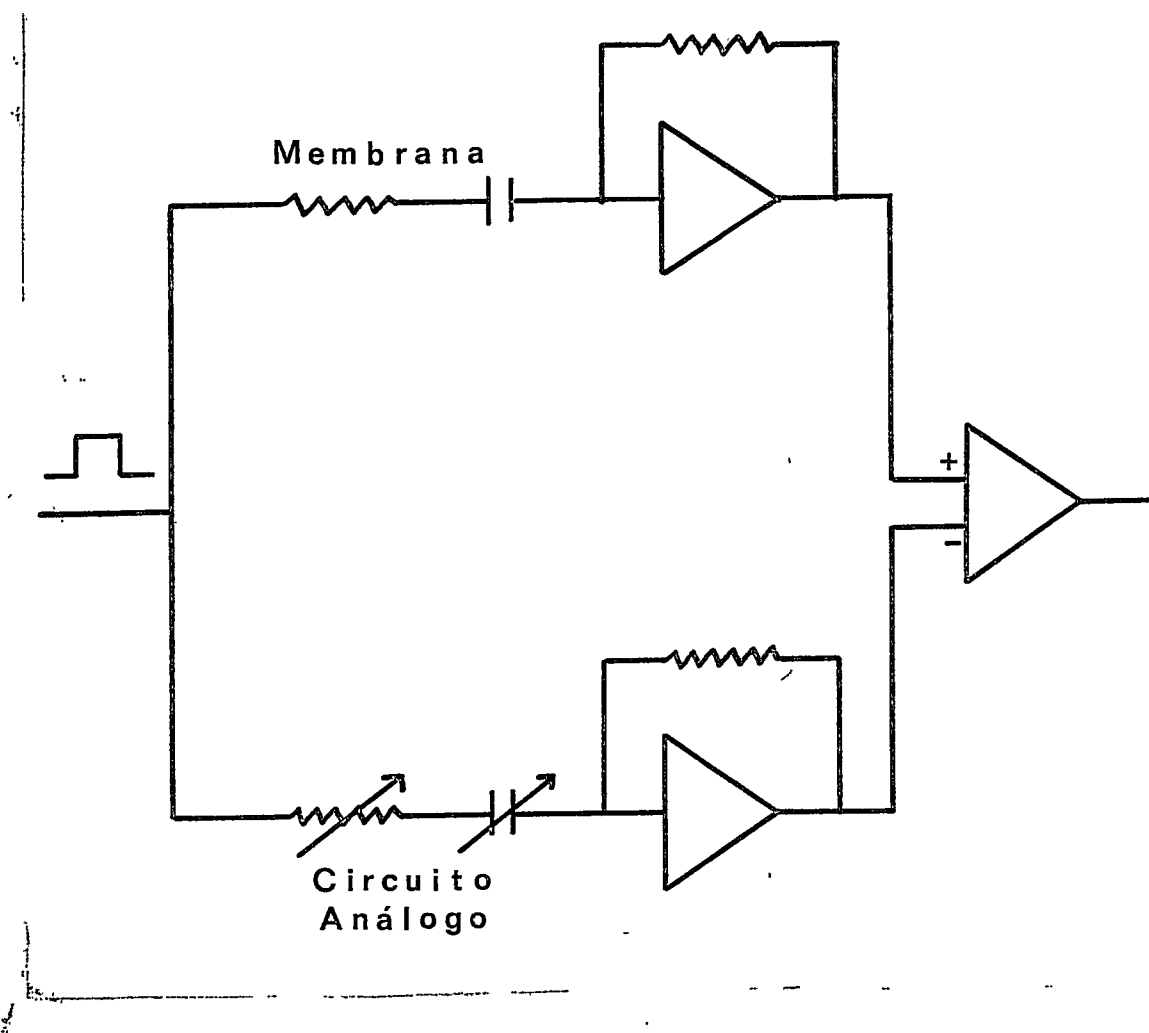


FIGURA 3

Esquema del circuito para suprimir las corrientes capacitivas transitorias.

Tanto la membrana (rama superior) como el circuito que la simula (rama inferior) reciben la misma función de potencial. Antes de agregar la hemocianina, los valores de R y C del circuito análogo se ajustaban hasta que la salida del amplificador diferencial fuera cercana a cero.

2. Mediciones rápidas de corriente.

La no linealidad de las curvas corriente voltaje obtenidas con los experimentos descritos arriba (ver Resultados) hizo necesario que se controlara la posibilidad que aun esos experimentos fuesen demasiado lentos. En otras palabras, era necesario descartar la posibilidad que el canal estuviera cambiando de estructura muy rápidamente en respuesta al potencial aplicado, y que ese cambio de estructura fuera el responsable de la asimetría de la curva corriente voltaje. En este caso, la asimetría de la curva corriente voltaje se debería a una dependencia de la conductancia con el tiempo y no con el potencial aplicado.

Para estudiar la dependencia temporal de la conductancia, una membrana tratada con hemocianina se sometía a trenes de 128 pulsos de 50, 100 ó 175 mV, de polaridad alternada, que duraban 40 μ s cada uno. La corriente se registraba con el mismo sistema para abolir las corrientes capacitivas descrito antes, y era digitalizada por un conversor análogo-digital con una frecuencia de 1 MHz (Biomation, Cupertino, Calif., modelo 610-B) y almacenada en una memoria de 256 palabras de 16 bits. Como los pulsos eran de polaridad alternada, las corrientes positivas y negativas se sumaban sucesivamente en la memoria. Si eran iguales, el resultado final debiera haber sido cero. Si había alguna diferencia entre la corriente positiva y negativa en esta escala temporal, entonces el contenido de la memoria al final de los 128 pulsos contendría el curso temporal de la diferencia entre las corrientes negativa y positiva.

3. Ajuste de las curvas corriente voltaje a un modelo teórico.

Las curvas corriente voltaje obtenidas experimentalmente fueron ajustadas a un modelo propuesto para este canal que establece una función entre la corriente y el potencial descrita por 7 parámetros. Para encontrar el valor de estos parámetros se utilizó el método de ajuste no lineal de Gauss-Newton, modificado por Hartley (Chrisman y Tumolillo, 1969). Un computador digital programado para tal efecto calcula la corriente teórica para cada potencial con un conjunto de estimaciones iniciales de los parámetros. Compara el resultado con el valor experimental e inicia un ciclo de cálculo reiterativo hasta encontrar el mejor ajuste entre el resultado teórico y el experimental, usando como criterio la mínima suma de cuadrados. Esto se repitió para cada ión y dio como resultado conjuntos de los mejores parámetros del modelo que ajustan las curvas corriente voltaje experimentales. El método utilizado da como resultado el parámetro y su desviación standard, además de la suma de cuadrados final.

IV. Experimentos diseñados para probar el modelo.

El modelo permite hacer predicciones de como cambia la conductancia del canal único en función de la concentración del catión, la disminución de la conductancia del canal único cuando dos iones compiten dentro del canal, la corriente en función del potencial en membranas hechas de lípidos con diversa carga de superficie y los potenciales biiónicos generados cuando la membrana separa soluciones de diferentes composiciones iónicas. Las predicciones teóricas calculadas del modelo se compararon con los resultados

de los experimentos correspondientes.

1. Relación conductancia-concentración.

Los experimentos están descritos anteriormente (ver punto I1).

2. Potenciales biiónicos.

Los experimentos están descritos anteriormente (ver punto I2).

3. Curvas corriente voltaje en membranas sin carga superficial.

La medición de la corriente instantánea en función del potencial se hizo de la misma forma descrita antes (en el punto III1), pero utilizando fosfatidiletanolamina en vez de lípidos de frejol de soya para hacer la bicapa. La fosfatidiletanolamina es un lípido neutro al pH de los experimentos, en cambio, los lípidos de frejol de soya tienen fosfatidilserina, cargada negativamente a pH 7,0.

4. Medición de la conductancia del canal único en mezclas de potasio y litio.

La medición se llevó a cabo de la misma forma descrita en el punto I1, pero en mezclas de sulfato de potasio y de litio. Se hicieron tres series de experimentos, con sulfato de potasio 50, 100 y 200 mM y variando la concentración de sulfato de litio entre 10 y 200 mM. Las soluciones eran iguales a ambos lados de la membrana.

5. Potenciales biiónicos en membranas que separan soluciones de diferente concentración.

Las mediciones se hicieron como se describe en el punto I2, pero en membranas que separaban soluciones de sulfato de potasio 14.3 mM en el lado *cis* de soluciones de sulfato de potasio o de litio en concentraciones que variaban entre 2 y 100 mM en el lado *trans*.

RESULTADOS

Cuando se agrega hemocianina a la solución que baña a una bicapa de lípidos, la permeabilidad de la membrana aumenta. Esto se observa como un aumento de la corriente que pasa a través de la bicapa, a potencial eléctrico constante. Si se utiliza un sistema de medición de corriente de alta sensibilidad (que puede medir corrientes del orden de 1 pA), se puede observar que la corriente crece a saltos, todos del mismo tamaño; cada salto es la formación de un canal. El resultado de un experimento típico de incorporación de canales a una bicapa se muestra en la Figura 4. La corriente que circula por el canal que se muestra en la figura es de 20 pA, es decir, están pasando $1,5 \times 10^8$ iones/s. Este número es demasiado alto para postular que la hemocianina ligue iones en solución y luego los transporte a través de la bicapa, como lo hacen compuestos, como la valinomicina o la nonactina, que se han denominado transportadores (carriers). Las velocidades de transporte de iones a través de bicapas tratadas con transportadores son unos tres órdenes de magnitud inferiores (Lauger, 1980) por lo que se postula que la hemocianina forma canales en la bicapa.

Conductancia del canal único.

Cuando se mide la conductancia del canal para los diferentes cationes alcalinos y a diferentes concentraciones se encuentran los resultados que aparecen en la Figura 5. Se observa que la conductancia no es una función

lineal de la concentración iónica sino que es una función hiperbólica, lo que se puede interpretar como que el canal es una estructura que tiene sitios específicos de ligamen para los iones (ver Introducción General). Los puntos experimentales que aparecen en la Figura 5 pueden ser relativamente bien descritos por una función hiperbólica simple, lo cual, de acuerdo a Lauger, 1973, permite concluir que el canal no puede contener más de un ión a la vez. Los parámetros g_m y $K_{0.5}$, conductancia máxima y concentración a la cual se alcanza una conductancia igual a la mitad de g_m , respectivamente, que se obtienen del ajuste de las hipérbolas equiláteras, usando un método de ajuste no lineal para todos los cationes alcalinos están resumidos en la Tabla 1 y se usaron para dibujar las curvas de la Fig. 5.

(El texto continúa después de la Tabla 1).

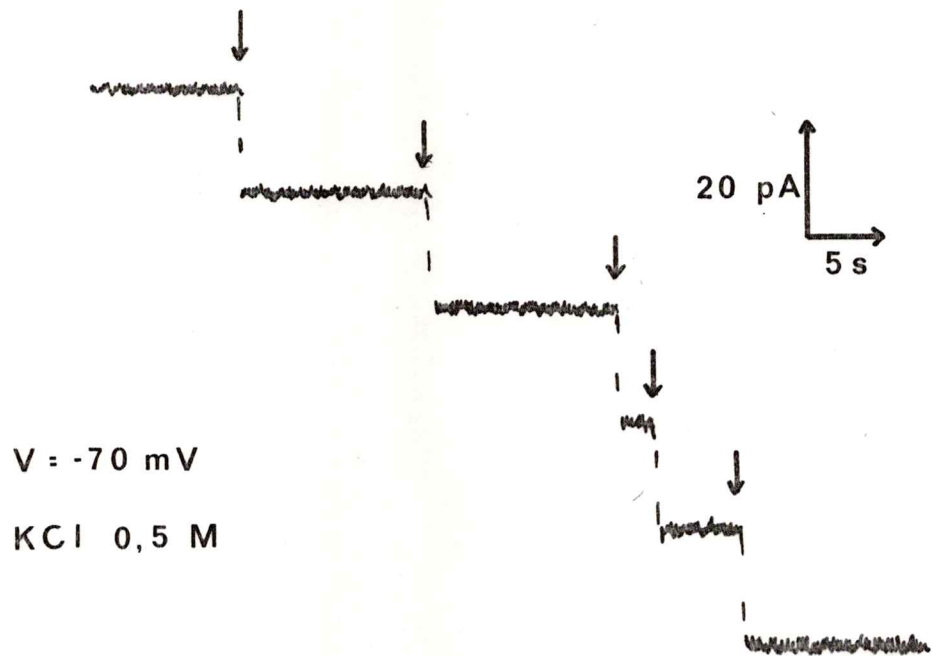


FIGURA 4

Incorporación de hemocianina en una bicapa lipídica.

La membrana se hizo en una solución de KCl 0,5 M, Tris-Cl 5 mM, pH 7. El potencial aplicado es de -70 mV. Las flechas indican los saltos de corriente debidos a la incorporación de los canales.

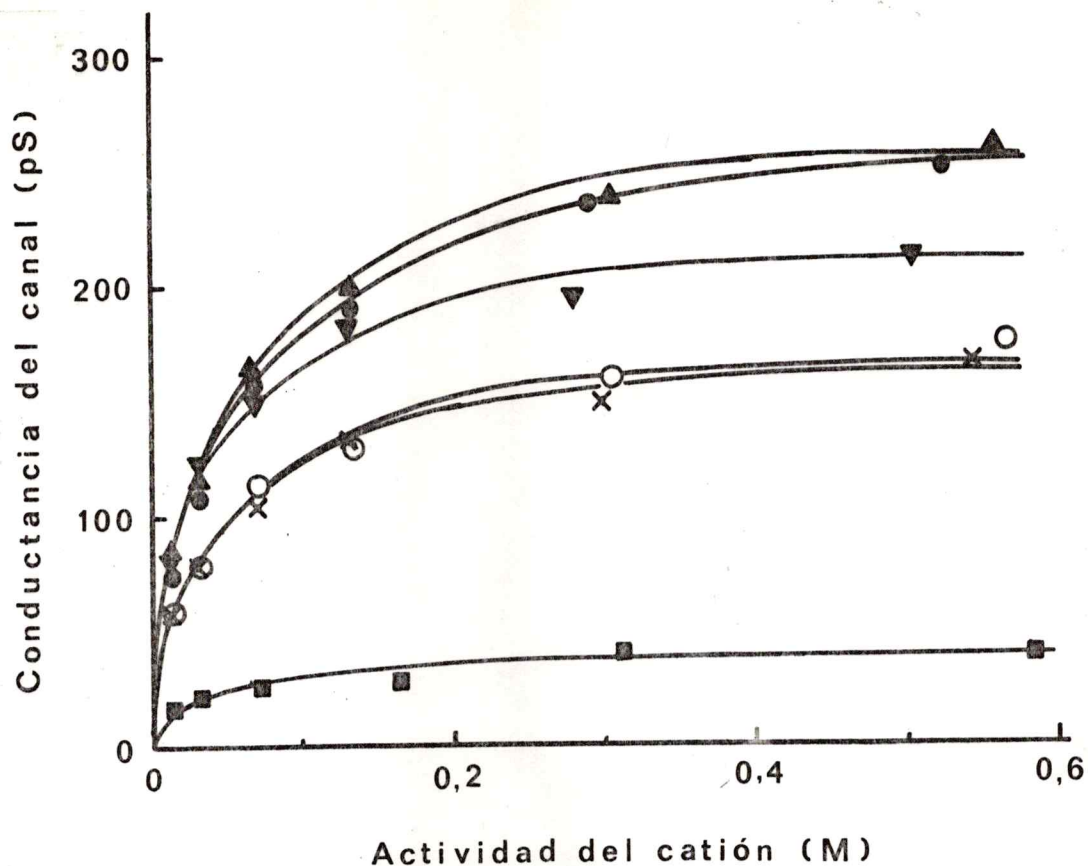


FIGURA 5

Relación conductancia-concentración del canal de hemocianina a los distintos cationes alcalinos.

La conductancia se midió de los saltos de corriente debidos a la formación de canales en soluciones 50 mM de las sales de sulfato de los cationes que se indican. Los puntos son los valores experimentales y las curvas son el resultado del ajuste de funciones hiperbólicas cuyos parámetros aparecen en la Tabla 1.

Li, (■); Na, (X); K, (●); Rb, (▲); Cs, (○); NH₄, (▼).

TABLA 1

Conductancia máxima y $K_{0,5}$ del canal de hemocianina a los
cationes alcalinos.

Los valores son los resultados del ajuste de una hipérbola a los datos de la Fig. 5. Se muestra el valor central y la desviación standard aparece entre paréntesis.

CATION	g_m (pS)	$K_{0,5}$ (mM)
Li	37 (4)	25,6 (9,8)
Na	170 (7)	37,5 (5,6)
K	270 (6)	48,8 (3,5)
Rb	267 (12)	43,3 (6,5)
Cs	176 (8)	37,4 (5,9)
NH ₄	215 (6)	26,4 (2,0)

Selectividad del canal.

La selectividad del canal a diferentes iones se puede determinar mediante dos clases de experimentos: midiendo la conductancia del canal a dichos iones o midiendo el potencial que se genera a través de una membrana tratada con hemocianina y que separa soluciones de igual concentración pero distinto catión (potencial biológico).

Conductancia del canal único.

La secuencia de selectividad que se obtiene para g_m a -50 mV en la Tabla 1 es $K > Rb > NH_4 > Cs > Na > Li$. Además, en la Figura 5 se observa que la secuencia de selectividad depende de la concentración de iones: a concentraciones mayores que $0,05$ M, la secuencia corresponde a la secuencia de g_m , Pero a concentraciones menores que $0,05$ M, el canal es más permeable al amonio que a todos los demás iones. Más adelante veremos que ocurre con esta secuencia cuando se estudia la conductancia del canal a otros potenciales.

Razones de permeabilidad.

Las razones de permeabilidad, P_x/P_y , determinadas a partir del potencial biológico, V_o , están dadas por la relación:

$$P_x/P_y = \exp (-V_o \cdot F/RT) \quad (1)$$

donde R, T y F tienen sus significados habituales.

La Figura 6 muestra un registro típico de potencial biiónico medido de acuerdo al método descrito anteriormente.

Cuando se mide el potencial generado entre sulfatos de potasio y de todos los demás cationes alcalinos, se obtienen las razones de permeabilidad que aparecen en la Tabla 2. La secuencia de selectividad es $\text{NH}_4 > \text{Rb} > \text{K} > \text{Cs} > \text{Na} > \text{Li}$.

Las secuencias de selectividad son diferentes si se determinan por medidas de conductancia o de potenciales biiónicos. La discrepancia entre la secuencia de selectividades medidas por los dos métodos y la dependencia de las secuencias de selectividad con la concentración iónica son indicadores que el mecanismo de transporte no es el de una simple electrodifusión (ver Introducción).

(El texto continúa después de la Tabla 2)

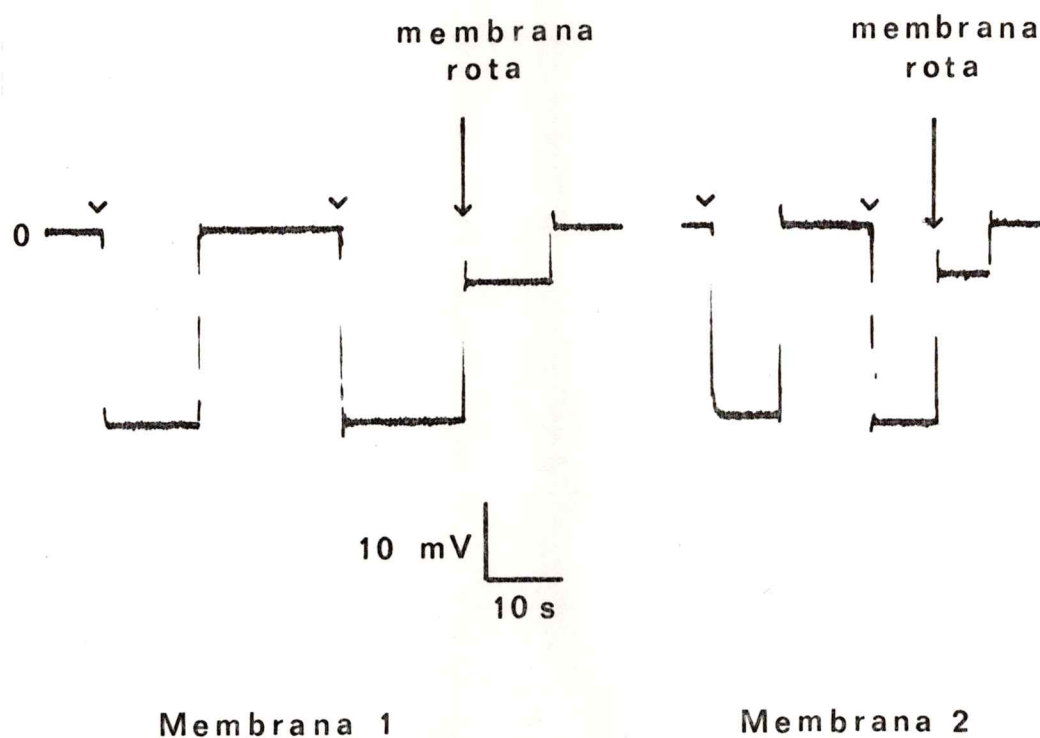


FIGURA 6

Registro del potencial biiónico en una membrana tratada con hemocianina.

Lado *cis*: K_2SO_4 50 mM; lado *trans*: Li_2SO_4 50 mM. El potencial se midió en el lado *cis*. Las puntas de flecha indican el momento en que la cámara se conectaba al voltímetro (ver Métodos). La conductancia de la membrana era mayor que 10^{-8} S a -50 mV.

TABLA 2

Razones de permeabilidad medidas por potenciales biiónicos en membranas tratadas con hemocianina.

La membrana se formaba separando una solución 50 mM de K_2SO_4 en el lado *cis* de una solución 50 mM del sulfato de cualquiera de los otros cationes que aparecen en la Tabla. El potencial, (V_o), se midió como se describe en Métodos. El potencial está referido al lado *cis* y representa la media de al menos 4 experimentos. El error standard de la media aparece entre paréntesis. Las razones de permeabilidad, P_x/P_K , se calcularon usando la ecuación (1).

CATION	V_o (mV)	P_x/P_K
Li	-24,9 (0,75)	0,35 (0,01)
Na	- 5,1 (0,04)	0,81 (0,01)
Rb	1,1 (0,03)	1,05 (0,03)
Cs	- 2,8 (0,08)	0,89 (0,03)
NH_4	10,6 (0,23)	1,52 (0,03)

Estimación de las dimensiones del canal.

Las curvas de conductancia en función de la concentración sugieren que se trata de un canal que puede contener sólo un ión a la vez. Más adelante, desarrollaré un modelo para explicar la conducción de iones en este canal y tendrá como punto de partida la suposición que el canal acepta un solo ión. Se hace necesario entonces, estimar las dimensiones del canal, ya que un canal que acepta un solo ión tiene que ser pequeño porque una buena razón para que no puedan coexistir dos iones o más es la repulsión electrostática producida por la cercanía espacial. La estimación de las dimensiones del canal se llevó a cabo por medio de tres clases de medidas:

a) Determinando cual especie química, si la subunidad de hemocianina, de un peso molecular de alrededor de 800.000 o el conglomerado formado por varias subunidades, de un peso molecular superior a 10.000.000, es la que forma el canal.

b) Estimando el radio del poro, por medidas de coeficientes de reflexión para no-electrolitos y de conductancia a cationes orgánicos grandes.

c) Estimando la longitud del canal por medidas de potenciales de flujo generados por gradientes de noelectrolitos que no pasen por el canal.

La subunidad de hemocianina forma el canal.

El estado de agregación de la hemocianina depende del pH del medio en que se encuentra. A pH 7,0, se encuentra casi completamente asociada, en

cambio a pH 8,5, se encuentra completamente disociada en subunidades (Van Bruggen et al, 1962). Si se compara la habilidad de la hemocianina de formar canales cuando ha sido pretratada a uno u otro pH, se podrá establecer cual de las dos especies moleculares forma el canal. La habilidad de la hemocianina de formar canales iónicos se determinó midiendo la tasa de aumento de la conductancia de una bicapa después de agregar hemocianina.

El registro de un experimento típico diseñado para medir la rapidez de incorporación de hemocianina aparece en la Figura 7. La rapidez de aumento de la corriente, dI/dt , se determinó de la pendiente de las rectas que unen la corriente en cada pulso de 5 s de duración. El valor de dI/dt se relaciona con la rapidez de incorporación de canales de la siguiente manera: la formación de un canal se puede considerar como una reacción en que n moléculas de hemocianina se unen (con una constante cinética, k) para formar el canal; si el proceso es unidireccional, entonces la rapidez de formación de canales, $d(\text{canales})/dt$, estará dada por:

$$d(\text{canales})/dt = k \cdot [\text{hemocianina}]^n \quad (2)$$

Todos los canales tienen la misma conductancia, g . A voltage constante, se puede escribir que:

$$dI/dt = g \cdot V \cdot d(\text{canales})/dt = g \cdot V \cdot k \cdot [\text{hemocianina}]^n \quad (3)$$

Linearizando la ecuación (3), tendremos:

$$\log (dI/dt) = n \cdot \log[\text{hemocianina}] + \log (g \cdot V \cdot k) \quad (4)$$

Al graficar el logaritmo de la rapidez con que aumenta la corriente en función del logaritmo de la concentración de hemocianina, se obtienen los dos parámetros que definen al proceso: n , el número de moléculas que participan en la formación de un canal, y k , la rapidez de incorporación de canales cuando la concentración de hemocianina es unitaria. Estos experimentos se realizaron con soluciones de hemocianina preincubadas durante 24 horas a pH 7 o a pH 8,5 y los resultados aparecen en la Figura 8. De las rectas de regresión que mejor describen a los puntos experimentales se obtiene el parámetro n para los dos valores de pH probados y aparece en la leyenda de la Figura. De los resultados se deduce que sólo una molécula participa en la formación del canal, y que ésta sería la subunidad, ya que la hemocianina disociada resulta más activa en su capacidad de formar canales.

(El texto continúa después de la Fig. 8)

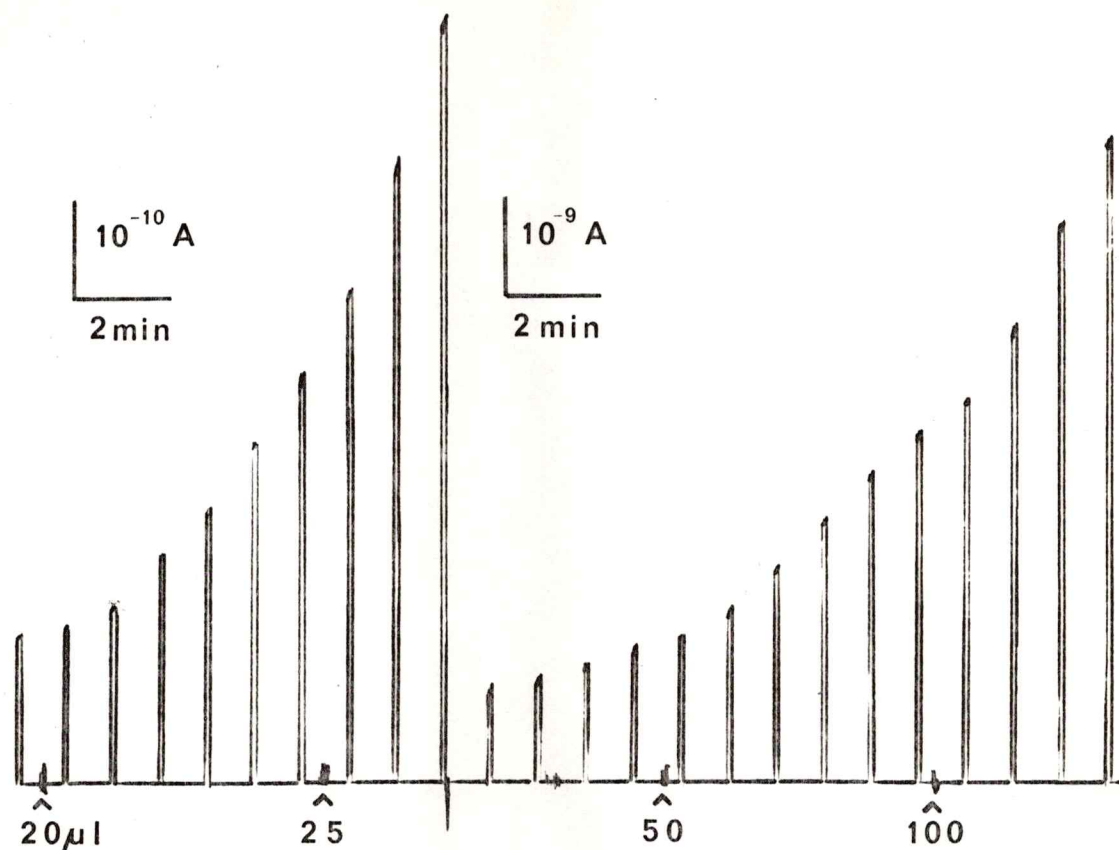


FIGURA 7

Rapidez de incorporación de hemocianina a bicapas.

El experimento se realizó en una bicapa de glicerolmonooleato/colesterol 1/1 (razón molar) en KCl 0,1 M, Tris-Cl 5 mM, pH 7. La hemocianina (35 $\mu\text{g/ml}$), que fue incubada 24 hrs a pH 8,5, se agregó a los tiempos que se indican por flechas y en los volúmenes que allí aparecen. La corriente que circula a través de la membrana se mide aplicando pulsos de 10 mV y de 5 s, con una frecuencia de 1s^{-1} . El valor de dI/dt se calculó de estos gráficos trazando rectas que unieran todos los valores de corriente para cada concentración de hemocianina probada y determinándoles las pendientes.

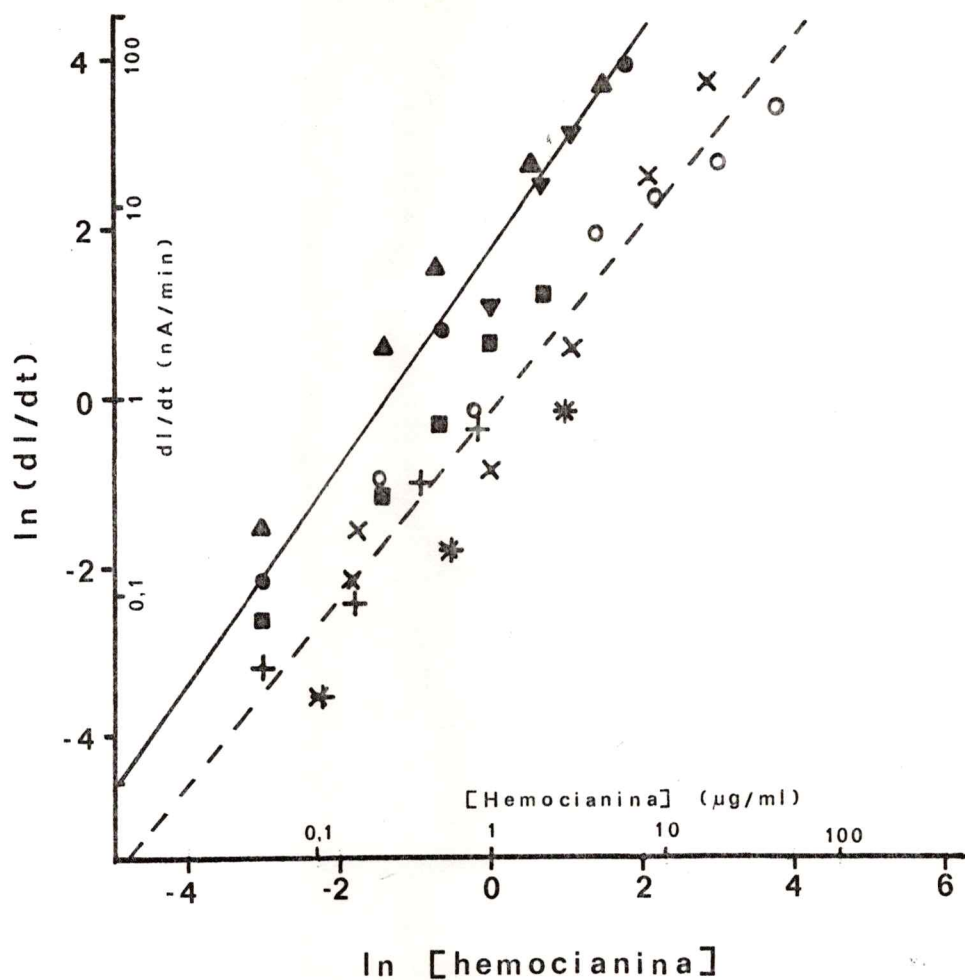


FIGURA 8

Efecto de la concentración de hemocianina y del pH sobre la rapidez de formación de canales en bicapas de lípidos.

Los experimentos se realizaron como se describe en la Fig. 7, a pH 7,0.
 (●,■,▲,▼): hemocianina preincubada a pH 8,5 durante 24 hrs; $n = 1,4 \pm 0,14$
 (×,*,+,○): hemocianina preincubada a pH 7,0 durante 24 hrs; $n = 1,2 \pm 0,09$

Medición del diámetro del canal.

La estimación del diámetro se llevó a cabo por dos métodos distintos:

1. Determinación de la conductancia del canal usando cationes monovalentes de diferentes tamaños.

La conductancia del canal cuando se usan cationes orgánicos monovalentes de diferentes tamaños fue determinada midiendo el tamaño de los saltos de conductancia asociados con la incorporación de canales y se comparó con la movilidad en agua de los cationes empleados. En la Tabla 3 hay un resumen de los resultados de tal estudio y muestra, además, el radio de los cationes.

La columna 3 de la Tabla 3 muestra que la conductancia del canal, en todas las soluciones de iones monovalentes probadas, no sigue la misma secuencia que las movilidades de estos iones en agua: si así fuera, todos los valores de conductancia normalizada relativas al potasio debieran ser uno. Además, los cationes monovalentes orgánicos etanolamonio ($\text{CH}_2\text{OH-NH}_3^+$), tetrametilamonio ($(\text{CH}_3)_4\text{-N}^+$) y Tris no se conducen a través del canal, ya que su conductancia es cercana a cero. También se usó el ión hidroxilamonio (OH-NH_3^+), pero este ión representa un caso especial porque es hidrolizado a pH 7. Por esta razón, los experimentos con este ión fueron hechos a pH 5. La conductancia del canal es dependiente del pH, como fue demostrado por Menestrina y Antolini, 1981, y por Bull y Cecchi (resultados no publicados), de manera que la conductancia del canal en presencia de hidroxilamonio a pH 5 fue comparada con la conductancia para el potasio al

mismo pH. Los resultados obtenidos fueron 30 pS para el catión orgánico y 34 pS para el potasio, lo cual indica que el hidroxilamonio puede pasar a través del canal. Como conclusión de estos resultados, se puede decir que el diámetro del poro es tal que excluye al ión etanolamonio, de 0,24 nm de radio, pero deja pasar al hidroxilamonio, de 0,2 nm de radio.

La última columna de la Tabla 3 muestra la conductancia del canal cuando se agrega sulfato de potasio a la cámara hasta una concentración final de 50 mM después que la membrana ha sido tratada con hemocianina en presencia de los cationes que se indican. Se observa que la conductancia aumenta, pero no alcanza los valores que se obtienen cuando el potasio es el único catión presente (ver el último valor de conductancia de la columna 4). Esto indica que los cationes grandes que, si bien no pueden pasar a través del canal, actúan como bloqueadores de los iones que pueden pasar, probablemente porque entran hasta cierto punto dentro del canal, donde quedan atascados.

(El texto continúa después de la Tabla 3)

TABLA 3

Conductancia del canal de hemocianina a varios cationes monovalentes

Los valores de conductancia se determinaron en las sales de sulfato a pH 7,0 (excepto para OH-NH₃⁺, ver el texto) y representan la media y su error standard de al menos 10 determinaciones. Están corregidos por la conductancia en el buffer (Tris-Cl 5 mM). Los radios iónicos para los cationes alcalinos son de Robinson y Stokes, 1970 y los demás, se calcularon de acuerdo a Edwards, 1970. La tercera columna es la conductancia del canal normalizada por la conductividad del ion en agua, relativa al potasio. La conductividad en agua del amonio se sacó de Robinson y Stokes, 1970. Los demás, fueron determinados en el Laboratorio del Dr. Luis Sepúlveda. La última columna muestra la conductancia del canal en presencia del ión que se indica más K₂SO₄ 25 mM (ver Texto).

CATION	Radio iónico (nm)	Conductancia del canal (pS)	Conductancia normalizada relativa a K	Conductancia del canal (más K ₂ SO ₄)
NH ₄ ⁺	0,15	148,2 (2,4)	0,94	
OH-NH ₃ ⁺	0,20	***	0,88	
CH ₂ OH-NH ₃ ⁺	0,24	0,6 (0,1)	0,01	62,0 (2,8)
(CH ₃) ₄ -N ⁺	0,28	1,8 (0,2)	0,02	90,0 (2,0)
Tris	0,29	1,0 (0,1)	0,02	78,0 (4,2)
Nada				134,0 (4,2)

2. Determinación del diámetro por medidas de potenciales de flujo.

Se utilizaron medidas de potenciales de flujo como un método alternativo para estimar el diámetro del canal. El fundamento de este método es el siguiente (Rosenberg y Finkelstein, 1978): si se establece una diferencia de concentración de un noelectrolito a través de una bicapa de lípidos, tal que el noelectrolito no puede pasar a través de ella, habrá un flujo de agua a través de la bicapa (que es permeable al agua). Si las soluciones contienen concentraciones iguales de iones a ambos lados, el agua que pasa diluye a los iones en las cercanías de la membrana en el lado que contiene al noelectrolito. Como la bicapa es impermeable a los iones, se produce una diferencia de concentración de iones permanente a través de la bicapa. Si la bicapa se hace selectivamente permeable al catión, por ejemplo, surgirá una diferencia de potencial a través de la bicapa, de acuerdo a la ecuación de Nernst, que llamaremos potencial de dilución. Este potencial se puede medir poniendo en el sistema un ionóforo selectivo a cationes.

Cuando se incorpora un canal selectivo a cationes a la membrana, ocurrirá, además, otro fenómeno: el agua pasará por el canal impulsada por la diferencia de presión osmótica, pero por el canal también pueden pasar cationes, de modo que el flujo de agua los arrastrará, produciendo una acumulación de cationes en el lado que contiene al noelectrolito. Si el sistema está en condiciones de circuito abierto (es decir, conectado a un voltímetro de alta impedancia) no habrá posibilidades de movimiento de cationes, y por lo tanto, de agua, a través de la membrana. El sistema está en equilibrio, produciéndose una diferencia de potencial eléctrico entre

ambos compartimientos, que llamaremos potencial de flujo. Pero ni el agua ni el catión están en equilibrio, sino más bien, una especie combinada de un catión y N moléculas de agua: si suponemos que el canal acepta un solo ión y que el ión y N moléculas de agua viajan en fila india dentro del canal, la especie que estamos considerando será $N(\text{H}_2\text{O})-\text{K}^+$, y en el equilibrio, el potencial electroquímico de ella será igual a ambos lados de la membrana, de acuerdo a la siguiente relación:

$$N \cdot \mu_{\text{W}}(1) + \mu_{+}(1) = N \cdot \mu_{\text{W}}(2) + \mu_{+}(2) \quad (5)$$

en que μ_{W} es el potencial químico por molécula de agua y μ_{+} es el potencial electroquímico del potasio. Desarrollando la ecuación (5) con las expresiones correspondientes para el potencial químico del agua y el potencial electroquímico del potasio, llegamos a la siguiente ecuación para el potencial de flujo (V_{F}):

$$V_{\text{F}} = N \cdot (n_{\text{s}}/n_{\text{W}}) \cdot (RT/F) \quad (6)$$

en que n_{s} y n_{W} son el número de moles de noelectrolito y de agua, respectivamente, en el lado que contiene al noelectrolito y R, T y F tienen sus significados habituales.

Si el noelectrolito puede pasar por el canal, entonces la especie química que se mueve a través del canal ya no contiene el mismo número de moléculas de agua, porque el noelectrolito ocupa un lugar dentro de él. Este hecho hará que el potencial de flujo sea menor si se lo comparara con el que produce un noelectrolito que no cabe en el canal. Si la permeabilidad al

noelectrolito es mayor que al agua, entonces el potencial será igual a cero. Determinando potenciales de flujo se puede, entonces, determinar el tamaño máximo que debe tener un noelectrolito para caber dentro del canal y con ello, conocer las dimensiones del canal.

Cuando se mide la diferencia de potencial en presencia de un canal selectivo, se está midiendo la suma de ambos potenciales descritos más arriba: el potencial de dilución y el potencial de flujo. Es necesario, entonces, determinar separadamente el potencial de dilución usando un transportador de potasio, como valinomicina, y restarle el valor obtenido a los potenciales medidos cuando la membrana contiene los canales.

El registro que se muestra en la Figura 9 es el resultado de un experimento típico de esta clase. La Fig. 9 A muestra el potencial medido en una membrana tratada con hemocianina. El registro 9 B muestra el potencial en presencia de valinomicina. Estos experimentos se repitieron para todos los noelectrolitos que aparecen en la Tabla 4, en la cual se muestran los potenciales generados normalizados para una gradiente osmótica de 1 osmol/kg. Los potenciales de flujo para glucosa, urea y acetamida son iguales, indicando que estos noelectrolitos no pasan a través del canal. Sin embargo, el potencial producido por formamida es significativamente menor, indicando que este no electrolito pasa a través del canal. Este resultado conduce a un radio de poro similar al estimado de las medidas de conductancia y lo coloca por debajo de 0,24 nm ya que tanto el ión etanolamonio como la formamida caben dentro del canal.

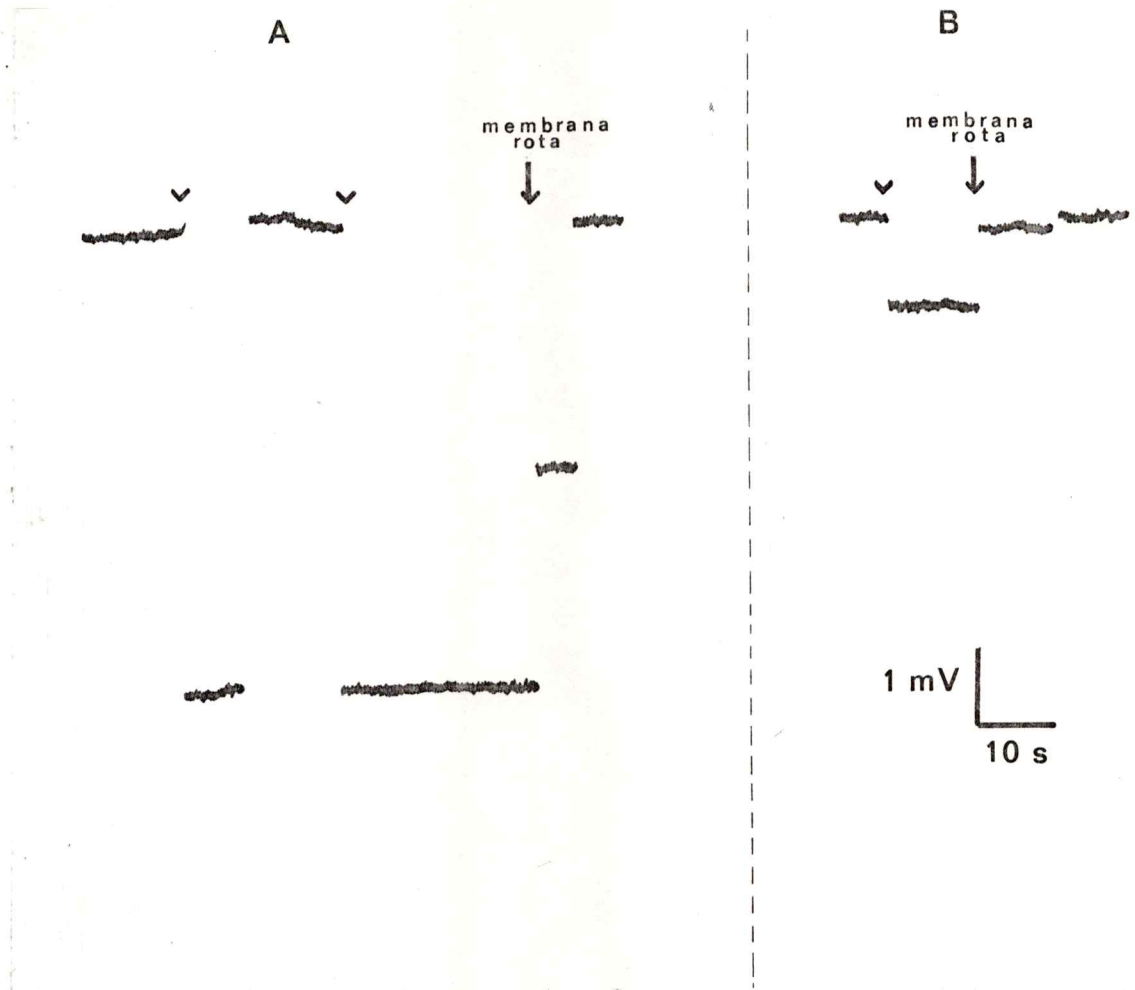


FIGURA 9

Registro de potenciales de flujo en una membrana tratada con hemocianina.

Lado *cis*: K_2SO_4 50 mM; lado *trans*: K_2SO_4 50 mM + urea 1,3 M.
 Las puntas de flecha indican los momentos en que la cámara se conectaba al voltímetro (ver métodos). La conductancia de la membrana era mayor que 10^{-8} S a -50 mV.

A: con hemocianina en el lado *cis*. B: con valinomicina en ambos lados.

TABLA 4

Potenciales de flujo producidos por gradientes osmóticas de noelectrolitos en membranas tratadas con hemocianina.

Las membranas se formaron en las condiciones descritas en la leyenda de la Fig. 9. La osmolaridad de las soluciones se midió al final de cada experimento. Los potenciales se expresan por gradientes de 1 osmol/kg. Los radios moleculares se calcularon por el método de Edwards, 1970. Los valores son las medias aritméticas de, al menos, cinco determinaciones y el error standard de la media aparece entre paréntesis.

Noelectrolito	Radio molecular (nm)	$V_{hemoc.}$ (mV/(Osmol/kg))	V_{val}	V_F
Glucosa	0,33	2,07 (0,06)	0,89 (0,06)	1,18 (0,08)
Urea	0,24	1,62 (0,07)	0,38 (0,10)	1,24 (0,12)
Acetamida	0,24	-1,38 (0,07)	-2,61 (0,21)	1,23 (0,22)
Formamida	0,21	0,52 (0,04)	0,36 (0,10)	0,16 (0,11)

Longitud del canal.

Los potenciales de flujo pueden ser utilizados para estimar, además, la longitud del canal. De acuerdo a la ecuación (6), cuya deducción supone que un ión y N moléculas de agua viajan en "fila india" por el canal, el potencial de flujo depende del número de moléculas de agua que quepan en el canal. Cuando la solución de noelectrolito es 1 osmolal y a temperatura ambiente, la ecuación (6) queda:

$$V_F = N \cdot 0,46 \quad (7)$$

Con el potencial de 1,2 mV obtenido para una solución 1 osmolal de glucosa y aplicando la ecuación (7), resulta que 2,6 moléculas de agua acompañan al potasio dentro del canal. Tres moléculas de agua y un ión potasio deshidratado dentro del canal en "fila india" dan un largo total de alrededor de 1 nm.

Los resultados obtenidos para las estimaciones de diámetro y longitud señalan que el canal de hemocianina es corto y angosto, lo cual apoya, aunque no demuestra, el postulado inicial que el canal acepta un solo ión a la vez.

Curvas corriente voltaje.

Las corrientes de estado estacionario en membranas tratadas con hemocianina no son óhmicas y este fenómeno ha sido explicado por Latorre et al, 1975, como el resultado de una distribución dependiente del potencial de los canales entre varios estados de conductancia. La relajación de este

proceso toma segundos y en la escala de los milisegundos esta redistribución entre diferentes estados no tiene tiempo de ocurrir. En estas condiciones, sin embargo, la curva corriente-voltaje tampoco es lineal, como se observa en las Figuras 10 y 11 para potasio y litio, a dos concentraciones diferentes, que muestran curvas hechas en membranas con muchos canales.

En todos los casos, se observa que las corrientes son mucho mayores cuando los iones se mueven desde el lado *cis* hacia el lado *trans* que cuando lo hacen en la otra dirección. Además, a potenciales positivos la corriente no crece linealmente y tiende a un plateau a medida que aumenta el potencial. En cambio, a potenciales negativos, las curvas pueden ser sublineales (pendiente decreciente) o superlineales (pendiente creciente) dependiendo de la concentración y del ión usados.

Cuando se hacen curvas i/V para todos los iones alcalinos, se obtienen los resultados que aparecen en la Figura 12. En ella se ve que la forma de las curvas es semejante para todos los iones, pero que las secuencias de selectividad resultan ahora dependientes del potencial al cual se mida la conductancia del canal: a potenciales negativos grandes es $\text{NH}_4 > \text{Rb} > \text{K} > \text{Cs} > \text{Na} > \text{Li}$ y cambia a $\text{NH}_4 > \text{Rb} > \text{Cs} > \text{K} > \text{Na} > \text{Li}$ a potenciales positivos grandes. Este cambio de las secuencias de selectividad con el potencial eléctrico es otra indicación que el mecanismo de conducción de iones no es simple electrodifusión.

(El texto continúa después de la Fig. 12)

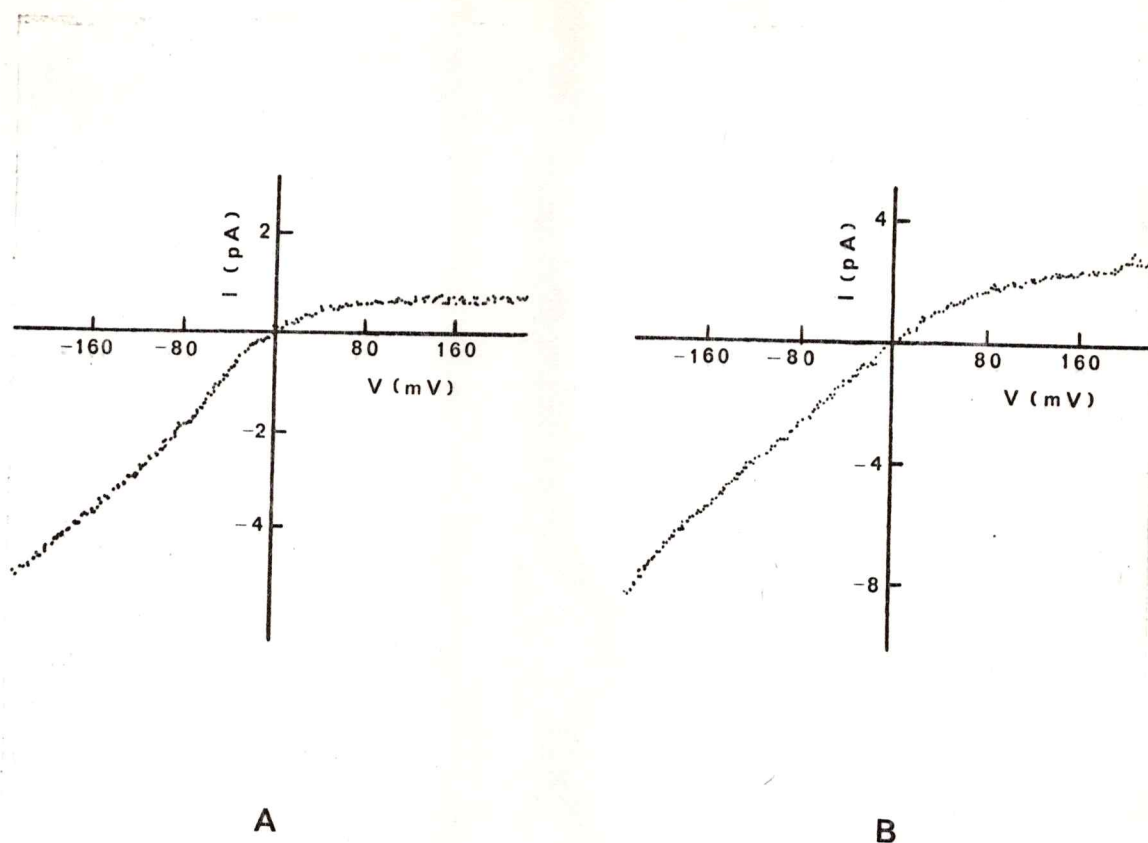


FIGURA 10

Curvas corriente voltaje instantáneas para potasio.

A: K_2SO_4 10 mM; B: K_2SO_4 500 mM. Antes de agregar la hemocianina, la corriente capacitiva transitoria fue abolida como se describe en Métodos. Cada punto representa un dato de corriente tomado 1 ms después de aplicado el pulso. Cada curva comprende 250 puntos de corriente correspondientes a potenciales entre ± 250 mV a intervalos de 2 mV. El tiempo total del experimento es menor que 10 s, lo cual asegura que el número de canales es constante durante todo el experimento.

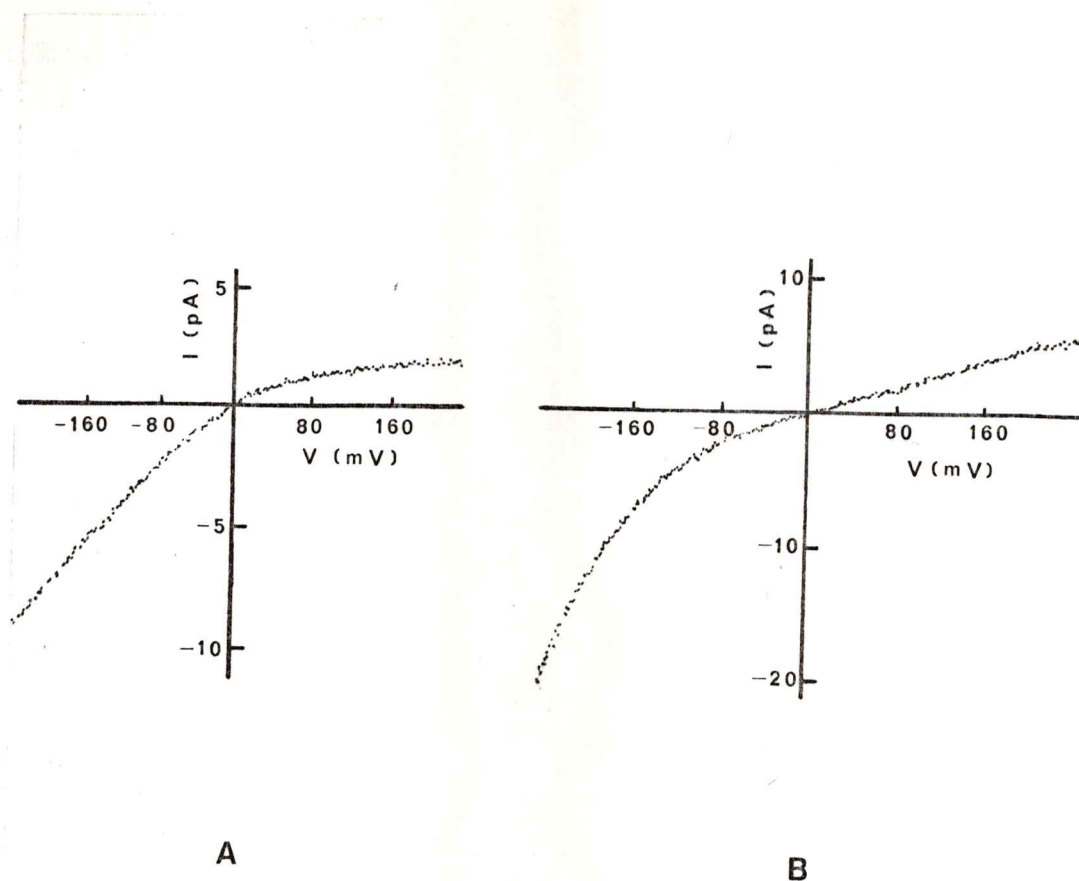


FIGURA 11

Curvas corriente-voltaje instantáneas para litio.

A: Li_2SO_4 10 mM; B: Li_2SO_4 500 mM. Las curvas se hicieron como se indica en la leyenda de la Fig. 10.

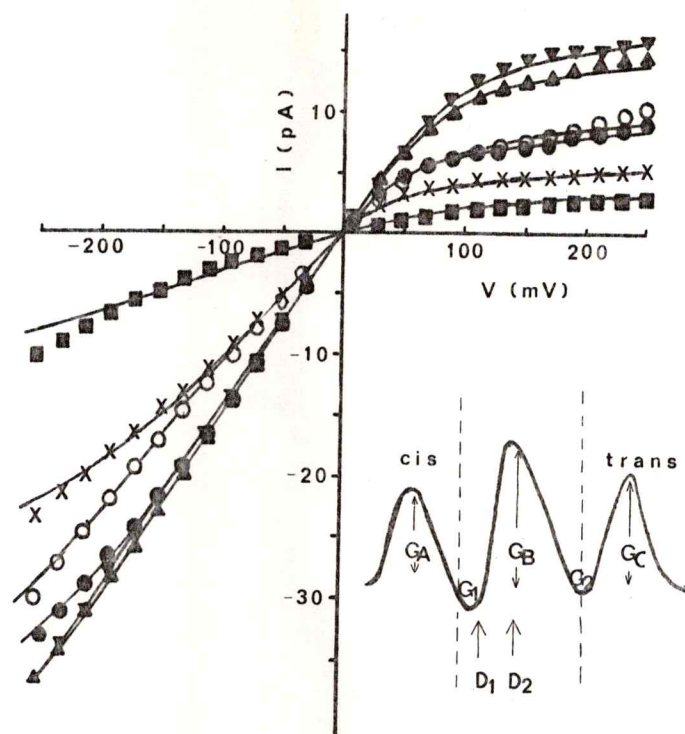


FIGURA 12

Curvas corriente-voltaje del canal de hemocianina para todos los cationes alcalinos.

Los experimentos se hicieron en la sal de sulfato 50 mM para todos los cationes que se indican. Los datos de corriente se obtuvieron como se describe en Métodos, y fueron reducidos a los 26 que aparecen en la Figura promediando los valores de corriente en torno a los potenciales que se indican y están normalizados por la corriente del canal a -50 mV, que se determinó en experimentos separados. Las líneas continuas son el resultado del ajuste del modelo de barreras. (Ver el texto).

A: K, (\bullet) Rb, (\blacktriangle); Li, (\blacksquare). B: NH_4 , (\blacktriangledown); Cs, (\circ); Na, (\times).

Mediciones rápidas de corriente.

La no linealidad de las curvas corriente-voltaje puede explicarse de dos maneras: invocando un cambio muy rápido en la estructura del canal dependiente del potencial que resulte en un cambio de su conductancia o suponiendo que la estructura misma del canal es asimétrica de tal manera que su conductancia varía con el potencial. Una manera de aproximarse a resolver entre estas dos posibilidades es medir las corrientes que pasan a través del canal a tiempos muy cortos después de aplicado el potencial. El resultado de tal experimento está en la Figura 13. Los registros de arriba de la Figura 13 A-C muestran la diferencia punto a punto de la corriente medida durante pulsos de voltaje de 50, 100 y 175 mV de polaridad alternada (ver Métodos). Los pulsos tenían una duración de 45 microsegundos y la corriente capacitiva transitoria en los bordes inicial y final de los pulsos era compensada con un circuito simulado de la misma capacidad y resistencia en serie de la membrana. Se observa que la subida en el borde inicial del pulso es más lenta que la bajada en el borde final y que hay un retardo de la aparición de la corriente diferencial después de aplicado el pulso. Una interpretación apresurada de esta observación sería que cuando recién se establece el pulso en la membrana, las corrientes que circulan a través de ella son iguales para los dos potenciales de distinta polaridad y que la rectificación aparece con cierto retardo en el tiempo. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que la membrana puede representarse como un condensador que demora en cargarse y por lo tanto, la diferencia de potencial aplicada no se establece instantáneamente a través de ella. Por otro lado, las curvas corriente voltaje de la Fig. 10 muestran que la rectificación comienza después de los 20 mV, por lo tanto es de esperar que durante el tiempo que

el potencial efectivo en la membrana es inferior a 20 mV, no se observe ninguna diferencia entre las corrientes positiva y negativa. Por último, el sistema de amplificación de corriente tiene un determinado tiempo de respuesta, distinto de cero, que también influye en la medición temporal de la corriente. Por todos estos motivos, se hizo un cálculo teórico de la corriente diferencial, que aparece en los registros del centro, de la siguiente manera:

1. Se calcula el curso temporal del potencial en la membrana utilizando la capacidad y la resistencia en serie que se utilizaron en compensar la corriente capacitiva transitoria en el experimento que se muestra en el registro de arriba.
2. Se calcula la corriente que pasa a través del canal en función del potencial utilizando las curvas i/V de la Figura 10, obteniéndose el curso temporal de la corriente.
3. Considerando que el amplificador de corriente tiene un tiempo de respuesta de 1 microsegundo, se aplica la integral de convolución al curso temporal de la corriente obtenido en 2 y se obtienen los registros que aparecen en el centro. Cuando se sobreponen los registros de arriba y del centro (registros de abajo), no se observa ninguna diferencia, lo cual hace concluir que no hay una dependencia temporal de la rectificación en la escala de tiempo usada en este experimento. La rectificación del canal medida en microsegundos es la misma que la que se observa en las curvas i/V de las Figuras 10 y 11 que fueron medidas en milisegundos. Este resultado permite concluir que la rectificación que aparece en las Figuras 10, 11 y 12 no se debe a un cambio

de la estructura del canal, sino más bien a que la vía de paso a los iones presenta una estructura fija que es asimétrica.

La rectificación instantánea que se encuentra en el canal de hemocianina indica nuevamente que el mecanismo de conducción de iones a través de él no puede ser una simple electrodifusión en un poro acuoso, ya que en ese tipo de mecanismo la relación corriente voltaje debe ser lineal cuando las soluciones a ambos lados de la membrana son de la misma concentración. Es necesario, entonces, postular otro mecanismo para el transporte de iones en este canal, que explique las curvas corriente voltaje instantáneas, y que, además, de cuenta de la saturación de la corriente con la concentración de iones.

(El texto continúa después de la Fig. 13)

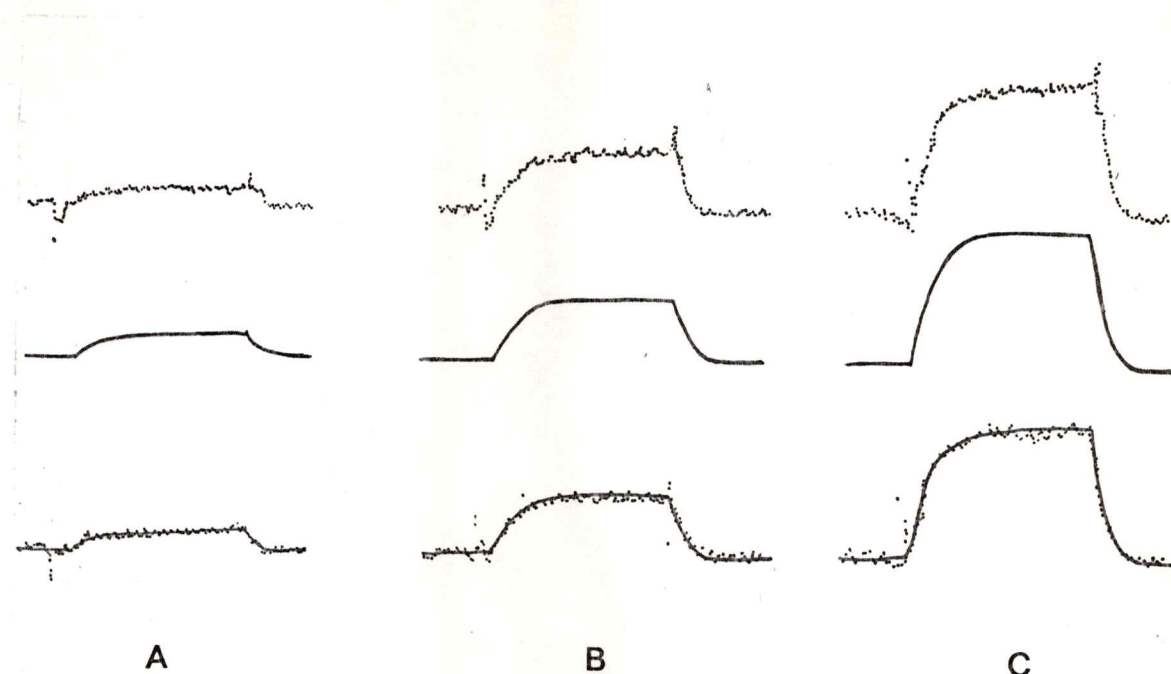


FIGURA 13

Rectificación instantánea.

Los registros de arriba son la diferencia punto a punto de la corriente que pasa por el canal al aplicar pulsos de polaridad alternada de:

A: ± 50 mV; B: ± 100 mV; C: ± 175 mV.

Al centro, esta misma diferencia pero calculada de un circuito equivalente a la membrana, tomando en cuenta el tiempo que demora el potencial en establecerse a través de la membrana, suponiendo una rectificación como la que aparece en la Fig. 10 y considerando el tiempo de respuesta del amplificador de corriente que era de $1 \mu\text{s}$. Abajo, la superposición de las dos anteriores, que muestra que son iguales, indicando que la rectificación en la escala temporal usada aquí (μs) es la misma que en la escala de la Fig. 10 (ms).

El modelo de tres barreras.

Un modelo que señala al canal como una serie de barreras de energía que separan sitios de ligamen para los iones puede dar cuenta de los hallazgos descritos experimentalmente. En este modelo, que se muestra en la Figura 14, los valores de energía libre del ión en los valles (G_1 y G_2) y los de las barreras (G_A , G_B y G_C) pueden ser afectados por el potencial aplicado, lo cual puede explicar la no linealidad de las curvas corriente-voltage. La existencia de sitios de ligamen explica inmediatamente que la conductancia tienda a un límite al aumentar la concentración de iones. D_1 y D_2 representan la fracción del potencial aplicado que sienten el sitio de ligamen cercano al lado *cis* y la barrera central, respectivamente. No representan distancia espacial, ya que no se conoce la forma del campo dentro del canal (Lauger, 1973).

El modelo elegido surge de la inspección de las curvas corriente-voltaje de las Figuras 10 y 11. La corriente independiente del potencial en los potenciales positivos y las regiones sublineales de la curva a potenciales negativos cuando la concentración iónica es baja, sugieren que hay dos barreras de entrada al canal, una por el lado *cis* y otra por el lado *trans*, que no son afectadas por el potencial aplicado, es decir, están fuera del campo eléctrico. Las regiones superlineales (es decir, las zonas de la curva en que la pendiente aumenta con el potencial aplicado) sugieren que existe una barrera central que sí es afectada por el potencial eléctrico aplicado. Estas tres barreras definen dos sitios de unión que estarían localizados cerca de las bocas del canal por ambos lados, en los cuales la energía libre de los iones sería menor que en las barreras.

En el Apéndice está la deducción de las ecuaciones que describen la corriente en función del potencial y de la concentración iónica en términos de los parámetros energéticos del modelo de tres barreras. Con estas ecuaciones, se puede calcular la corriente en función del potencial y así construir curvas corriente voltaje teóricas. Los siete parámetros que aparecen en estas ecuaciones fueron estimados usando un método de ajuste no lineal que comparaba estadísticamente las curvas teóricas con las experimentales.

El resultado típico de dicho ajuste para las curvas corriente-voltaje en sulfato de potasio entre 10 y 100 mM aparece en la Figura 15. Los puntos corresponden a los valores experimentales y las curvas son el resultado del ajuste, que dio los parámetros que aparecen en la Tabla 5. Para obtener estos parámetros, el programa se dejó primero en libertad de ajustar los siete parámetros que definen la función para cada concentración probada. Luego, los parámetros de posición, D_1 y D_2 , se promediaron dando los valores de : $D_1 = 0,06$ y $D_2 = 0,25$, y se hizo un segundo ajuste, esta vez permitiendo solamente que variaran los parámetros de energía. Estos son los que aparecen en la Tabla 5. Se observa que cuando este ajuste se realiza para varias concentraciones de sulfato de potasio, algunos de los parámetros varían con la concentración, de manera que los valles de energía son más "profundos" (G_1 y G_2 , Tabla 5) y el pico central es más "bajo" (G_B , Tabla 5) a bajas concentraciones de potasio.

(El texto continúa después de la Tabla 5)

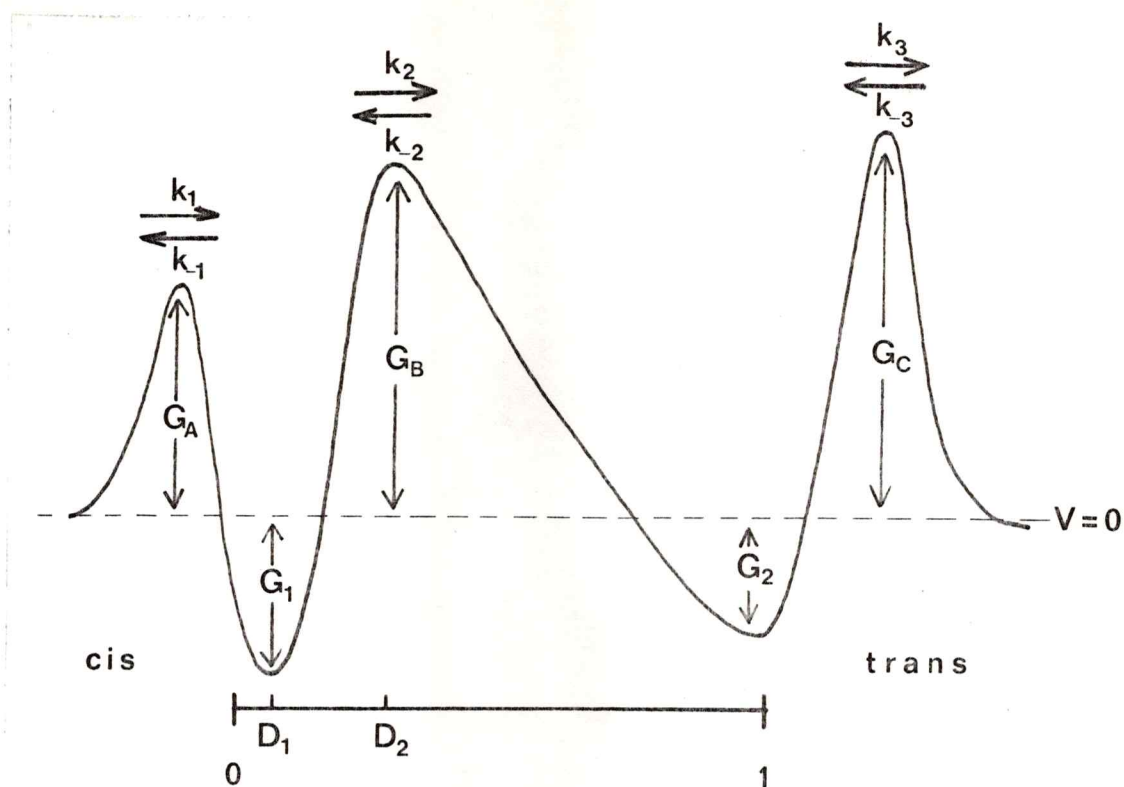


FIGURA 14

El modelo de tres barreras.

G_1 y G_2 representan las energías del ión en los valles 1 y 2 respectivamente. G_A , G_B y G_C representan las energías del ión en las tres barreras. k_i y k_{-i} son las constantes cinéticas para el movimiento de los iones a través de las correspondientes barreras de energía. D_1 y D_2 representan las fracciones del potencial aplicado que sienten el valle 1 y la barrera central, respectivamente. La energía del ión en el lado *cis* es tomado como referencia y es igual a cero. La energía en el lado *trans* es modificada por el potencial aplicado.

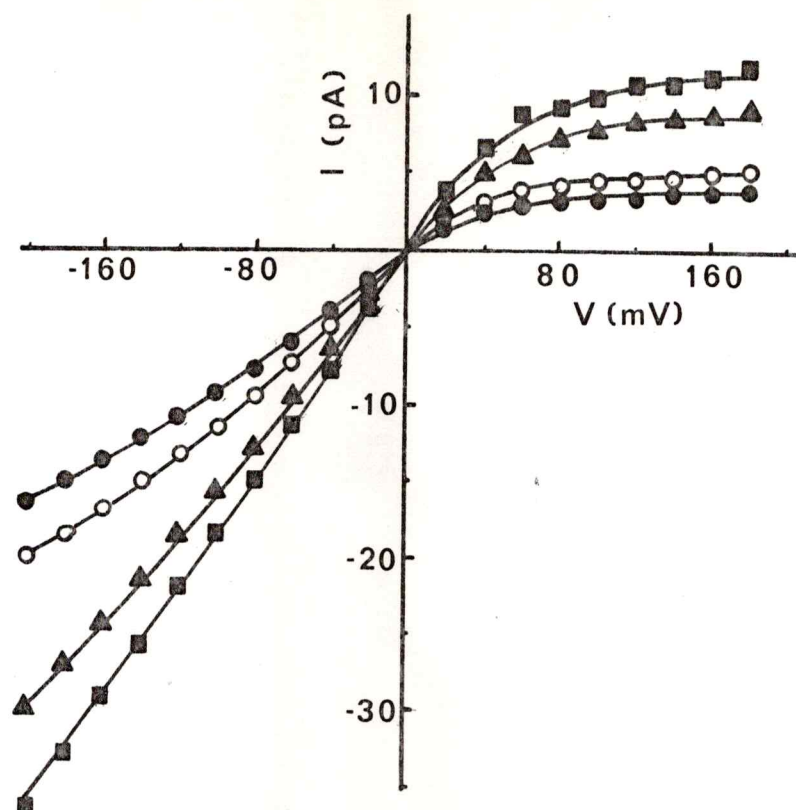


FIGURA 15

Ajuste de las curvas corriente-voltaje del canal de hemocianina usando el modelo de tres barreras.

Los experimentos se realizaron en K_2SO_4 a las concentraciones que se indican. Los puntos son experimentales y se sacaron de las curvas i/V instantáneas (ver métodos) promediando la corriente en un entorno de 20 mV, en el rango completo de la curva (± 250 mV). Las corrientes a cada potencial se normalizaron por la conductancia del canal único a -50 mV que fue determinada en experimentos separados. Las líneas continuas corresponden al ajuste con el modelo de tres barreras, y fueron calculadas con los parámetros que aparecen en la Tabla 5.

(●) 10 mM; (○) 20 mM; (▲) 50 mM y (■) 100 mM.

TABLA 5

Parámetros energéticos del modelo de tres barreras para potasio.

Los valores se obtuvieron por un método de ajuste no lineal aplicado a los puntos que aparecen en la Fig. 15. Los valores de energía están dados en kcal/mol. D_1 y D_2 representan las fracciones del potencial eléctrico en el sitio 1 y en la barrera central, respectivamente, y fueron fijados en: $D_1 = 0,06$; $D_2 = 0,25$ (Ver el texto).

K_2SO_4 (mM)	G_1	G_2	G_A (kcal/mol)	G_B	G_C
10	-1,45	-0,85	3,46	4,66	5,02
20	-1,42	-0,77	3,49	4,81	5,15
50	-1,11	-0,31	3,58	5,14	5,14
100	-0,80	-0,11	3,44	5,39	5,40

Los parámetros energéticos en función de la concentración iónica.

Las bicapas hechas con mezclas de lípidos de frejol de soya tienen una carga negativa en la superficie debido a que contienen fosfatidilserina (PS), lípido cargado negativamente. La carga superficial produce un potencial en la superficie de la membrana que depende de la concentración de cationes de la solución acuosa. Este potencial puede ser calculado usando las ecuaciones descritas por Aveyard y Haydon, 1973, que relacionan el potencial generado en la superficie con la fuerza iónica de la solución y la densidad de carga de la membrana. Considerando que en el caso presente la membrana contenía 50 % de lípidos de frejol de soya y que esta mezcla contiene un 30% de PS, esto da una densidad de cargas negativas del orden de $0,2 \text{ nm}^{-2}$. Cuando se calculan los potenciales en la superficie para diferentes concentraciones de sulfato de potasio empleadas, se observa que la variación de los parámetros G_1 , G_2 y G_B es en la misma dirección del cambio del potencial de superficie. Esto se aprecia en la Figura 16. Para llegar a los valores de G 's que aparecen en la Figura, primero se ejecutó el programa de ajuste dejando al computador en libertad de cambiar los siete parámetros del modelo. La simple observación de los resultados sugirió que sólo G_1 , G_2 y G_B variaban de forma consistente con la concentración. Entonces, todos los demás parámetros (es decir, G_A , G_C , D_1 y D_2) se promediaron para todas las concentraciones y se volvieron a ajustar las curvas, esta vez poniendo los promedios como parámetros fijos y dejando al computador que variara solamente G_1 , G_2 y G_B . Los resultados de este segundo ajuste son los que aparecen en la Fig. 16.

El descubrimiento de este efecto de la carga de superficie sobre algunos parámetros del modelo tiene dos consecuencias importantes: por una parte, en

los experimentos en que se varíe la concentración iónica de las soluciones acuosas, se debe tomar en cuenta la influencia del potencial de superficie sobre los parámetros del modelo que se utilicen en la deducción de las ecuaciones teóricas. Por otra parte, el hecho que las barreras de acceso no sean afectadas por el potencial de superficie las sitúa a una distancia mayor que 2 radios de Debye de la membrana (ver Discusión).

(El texto continúa después de la Fig. 16)

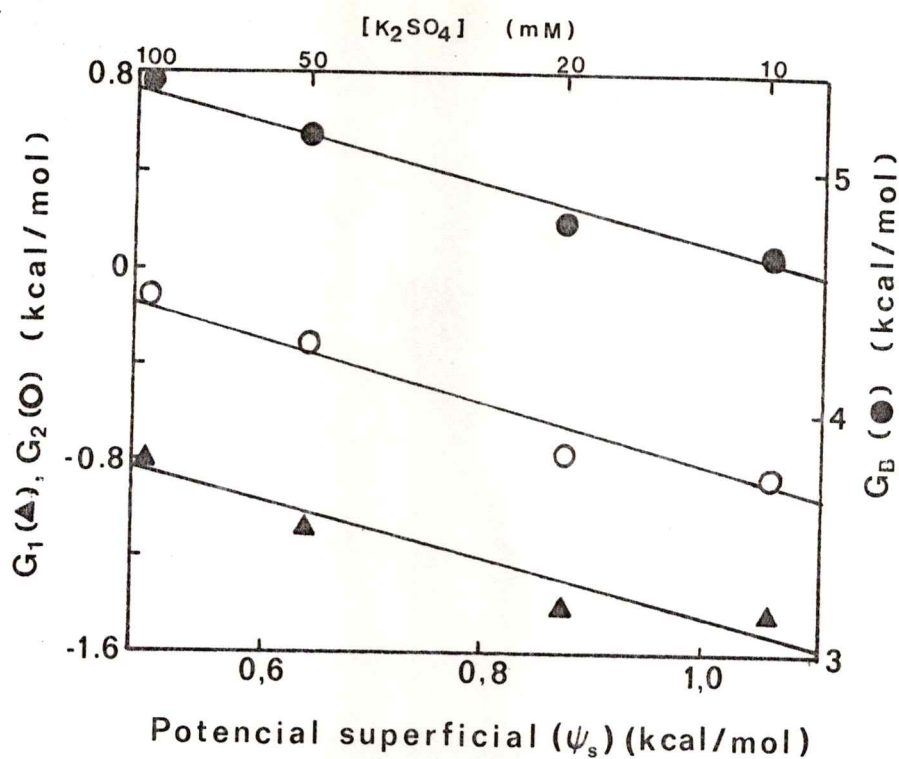


FIGURA 16

Efecto de la carga de superficie de la bicapa sobre los parámetros del modelo del canal de hemocianina.

Los valores de G_1 , G_2 y G_B que aparecen en la Tabla 5 se graficaron en función del potencial de superficie de la membrana, (V_s), que se calculó de acuerdo a Aveyard y Haydon, 1973. Los puntos son los parámetros obtenidos del ajuste no lineal y las líneas son las rectas de regresión que mejor los describen. Estas son:

$$G_1 = -0,30 - 1,19 \cdot V_s$$

$$G_2 = 0,57 - 1,43 \cdot V_s$$

$$G_B = 6,01 - 1,33 \cdot V_s$$

Curvas corriente-voltaje para todos los cationes alcalinos.

El modelo propuesto será utilizado para explicar las características de selectividad del canal expuestas anteriormente. Por este motivo, se utilizaron las curvas corriente-voltaje mostradas en la Fig. 12 para encontrar los parámetros del modelo de tres barreras para todos los iones alcalinos. Para ajustar las curvas experimentales y las teóricas, se hicieron ajustes preliminares en que se dejó al computador en libertad de cambiar los siete parámetros que definen al modelo. Como resultado de este primer ajuste, resultaron conjuntos de los siete parámetros para todos los iones estudiados. En seguida, se sacó el promedio aritmético de los parámetros de posición y se le dio este promedio como parámetro fijo al programa para realizar un segundo ajuste de los parámetros energéticos. El resultado de este segundo ajuste dio los parámetros que aparecen en la Tabla 6. Con estos parámetros se calcularon las curvas que aparecen como líneas continuas en la Figura 12. Se puede concluir que el modelo reproduce las variaciones de selectividad del canal con el potencial aplicado.

Los datos de la Tabla 6 muestran que la secuencia de las energías de unión de los iones a ambos sitios del canal es : $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$. Para las barreras, se obtuvieron las siguientes secuencias: G_A : $\text{Li} > \text{Na} = \text{K} > \text{Rb} > \text{NH}_4 > \text{Cs}$; G_B : $\text{Na} > \text{K} > \text{NH}_4 > \text{Rb} > \text{Cs} > \text{Li}$ y G_C : $\text{NH}_4 > \text{Rb} > \text{Cs} > = \text{K} > \text{Na} > \text{Li}$.

TABLA 6

Parámetros de energía del modelo de tres barreras para el canal de hemocianina.

Las curvas i/V hechas en las condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 12 se usaron para encontrar los parámetros del modelo de tres barreras como se describe en el texto. Los parámetros D_1 y D_2 fueron fijados en 0,15 y 0,34, respectivamente. Los valores se expresan en kcal/mol y representan el valor central y su desviación standard.

CATION	G_1	G_2	G_A	G_B	G_C
Li	$-2,01 \pm 0,04$	$-0,94 \pm 0,08$	$2,89 \pm 0,12$	$5,65 \pm 0,03$	$5,76 \pm 0,06$
Na	$-1,69 \pm 0,04$	$-0,50 \pm 0,03$	$3,77 \pm 0,05$	$5,05 \pm 0,04$	$5,56 \pm 0,02$
K	$-1,26 \pm 0,02$	$-0,41 \pm 0,01$	$3,63 \pm 0,02$	$5,11 \pm 0,01$	$5,38 \pm 0,09$
Rb	$-1,04 \pm 0,03$	$-0,32 \pm 0,02$	$3,88 \pm 0,02$	$5,32 \pm 0,01$	$5,09 \pm 0,01$
Cs	$-0,99 \pm 0,07$	$1,09 \pm 0,09$	$4,39 \pm 0,05$	$5,61 \pm 0,05$	$5,38 \pm 0,02$
NH ₄	$-1,31 \pm 0,02$	$-0,22 \pm 0,01$	$3,91 \pm 0,02$	$5,24 \pm 0,02$	$4,96 \pm 0,05$

Pruebas del modelo de tres barreras.

Los resultados presentados hasta aquí prueban que el modelo de tres barreras es capaz de explicar satisfactoriamente el comportamiento de la corriente en función del potencial para todos los iones alcalinos. Para aceptar la hipótesis que este modelo representa el mecanismo de transporte de iones a través del canal de hemocianina, es necesario hacer predicciones que se comprueben experimentalmente en forma independiente de las observaciones que sirvieron para plantear el modelo. Si el modelo es validado de esta manera, será posible utilizar los valores de energía para los iones en el interior del canal como una explicación posible de la selectividad del canal, que depende tanto de la concentración de iones como del potencial aplicado. Por otra parte, las secuencias de energía de unión entre los iones y los sitios pueden ser indicadores de la naturaleza fisicoquímica de los sitios de unión del canal.

1. Predicción de la curva corriente-voltaje en una membrana sin carga de superficie.

Las rectas que aparecen en la Figura 16 relacionan el valor que toman los parámetros G_1 , G_2 y G_B con el potencial en la superficie de la membrana. De dichas líneas se pueden predecir de los parámetros en una membrana sin carga. En la Figura 17 se encuentran los valores experimentales de la curva i/V en sulfato de potasio en una membrana de fosfatidiletanolamina, que es neutro al pH de los experimentos. La línea continua es la curva teórica calculada usando el modelo de tres barreras. Considerando que en este caso no se permitieron nuevos ajustes, la correspondencia entre los valores

experimentales y teóricos es buena y permite concluir que el modelo es capaz de predecir las diferencias de la relación conductancia-potencial entre membranas cargadas y neutras. La razón por la cual todos los experimentos se realizaron en una membrana cargada fue que la incorporación de la hemocianina en membranas sin carga es muy lenta y difícil, y muy a menudo la membrana se rompía antes de haber incorporado un número suficiente de canales como para hacer las curvas corriente-voltaje.

(El texto continúa después de la Fig. 17)

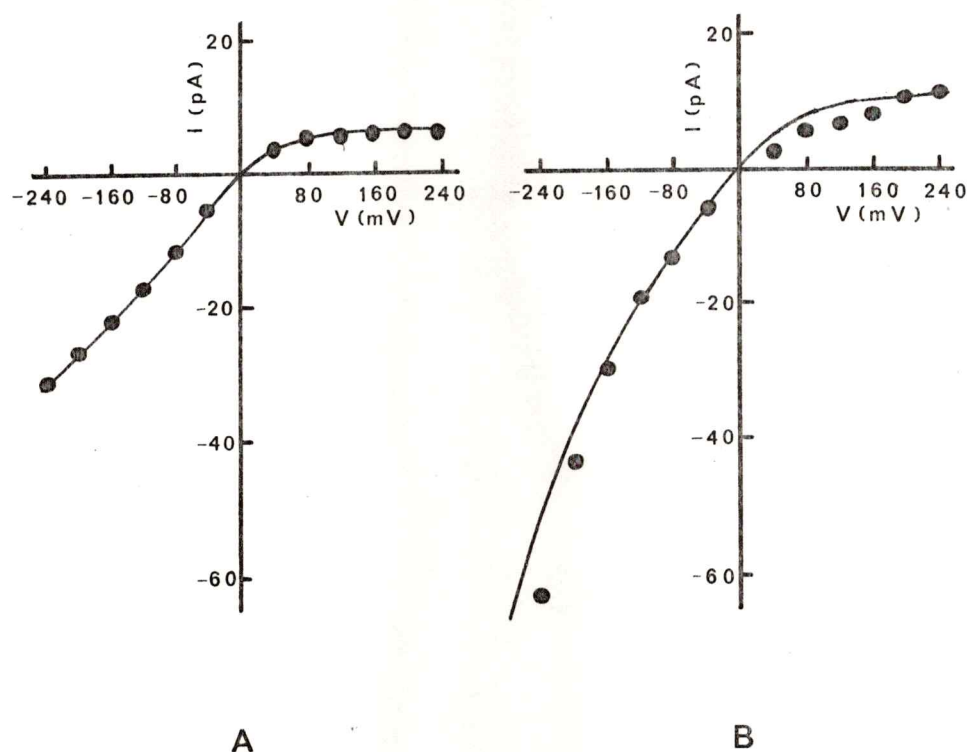


FIGURA 17

Relación corriente voltaje en el canal de hemocianina incorporado en una membrana sin carga de superficie.

Los experimentos se realizaron en sulfato de potasio 50 mM, Tris-Cl 5 mM, pH 7. Curva A: membrana de lípidos de frejol de soya/colesterol 1/1 (cargada negativamente). Curva B: membrana de fosfatidiletanolamina (superficie neutra). Las curvas fueron calculadas usando directamente los parámetros del modelo para la curva A, y para la curva B, evaluando los parámetros G_1 , G_2 y G_B de la Figura 16 para potencial de superficie igual a cero.

2. Predicción de la relación entre conductancia y concentración.

Otra prueba independiente del modelo es la predicción de las curvas conductancia-concentración. Para ello, se calcula la corriente de acuerdo a las ecuaciones del Apéndice 1, para todas las concentraciones usadas a potencial constante (-50 mV). Es necesario notar que en este cálculo debe incluirse el efecto de la variación del potencial de superficie sobre tres parámetros del modelo. Esto se llevó a cabo usando la dependencia entre estos parámetros y el potencial de superficie descrito en la Figura 16. Conociendo el valor de cada parámetro a una concentración dada (50 mM) y dadas las rectas de regresión que aparecen en la leyenda de la Figura 16, se puede estimar el valor que tomarán los parámetros a cualquier concentración. Como resultado del cálculo, se obtienen las curvas sólidas que aparecen en la Figura 18, en la cual se han repetido los valores experimentales de la Figura 4. Nuevamente se obtiene una buena correspondencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, considerando que no se permitieron nuevos ajustes.

(El texto continúa después de la Fig. 18)

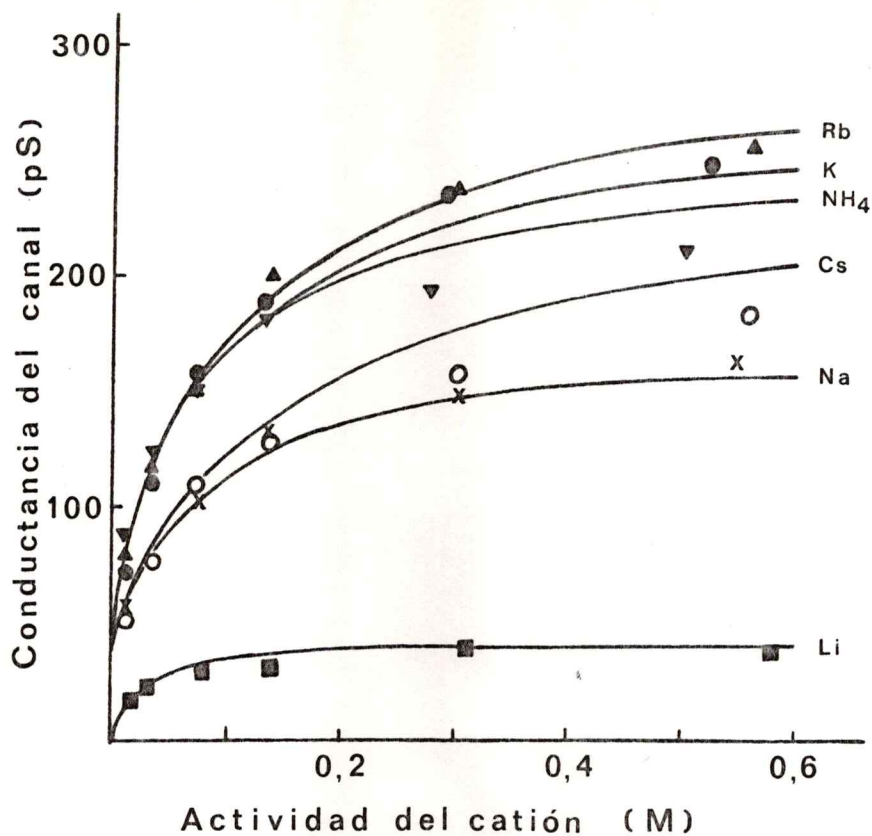


FIGURA 18

Relación conductancia-concentración en el canal de hemocianina.

Los puntos son los resultados experimentales de la medición de la conductancia del canal único en las condiciones descritas en la Fig. 5. Las curvas se calcularon con los parámetros del modelo de tres barreras que aparecen en la Tabla 6, considerando el efecto de la carga superficial de acuerdo a la Fig. 16, y utilizando las ecuaciones que se describen en el Apéndice.

Li, (■); Na, (×); K, (●); Rb, (▲); Cs, (○); NH₄ (▼).

3. Reproducción de los potenciales biiónicos.

Los potenciales biiónicos generados cuando una membrana tratada con hemocianina separa dos soluciones que contienen cationes alcalinos a la misma concentración pueden ser calculados de acuerdo al modelo de tres barreras, según se describe en el Apendice . En síntesis, el cálculo consiste en evaluar la corriente que circula a través del canal a diferentes potenciales cuando los iones a ambos lados de la membrana son diferentes e interpolar el valor del potencial cuando la corriente que circula es cero. Este potencial se usó para calcular las razones de permeabilidad de acuerdo a la ecuación (1). El cálculo de estas razones dio como resultado los valores que aparecen en la Tabla 7, columna 2. Los valores experimentales (columna 1) son los mismos que aparecen en la Tabla 2 y se han repetido en esta Tabla para comparación. Nuevamente se obtienen valores teóricos del modelo de tres barreras que están de acuerdo con los experimentales, por lo que este cálculo es un apoyo adicional al modelo.

Cuando la membrana separa dos soluciones del mismo o diferente ión pero a concentraciones diferentes, también surge un potencial eléctrico a través de ella. Cuando estos potenciales se calculan para condiciones en las cuales la membrana separa sulfato de potasio a concentración constante a un lado de soluciones de concentraciones variables de sulfato de potasio o de litio en el otro, se obtienen las curvas solidas de la Figura 19. Las curvas obtenidas describen bien los valores experimentales.

TABLA 7

Razones de permeabilidad entre cationes alcalinos y potasio en el canal de hemocianina.

Las razones experimentales son las mismas que aparecen en la Tabla 2. Las razones de permeabilidad deducidas del modelo de tres barreras fueron calculadas como se describe en el Apéndice. El valor de dispersión que aparece entre paréntesis corresponde a la variación que se obtenía en el cálculo de la razón de permeabilidades al usar los valores centrales de los parámetros del modelo más y menos una desviación standard. Los valores experimentales son la media aritmética y el error standard de, al menos, tres determinaciones.

CATION	P_x/P_K (exp)	P_x/P_K (modelo)
Li	0,35 (0,01)	0,51 (0,08)
Na	0,81 (0,01)	0,82 (0,13)
Rb	1,05 (0,03)	1,16 (0,13)
Cs	0,89 (0,03)	0,77 (0,12)
NH ₄	1,52 (0,03)	1,30 (0,16)

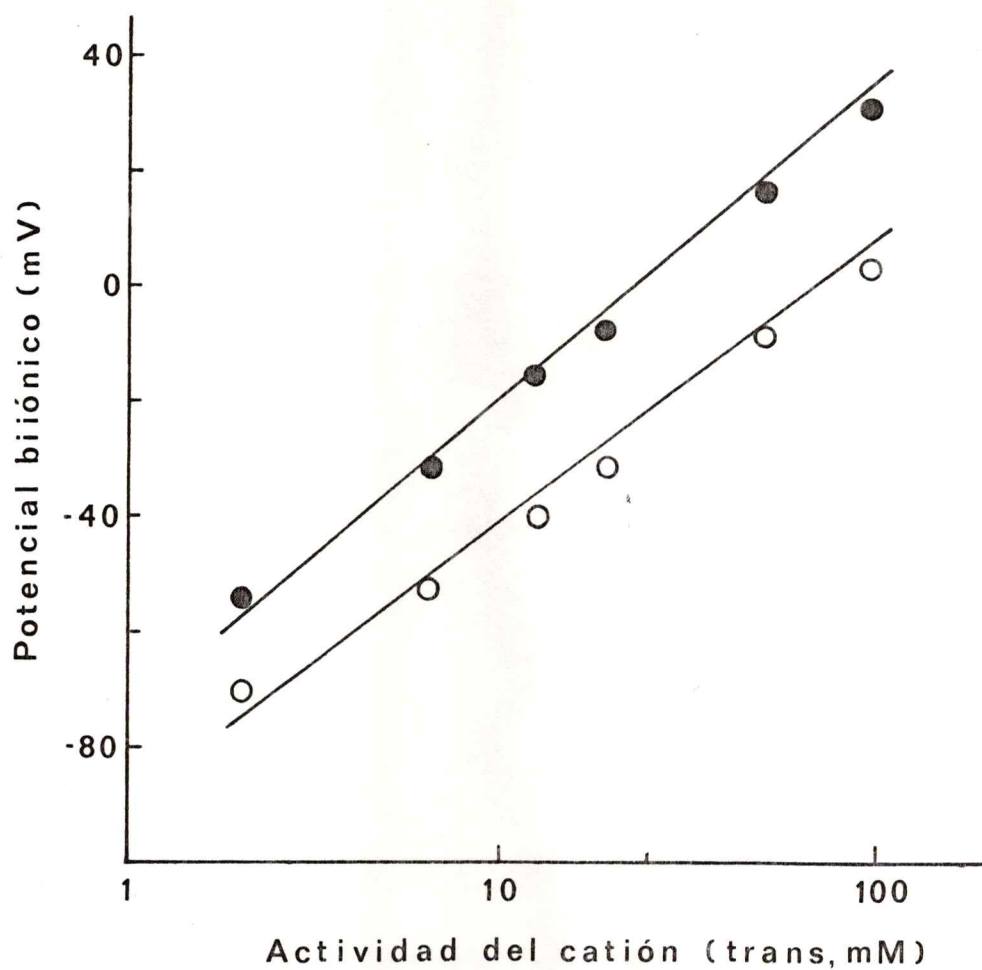


FIGURA 19

Potenciales biiónicos en membranas tratadas con hemocianina que separan soluciones de sulfato de potasio y de litio.

Lado *cis*: K_2SO_4 14,3 mM; lado *trans*: K_2SO_4 (●) o Li_2SO_4 (○) a las concentraciones que aparecen en la abscisa. Los puntos son experimentales y las líneas son las calculadas de acuerdo al modelo.

4. Predicción de fenómenos de inhibición: competencia potasio-litio.

El litio es el ión que pasa menos a través del canal de hemocianina, pero su conductancia es diferente de cero. Es posible predecir, en términos del modelo de conducción propuesto, que el litio actúe como un inhibidor competitivo, ya que tiene una gran afinidad por los sitios del canal, pero atraviesa el canal con mucha dificultad.

Cuando se mide la conductancia del canal en mezclas de potasio y litio, se obtienen los resultados que aparecen en la Figura 20. Se observa que efectivamente la corriente que pasa por el canal es menor a medida que aumenta la concentración de litio, y el efecto inhibitorio del litio es menor a medida que aumenta la concentración de potasio, como si efectivamente ambos iones estuviesen compitiendo.

Sin embargo, el efecto esperado no es exactamente comparable a un típico inhibidor competitivo por dos razones:

1. El litio es transportado a través del canal, aunque a una velocidad mucho menor que el potasio. Esto significa que su efecto inhibitorio va a ser menor que si no pasara por el canal, ya que también contribuye a llevar iones a través del canal.

2. La presencia del litio hace disminuir el potencial en la superficie de la membrana, si se compara con el caso en que el potasio está solo, lo cual aumenta la conductancia del canal porque disminuye la energía del ligamen a los sitios (G_1 y G_2 se hacen menos "profundos") sin modificar las barreras de

acceso. Esto hace que aumente la velocidad de salida de los iones desde el canal a las fases acuosas.

El modelo debería ser capaz de predecir los valores de conductancia del canal en mezclas de potasio y de litio a diferentes concentraciones. Para evaluar estas corrientes, se procede como se explica en el Apéndice. En resumen, el cálculo consiste en considerar ahora que el canal puede encontrarse en uno de cinco estados diferentes; vacío, con potasio en el sitio 1, con potasio en el sitio 2, con litio en el sitio 1 o con litio en el sitio 2. Primero se calculan las probabilidades de los estados de un ión independientes del otro para cada estado y luego se combinan para obtener las probabilidades finales. Por ejemplo, la probabilidad del potasio de estar en el sitio 1 será la probabilidad de encontrarse allí si no hubiera litio multiplicada por la probabilidad que el litio no esté en ese sitio. Las líneas sólidas son el resultado del cálculo usando los parámetros del modelo y considerando la variación del potencial superficial con la concentración iónica. Nuevamente, el modelo da cuenta satisfactoriamente de los resultados experimentales.

(El texto continúa después de la Fig. 20)

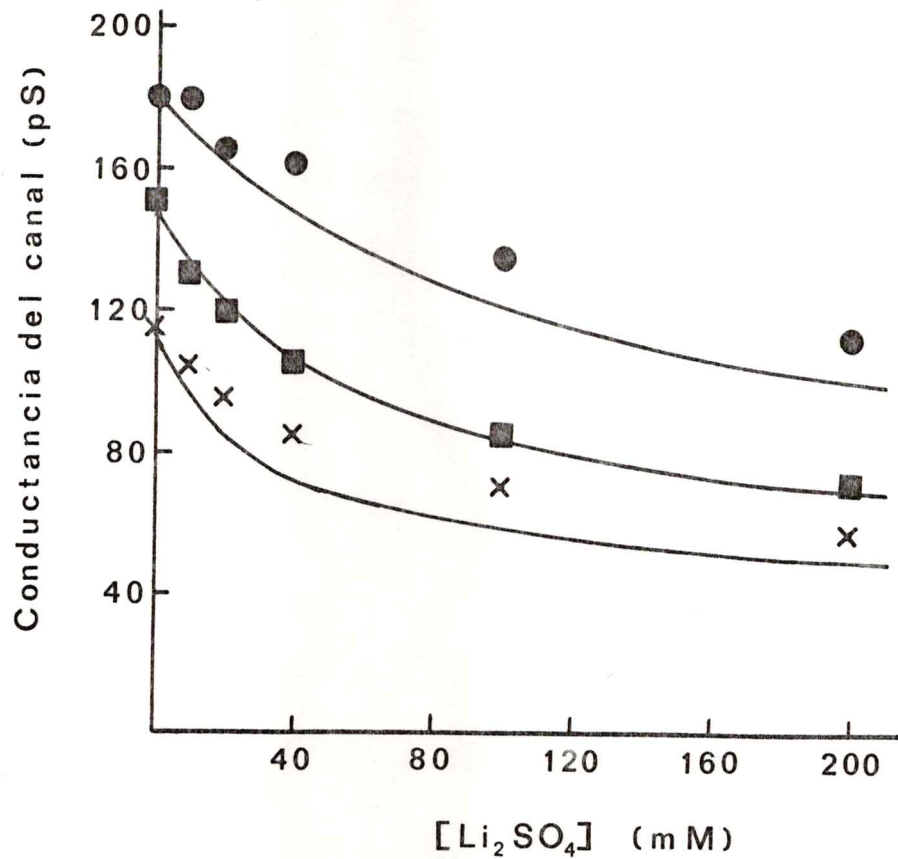


FIGURA 20

Competencia entre potasio y litio en el canal de hemocianina.

Los puntos son los valores experimentales de la conductancia del canal único en soluciones de K_2SO_4 25 mM (X), 50 mM (■) ó 100 mM (●) más las concentraciones de litio que aparecen en la abscisa. Las líneas son calculadas con el modelo de tres barreras, usando los parámetros del potasio y el litio y considerando el efecto de la carga de superficie, como se describe en el Texto y en el Apéndice .

Resumen de resultados.

El canal de hemocianina se comporta como una enzima de membrana a través de la cual pasan cationes monovalentes. El mecanismo de transporte no es el de una simple difusión a través de un poro lleno de agua, y queda bien descrito por un modelo en el cual se consideran dos sitios de unión para los iones separados de las fases acuosas y entre sí por barreras de energía. Las ecuaciones de flujo predichas por este modelo así como también los potenciales que se generan a través de la membrana en diversas circunstancias y los fenómenos de competencia iónica dentro del canal describen bien lo encontrado experimentalmente. La validación experimental del modelo permite sacar conclusiones de los valores de energía encontrados para los iones alcalinos dentro del canal, y discutir cómo las secuencias de energía encontradas para los iones en los sitios de unión del canal pueden dar alguna indicación de la estructura de los grupos involucrados en el ligamen.

DISCUSION

La hemocianina como un canal asimétrico.

Cuando se descubrió que la hemocianina formaba canales iónicos en bicapas y que las curvas corriente-voltaje en estado estacionario eran no-lineales, la primera explicación que surgió fue suponer un cambio de la conductancia asociada a un cambio de estructura del canal en respuesta al potencial. Es decir, suponer una "compuerta" (gate) cuyo estado depende del potencial aplicado. Efectivamente, cuando se aplicaban potenciales positivos en el lado *trans*, el canal fluctuaba entre varios estados de conductancia, pero la corriente "instantánea" que pasaba a través de la membrana parecía ser siempre menor para potenciales positivos que negativos de la misma magnitud. En un trabajo de Latorre *et al*, 1975, pareció resolverse el problema: cuando estos autores extrapolaban la corriente a tiempo cero en un sistema rápido de registro de corriente, las curvas a + y - 50 mV parecían extrapolarse al mismo punto, indicando que el canal tenía un estado abierto de muy "corta vida", pero esencialmente óhmico.

Paralelamente, Alvarez *et al* (1977) describieron que la conductancia del canal abierto era una función saturante de la concentración iónica: esto los hizo postular un modelo "michaeliano" para el canal: tenía un sitio al cual se ligaban específicamente los iones y cambiando los valores de las constantes de disociación con este sitio pudieron explicar que la

conductancia en potasio fuese 5 veces mayor que en litio.

Estas dos observaciones juntas son un poco contradictorias: por un lado, un canal que presenta un comportamiento "óhmico" cumple con los requisitos para ser considerado un "poro acuoso", es decir, el mecanismo de transporte es como una difusión acuosa. Sin embargo, la conductancia medida en litio es alrededor de un 40% de la que se debería encontrar si es que los iones se estuvieran moviendo por difusión. Por otro lado, explicar la saturación de la conductancia con la concentración iónica y la selectividad K-Li suponiendo un sitio de ligamen es imposible de reconciliar con la idea de un poro acuoso.

Debido a esto, decidimos revisar los experimentos de registro rápido de corriente, sobretudo porque en los experimentos descritos por Latorre *et al*, 1975, la enorme corriente capacitiva transitoria que sigue al establecimiento del pulso no había sido compensada por medio alguno, de modo que el amplificador de corriente permanecía saturado mucho rato (1-2 ms) después de aplicado el pulso y la extrapolación a tiempo cero se hacía tomando en cuenta los datos de corriente que daba el amplificador cuando recién "volvía" de su estado saturado.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la hemocianina se comporta como un rectificador instantáneo, ya que las corrientes a potenciales positivos son menores desde tiempos tan tempranos como 1 μ s que las corrientes producidas por potenciales negativos de la misma magnitud (Fig. 13). Este resultado permite concluir que las curvas corriente voltaje de las Figs. 10, 11 y 12, hechas en la escala de los ms, realmente

reflejan que la relación entre la corriente y el voltaje no es lineal porque el mecanismo de transporte es diferente que una electrodifusión y no porque la estructura del canal cambie en respuesta al potencial; en esta última posibilidad, se necesita tiempo para que el cambio configuracional pueda producirse. Los tiempos que se describen para este tipo de procesos en otros canales son del orden de los ms (Latorre *et al*, 1982; Labarca *et al*, 1980; Miller, 1978; Hanke y Miller, 1983; Boheim *et al*, 1981), y en esta escala temporal, el canal de hemocianina ya presenta una clara rectificación, sin que se observen fluctuaciones discretas de la conductancia.

La hemocianina como una enzima de transporte.

El intento que mencioné antes de explicar la saturación de la curva corriente vs concentración iónica y la selectividad al potasio sobre la base de un modelo que contemple sitios de unión a los iones fue capaz de explicar satisfactoriamente ambas observaciones (Latorre *et al*, 1975). En términos de barreras de energía y sitios de ligámen, ese modelo puede esquematizarse como aparece en la Figura 21. Existe un sitio de unión separado de las soluciones por dos barreras energéticas que pueden o no ser iguales. En el tratamiento michaeliano clásico, se considera que la etapa limitante es la "salida" del producto, es decir, el salto a través de la barrera G_B . Con este modelo, la velocidad inicial de la reacción, cuando la concentración del producto tiende a cero, está dada por la ecuación de Michaelis-Menten.

Este modelo simple para el paso de un ión desde un lado a otro de una

membrana, no puede, sin embargo, dar cuenta del comportamiento de la corriente en función del potencial eléctrico en el canal de hemocianina. La gran diferencia entre las corrientes a potenciales positivos y negativos mayores de 50 mV podrían explicarse suponiendo que las barreras de acceso que separan al sitio de las soluciones externas (G_A y G_B en la Fig. 21 B) son diferentes. Sin embargo, la forma de la curva i/V , que es superlineal a potenciales negativos altos y altas concentraciones iónicas, sublineal en todo rango de concentración a potenciales positivos altos y tiende a hacerse sublineal a potenciales negativos a bajas concentraciones, requiere, además, que la rapidez con que pasan los iones a través de alguna de las barreras sea dependiente del potencial aplicado. Introducir al campo cualquiera de las barreras del modelo de la Fig. 21, implica que la corriente que "entra" por el lado de la barrera variable siempre va a ser superlineal con respecto al voltaje porque la barrera bajaría con el potencial aplicado. Eso no podría explicar que a potenciales negativos, la curva sea sublineal o superlineal dependiendo de la concentración iónica.

(El texto continúa después de la Fig. 21)

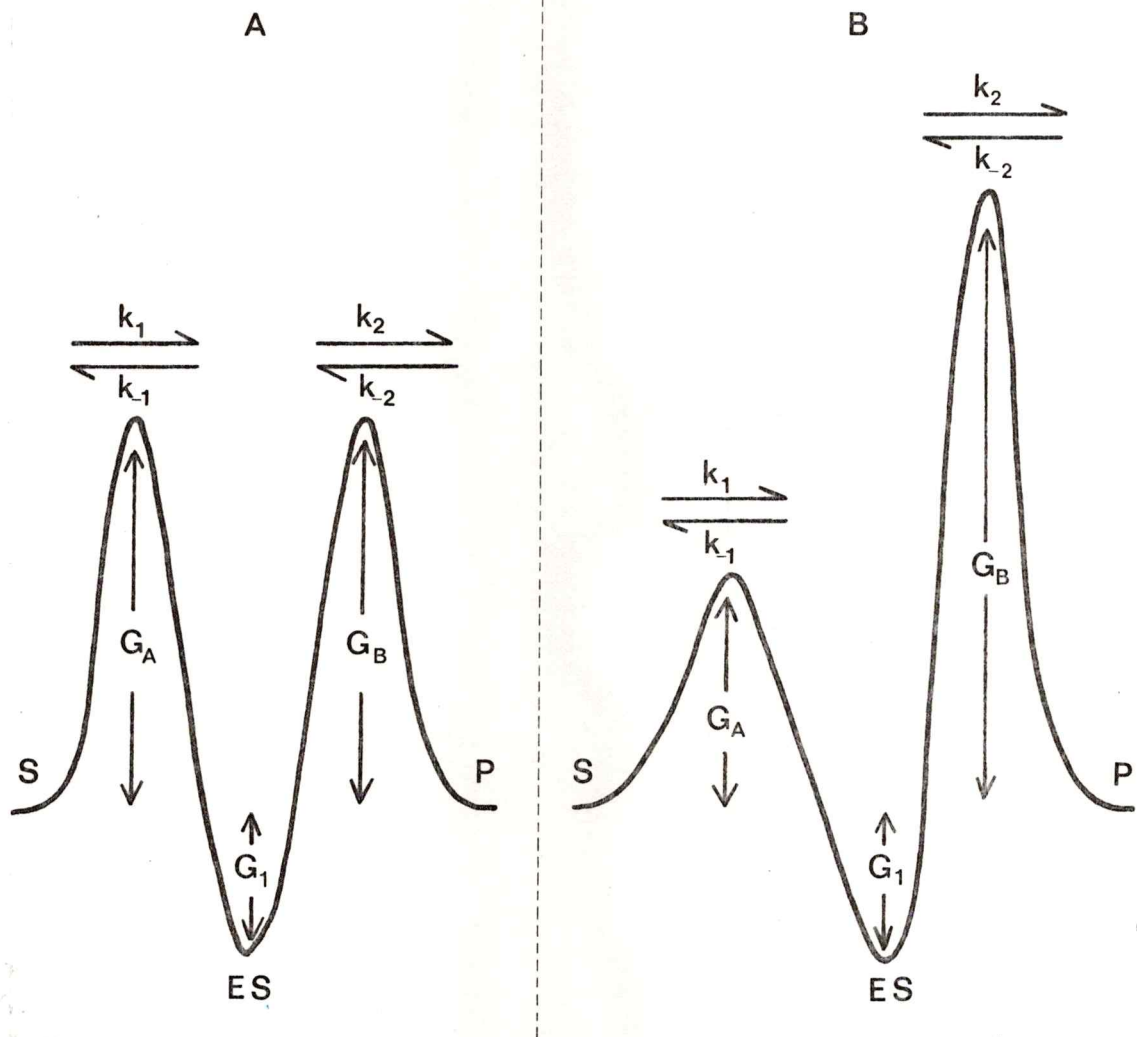


FIGURA 21

Esquema de un perfil de energía con un sitio de ligamen y dos barreras de energía.

Esta complejidad de la curva i/V puede explicarse introduciendo una complicación al modelo de la Fig. 21: además de las dos barreras de acceso, que son independientes del potencial y pueden dar cuenta de las curvas i/V saturantes, hay una barrera dentro del canal en la zona donde cae el potencial aplicado y que, por lo tanto, varía con el voltaje. El esquema de un modelo de este tipo se encuentra en la Figura 22 A. Los tamaños relativos entre las barreras de acceso y la barrera central se pueden ajustar de tal manera que, a concentraciones bajas, la etapa limitante sea la entrada, generando curvas i/V saturantes (Fig. 22 B) y a concentraciones altas, la etapa limitante sea la pasada a través de la barrera central que disminuye con el potencial, generando curvas i/V superlineales (Fig. 22 C). Si las barreras de acceso de un lado y otro son diferentes, se obtiene asimetría en la curva i/V : si una barrera de acceso es mucho más alta que la central, aun a altas concentraciones la etapa limitante será la entrada del ión a través de la barrera invariante, produciendo saturación de la corriente.

La aparición de la barrera central variable con el potencial, define automáticamente dos sitios de unión separados, que pueden o no ser sensibles al potencial aplicado. La fracción del potencial que sienten los sitios y la barrera central es determinada con el ajuste de las curvas i/V . En el caso del modelo postulado para el canal de hemocianina, se observa de los resultados que aparecen en la Tabla 6, que la barrera central siente alrededor de un 35% del potencial aplicado, el sitio 1, sólo el 15 % y el sitio 2 está fuera de la zona donde cae el potencial. Aun cuando las fracciones del potencial que sienten los sitios y barreras no significan distancia espacial, ya que en el desarrollo del modelo no se hace en ningún momento la suposición del campo constante (de acuerdo a Hille, 1975), el hecho que un sitio sea insensible al

potencial aplicado y el otro lo sea sólo débilmente, sugiere que están localizados en alguna zona cercana a las bocas del canal, una "antesala" del canal que no presenta una alta resistencia eléctrica.

(El texto continúa después de la Fig. 22).

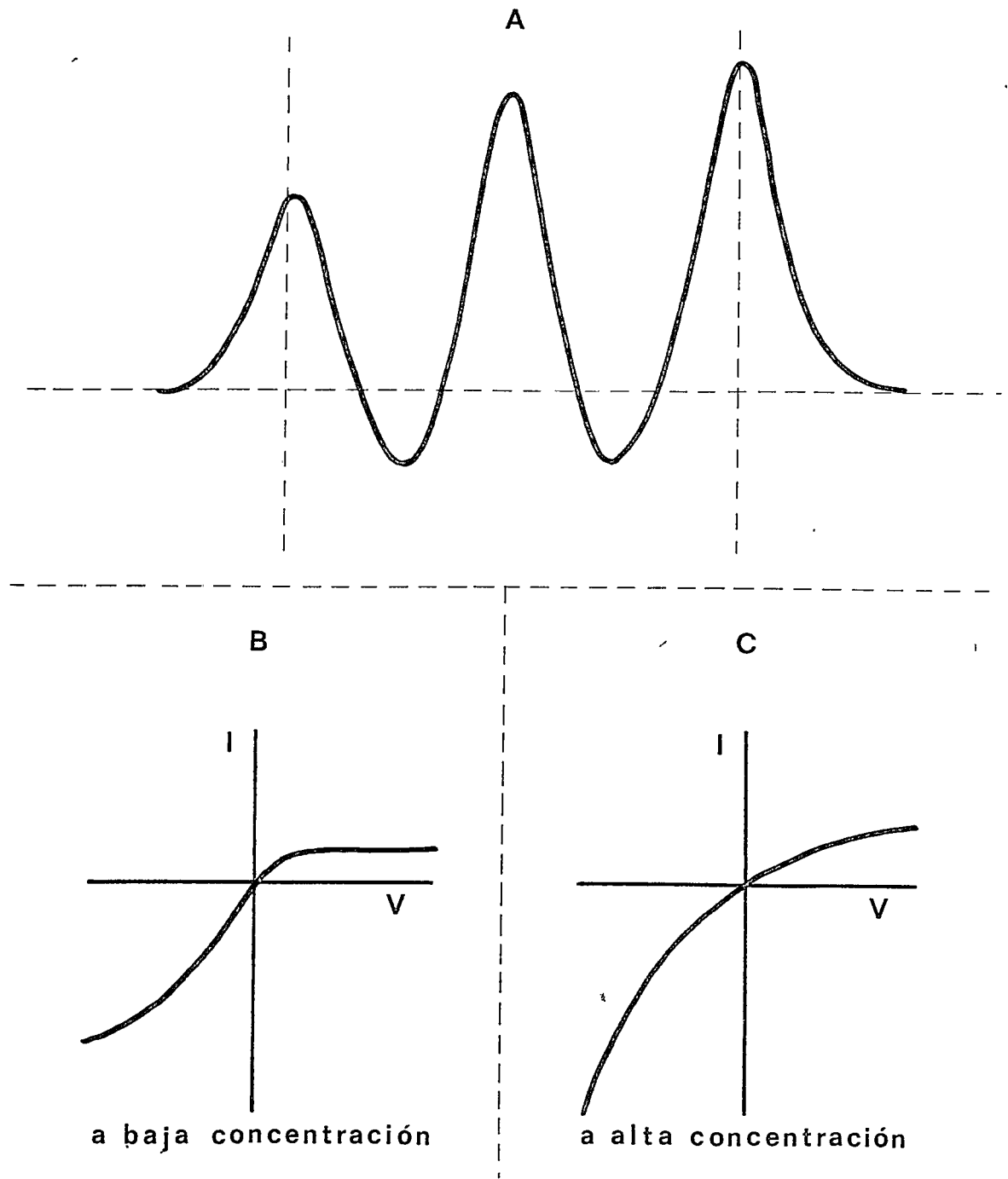


FIGURA 22

Esquema de un modelo de barreras para el paso de un ión a través de un canal que contiene dos sitios de ligamen separados por una barrera central.

Conductancia y permeabilidad en canales descritos por modelos de barreras.

En la Figura 23 aparece el esquema general de un modelo de sitios y barreras para un canal. La función que relaciona la conductancia con la concentración de iones en un canal que acepta un solo ión, de acuerdo a este modelo, está dada por (Lauger, 1973):

$$g = \frac{a \cdot g_m}{K_{0.5} + a} \quad (8)$$

en que a es la concentración de iones en la solución, g_m es la conductancia máxima y $K_{0.5}$ es la concentración iónica a la cual se obtiene la mitad de g_m .

Las funciones que relacionan a las constantes, $K_{0.5}$ y g_m , con las energías de los iones en las barreras y en los sitios, están descritas por las relaciones:

$$K_{0.5} \propto \sum \exp(-w_i/RT) \quad (9)$$

$$g_m \propto \frac{\sum \exp(-p_i/RT)}{\sum \exp(-w_i/RT)} \quad (10)$$

en que w_i son las energías del ión en los sitios de unión y p_i , las energías del ión en las barreras y R y T tienen sus significados habituales.

De estas relaciones, se desprenden las siguientes conclusiones:

1. La conductancia alcanza un valor máximo con la concentración iónica (saturación).
2. La conductancia depende tanto de la energía de unión a los sitios como de la energía en las barreras de activación.
3. La constante $K_{0,5}$ depende sólo de la energía de ligamen con los sitios.

La razón de permeabilidades, P_X/P_Y , definida por la ecuación (1), se relaciona con las energías del ión en el canal de acuerdo a la siguiente expresión:

$$P_Y/P_X = \frac{\exp(-p_{0X}/RT(1 + \sum \exp((p_{iY} - p_{0Y})/RT))}{\exp(-p_{0Y}/RT(1 + \sum \exp((p_{iX} - p_{0X})/RT))} \quad (11)$$

en que X e Y representan a dos iones diferentes que se encuentran a uno y otro lado de la membrana, p_0 representa la energía en las barreras de acceso al canal y p_i , la energía en las barreras internas. Esta relación indica que la razón de permeabilidades es independiente de la energía de ligamen de los iones a los sitios. Por esta razón, estos modelos pueden explicar secuencias de selectividad diferentes si se miden razones de conductancia o de permeabilidad.

Si hacemos la suposición que, dentro de un canal que acepta un solo

ión, los valores de p_i para dos iones diferentes, X e Y, difieren todos en la misma magnitud al comparar las diferentes barreras, es decir, se cumple la relación:

$$(p_{iY} - p_{iX})/RT = \Delta p/RT = \text{cte} \quad (12)$$

entonces, la ecuación (11) se transforma en:

$$P_Y/P_X = \exp (-\Delta p)/RT \quad (13)$$

Combinando las ecuaciones (9), (10) y (13), se obtiene la relación:

$$(g_{mY}/g_{mX}) \cdot (K_{0,5X}/K_{0,5Y}) \cdot (P_X/P_Y) = 1 \quad (14)$$

La ecuación (14) describe, entonces, una condición que deberían cumplir aquellos canales que aceptan un solo ión y en los cuales, además, la diferencia de energías de activación entre dos iones es constante en todas las barreras. Esta propiedad ha sido usada como "diagnóstico" para canales que cumplen ambas condiciones. Si se observan los valores de energía en las barreras para todos los cationes alcalinos en el canal de hemocianina, que aparecen en la Tabla 6, se puede apreciar que Δp no es constante cuando se comparan los diferentes cationes con el potasio. Esta observación permite esperar que en este caso, no aplique la ecuación (14). Cuando se calcula la relación con los valores experimentales, se obtienen los valores que aparecen en la Tabla 8, todos muy cercanos a uno, contrariamente a lo esperado. Este resultado sugiere que el valor diagnóstico de la relación (14) es limitado, ya que para canales tan poco selectivos como el de

hemocianina, en que todas las razones que contribuyen a la relación (14) son cercanas a uno, no es difícil imaginar que el producto de ellas sea uno. La sensibilidad de este método de diagnóstico es muy pobre.

(El texto continúa después de la Tabla 8).

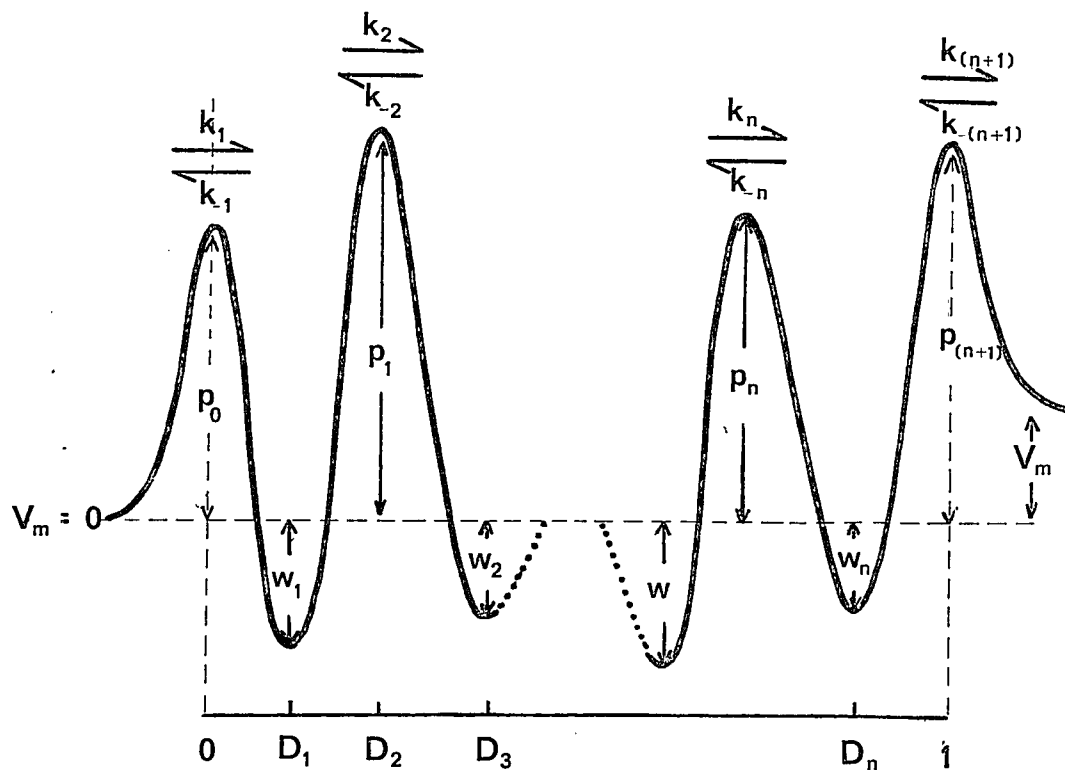


FIGURA 23

Esquema general de un modelo de sitios de ligamen y barreras en serie

El esquema representa las energías del ión en el canal cuando el potencial aplicado es igual a cero. Los valores de p_i y w_i representan las energías del ión en las barreras y los sitios, respectivamente. Los valores de energía cambian cuando se aplica una diferencia de potencial, V_m , a través de la membrana, dependiendo de la fracción D_i del potencial que exista en cada sitio o barrera.

TABLA 8

Relación entre razones de conductancia, permeabilidad y constantes de disociación para los cationes alcalinos en el canal de hemocianina.

Los valores representan la media aritmética y su error standard.

CATION (X)	$(g_{mX}/g_{mK}) \cdot (K_{0,5K}/K_{0,5X}) \cdot (P_K/P_X)$
Li	1,30 ± 0,51
Na	0,99 ± 0,17
Rb	0,94 ± 0,16
Cs	1,05 ± 0,17
NH ₄	1,03 ± 0,14

La contribución del potencial de superficie.

La carga negativa que tiene la fosfatidilserina que está contenida en los lípidos de frejol de soya produce un potencial eléctrico negativo en la solución acuosa que está inmediatamente adyacente a la bicapa, comparado con un potencial cero en el seno de la solución. En términos de la teoría de la doble capa difusa (Guy, 1910; Chapman, 1913), la magnitud del potencial de superficie depende de la concentración iónica de la solución y de la densidad de cargas de la membrana y disminuye a medida que aumenta la distancia a la membrana de una manera exponencial, si la magnitud del potencial no es muy grande:

$$\psi(x) = \psi(0) \exp(-\kappa \cdot x) \quad (15)$$

en que $\psi(x)$ es el potencial en la solución a una distancia x de la membrana, $\psi(0)$ es el potencial en la solución que está inmediatamente adyacente a la membrana y κ es la constante de la exponencial. La distancia a la cual el potencial decae a $1/e$ veces su valor en la superficie es el largo de Debye, $1/\kappa$, que depende de la concentración iónica de la solución de acuerdo a la siguiente relación:

$$1/\kappa = (\epsilon_r \cdot k \cdot T / 4\pi \cdot N \sum c_i \cdot z_i^2 \cdot e_0^2)^{1/2} \quad (16)$$

en que ϵ_r es la constante dieléctrica de la solución, k es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta, e la carga electrónica, N el número de Avogadro, c_i , la concentración de los iones en la solución y z_i la valencia del ión i .

Aplicando la ecuación (8) a las concentraciones de K_2SO_4 utilizadas en los experimentos de la Figura 15, se obtienen las distancias de Debye que aparecen en la Tabla 9.

La presencia de grupos cargados negativamente en los lípidos que forman una bicapa produce un aumento de la conductancia a cationes mediada por transportadores como nonactina y valinomicina (McLaughlin, 1977) y también aumentan la conductancia del canal de gramicidina, selectivo a cationes (Apell *et al*, 1977). Estos resultados se explican por el aumento local de la concentración de cationes que se produce como resultado de la existencia del potencial de superficie.

Sin embargo, en el caso del canal de hemocianina, se observa que la conductancia es menor en una membrana cargada que en una sin carga, como se aprecia en la Fig. 17, donde la conductancia del canal en membranas hechas de PE es mayor que en membranas que contienen PS, sobretodo a potenciales negativos altos.

Esta aparente paradoja se puede explicar en términos del modelo de barreras propuesto para este canal: si el potencial de superficie disminuye la energía de los iones en los sitios y en la barrera central y no en las barreras de acceso, en una membrana cargada será más difícil para el ión salir del canal porque el valle será más profundo y la barrera de salida igual a la de una membrana neutra. Es decir, la corriente que pasa a través de la membrana neutra será mayor. A potenciales bajos, cercanos a cero, la etapa limitante del transporte es el paso a través de la barrera central. Esta etapa no es muy afectada por el potencial de superficie porque tanto

las energías en los valles como en la barrera central varían más o menos lo mismo con el potencial de superficie. En otras palabras, los valores de k_2 y k_{-2} (Fig. 14, Apéndice) no son muy afectados por el potencial de superficie. En cambio, a potenciales muy altos, la entrada o la salida se hacen limitantes y es en esas etapas donde el potencial de superficie tiene el mayor efecto, al variar diferencialmente las energías del ión en el sitio y en las barreras de acceso. Esto explica por que la diferencia de conductancia entre una membrana cargada y otra neutra se hace evidente sólo a potenciales aplicados grandes.

La pregunta que sigue es: ¿por qué el potencial de superficie no se siente en las barreras de acceso? La respuesta a esta pregunta podría encontrarse en las observaciones al microscopio electrónico de la hemocianina asociada a bicapas hechas por McIntosh *et al.*, 1980. Estos autores encontraron que la hemocianina es capaz de formar estructuras asociadas a bicapas de lípidos que sobresalen entre 2.5 y 4.5 nm de la superficie de la membrana. Si comparamos estas distancias con las distancias de Debye que aparecen en la Tabla 9, vemos que a 4 nm de la membrana se siente solo el 10% del potencial de la superficie en el caso extremo en que la concentración de la solución iónica es la menor de todas. En otras palabras, el hallazgo que las barreras de acceso son insensibles al potencial superficial, que puede explicar el hecho que la conductancia sea paradójicamente más baja en membranas cargadas negativamente, tiene una clara correlación con las estructuras que la hemocianina forma en la bicapa.

TABLA 9

Distancias de Debye para distintas concentraciones de sulfato de potasio.

La tercera columna representa la fracción del potencial de superficie, $\psi(s)$, que existe a una distancia de 4 nm desde la membrana, calculado con los largos de Debye de la segunda columna y la ecuación (8).

K_2SO_4 (mM)	$1/\kappa$ (nm)	$\% \psi(s)$
10	1.75	10.2
25	1.11	2.7
50	0.78	0.6
100	0.55	0.07

Tamaño del poro del canal de hemocianina.

Los resultados obtenidos para la conductancia del canal en soluciones de sulfato de los cationes orgánicos muestran que el ión etanolamonio, $r = 0,24$ nm, es el catión más pequeño que no puede pasar a través del canal. Hidroxilamonio, de radio $0,20$ nm, pasa a través del canal. Estos resultados indican que el radio del canal es menor que $0,24$ nm. A pesar que los tres cationes orgánicos de $r > 0,20$ nm probados no producen una conductancia diferente de cero, son capaces de bloquear la conductancia del potasio, según se ve en la última columna de la Tabla 3. Los valores de esta columna deben ser comparados con el valor de la conductancia del canal en K_2SO_4 25 mM que aparece en la misma Tabla y que es 134 ± 4.2 pS. Estos resultados indican que, si bien estos iones no pueden pasar por el canal, tienen acceso a alguna parte de la estructura que tiene un tamaño adecuado para acomodarlos.

Los resultados obtenidos de potenciales de flujo generados por gradientes de concentración de noelectrolitos concuerdan con los obtenidos de medidas de conductancia. El catión monovalente más grande que se usó en las medidas de conductancia fue el Tris, cuyo radio es de $0,29$ nm. Este ión no pasa a través del canal, de acuerdo a lo cual se puede concluir que la glucosa, con $0,33$ nm de radio, tampoco pasa. Es decir, el potencial de flujo obtenido con glucosa es el más grande que se puede generar. Los potenciales de flujo de urea y acetamida, de $r = 0,24$ nm, fueron iguales a los de glucosa. En cambio, la formamida, $r = 0,21$ nm, dio un potencial significativamente inferior al obtenido con glucosa. Estos resultados apoyan la conclusión anterior que el radio del canal, en alguna parte de su

estructura, no puede ser mayor que 0,24 nm.

Los resultados obtenidos para el radio indican que el canal tiene una zona estrecha donde los iones y el agua no pueden pasar sino en "fila india". De la magnitud del potencial de flujo y aplicando la ecuación (7), se llega a la conclusión que tres moléculas de agua acompañan al potasio en su paso por el canal. Considerando el diámetro de la molécula de agua (0,28 nm) y del ión potasio (0,26 nm), resulta que la zona estrecha del canal no tiene más de 1 nm de longitud. Otros canales estrechos y cortos han sido descritos en la literatura, como el canal de potasio de membranas de retículo sarcoplasmático encontrado por Miller y sus colaboradores (Miller, 1978; Coronado *et al*, 1980).

¿Qué parte de la molécula de hemocianina forma el canal?

La molécula de hemocianina de varios moluscos tiene una forma cilíndrica de 30 nm de diámetro y 30 - 35 nm de altura (Van Bruggen *et al*, 1963). Su peso molecular varía entre 2 y $9 \cdot 10^6$ (Senozan, 1976). Los estudios al microscopio electrónico de McIntosh *et al*, 1980, mostraron que cuando la hemocianina de *Megatura crenulata*, es decir, la misma que se ha utilizado en el presente trabajo, interactúa con bicapas o monocapas de lípidos, se observa la aparición de estructuras anulares asociadas a las membranas, que tienen un diámetro de 7 nm y un círculo interior, donde se acumula el colorante negativo, de 2 nm de diámetro. Apparently, estas estructuras no son las mismas subunidades que se obtienen preincubando la hemocianina a pH 8.5.

En el presente trabajo se muestra, sin embargo, que la hemocianina preincubada a pH 8.5 durante 24 hrs, tiene una mayor capacidad de formar canales en la bicapa que la preincubada a pH 7.0 (ver Fig. 7). Este resultado indica que la disociación de la molécula entera produce las subunidades que son responsables de la formación del canal. Desgraciadamente, no hay estudios de microscopía electrónica que muestren las subunidades que resultan de la disociación de hemocianina de *Megatura crenulata*. Es posible que exista alguna diferencia entre ellas y las de *Helix pomatia*, ya que McIntosh *et al*, 1980, muestran que la hemocianina de *Helix* es incapaz de aumentar la conductancia en bicapas de lípidos y, al mismo tiempo, no forma las estructuras anulares de 7 nm de diámetro que se observan con hemocianina de *Megatura crenulata*.

La pendiente de las rectas de la Figura 7 resulta cercana a uno, lo cual sugiere que sólo una molécula interviene en la formación del canal. Otros canales, como el de alameticina, por ejemplo, están formados por un gran número de subunidades y los cambios de conductancia del canal en función del potencial y del tiempo se explican por la formación transitoria de agregados entre dos o más subunidades (Bauman y Mueller, 1974; Boheim, 1974; Boheim y Kolb, 1978). En el caso del canal de hemocianina, constituido por una sola molécula, es fácil conciliar la hipótesis de una estructura asimétrica fija (un rectificador estructural). También es más fácil aceptar que el canal pueda contener sólo un ión a la vez si está formado por una molécula simple de proteína que si estuviera formado por un agregado de peso molecular cercano a 10.000.000.

Representación pictórica del canal de hemocianina.

En la Figura 24 aparece un esquema del canal de hemocianina que representa un intento por resumir los hallazgos y explicarlos sobre la base del modelo de tres barreras: arriba aparece el potencial de superficie suponiendo una solución de K_2SO_4 10 mM (largo de Debye 1.1 nm, Tabla 8). Al centro un esquema que representa la estructura posible del canal: formado por una sola molécula de proteína y sobresaliendo 4 nm del borde de la membrana hacia la fase acuosa. La parte de la estructura que sobresale tiene un diámetro de 7 nm, para dar cuenta de las observaciones microscópicas. También tiene una zona estrecha al interior, donde caería casi todo el potencial aplicado. Esta estructura se propone para explicar las siguientes observaciones: 1. Las barreras de acceso son insensibles al potencial de la superficie porque el canal sobresale más de dos largos de Debye. 2. Una boca ancha a la entrada del canal (de al menos 0,6 nm de diámetro) porque los cationes grandes, Tris ($d=0,58$ nm), TMA ($d=0,56$ nm) y etanolamina ($d=0,48$ nm) no pueden pasar pero bloquean el paso al potasio (Tabla 3). 3. Una zona estrecha, de un diámetro no mayor de 0,48 nm porque la urea y la acetamida no pasan a través del canal. Esta zona no tiene más de 1 nm de longitud, de acuerdo a los resultados obtenidos del potencial de flujo generado con glucosa.

En la parte inferior de la Figura, se ha dibujado el perfil de energía del potasio en el interior del canal cuando no hay potencial aplicado. Todas las posiciones que aparecen en este perfil están relacionadas con lo expuesto en los puntos 1, 2 y 3 del párrafo anterior: los picos de acceso en una zona donde el potencial de superficie ha caído a cero (es decir, al potencial de la

solución), el valle de energía del lado *cis*, que representa al ión en el sitio de ligamen 1, cercano al borde de la membrana, porque siente una pequeña fracción del potencial aplicado. El valle *trans*, que no es afectado por el campo aplicado, puede colocarse arbitrariamente en el borde *trans* de la membrana. Ambos valles se ubican en una zona relativamente ancha, si se hace la suposición que los iones grandes bloquean porque son capaces de ligarse a estos sitios. El pico central, en el interior de la zona estrecha, donde siente una fracción importante del potencial aplicado. Las distancias espaciales de los picos y los valles no tienen relación con las fracciones del potencial que se aplican en cada uno de ellos, ya que en la deducción de las ecuaciones no se hacen suposiciones acerca de la función que relaciona al potencial con la distancia dentro del canal.

(El texto continúa después de la Figura 24).

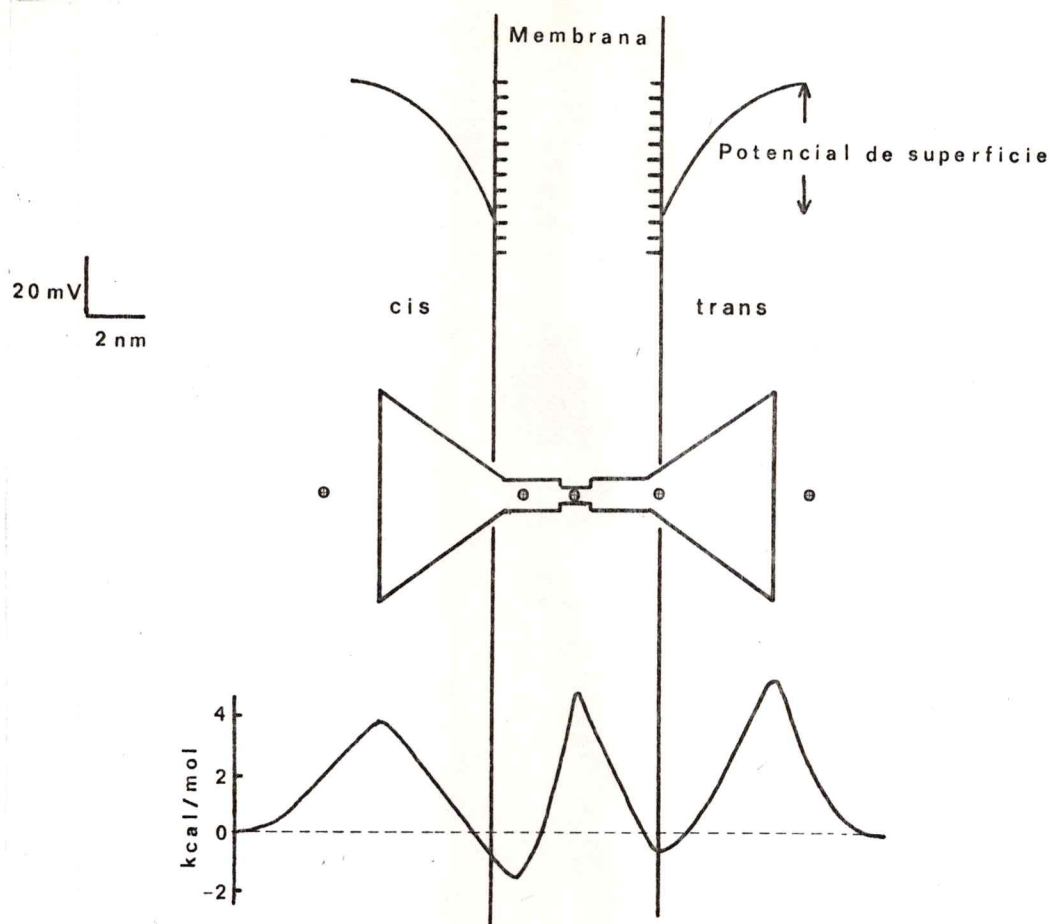


FIGURA 24

Representación gráfica del canal de hemocianina.

Arriba: el potencial de superficie en una membrana con un 30% de lípidos cargados negativamente en K_2SO_4 10 mM.

Al centro: un esquema que representa al canal ubicado de acuerdo a los hallazgos del efecto del potencial de superficie y con dimensiones externas compatibles con las observaciones microscópicas de McIntosh *et al*, 1980.

Abajo: el perfil de energía del potasio en el canal. Las alturas de los picos y valles son las que aparecen en la Tabla 5.

La selectividad del canal de hemocianina.

El término selectividad iónica se ha utilizado tradicionalmente para indicar la preferencia de un sistema de transporte por una determinada especie iónica, desde el punto de vista de los coeficientes de permeabilidad que surgen de la medición de potenciales biiónicos.

Sin embargo, las ecuaciones que se obtienen para la conductancia y la razón de permeabilidades aplicando los modelos de barreras (ver Apéndice), se observa que es posible obtener secuencias de selectividad diferentes si se consideran la conductancia o las razones de permeabilidad.

¿Qué es, entonces, la selectividad? En aquellos casos en que el proceso puede ser explicado en términos de difusión simple, la selectividad es la misma considerando cualquiera de los dos parámetros; en ese caso, el coeficiente de permeabilidad es el parámetro que relaciona el flujo con las diferencias de potencial electroquímico. Como el coeficiente de permeabilidad es independiente del potencial de membrana y de la concentración iónica de la solución, tanto las razones de permeabilidad como las de conductancia deberían ser independientes de la concentración y del potencial. En tales casos, la secuencia de selectividad está dada directamente por la secuencia de los coeficientes de permeabilidad.

El caso del canal de hemocianina es un ejemplo en que existen discrepancias entre la secuencia de selectividad encontrada por uno u otro método experimental y además, donde las secuencias de selectividad son afectadas por el potencial y la concentración:

1. La preferencia por el potasio sobre el litio es mucho más pronunciada cuando se analiza la conductancia iónica. De la Tabla 1, se deduce que g_{mLi}/g_{mK} es 0.14, en cambio P_{Li}/P_K es 0.35. Lo mismo es válido para Na y Cs, aunque en menor magnitud.
2. La secuencia de selectividades al amonio y el potasio es inversa: aparece más selectivo al K si se miden conductancias y más selectivo al amonio si se miden coeficientes de permeabilidad.
3. La secuencia de selectividad varía con el potencial aplicado, como se observa en las curvas i/V de la Figura 12: a potenciales negativos la conductancia a potasio, rubidio y amonio es parecida, en cambio a potenciales positivos, las conductancias a rubidio y amonio son mucho mayores que a potasio. Además, la selectividad cambia con la concentración iónica, como se aprecia en la Figura 18: a bajas concentraciones, la conductancia más alta se obtiene con amonio. A altas concentraciones, en cambio, potasio y rubidio muestran las conductancias más altas.

Todas las características de selectividad del canal de hemocianina que hemos enumerado pueden ser explicadas satisfactoriamente por el modelo de tres barreras propuesto anteriormente. Esto se refleja en los siguientes hechos:

1. Da cuenta de todas las características de las curvas i/V (Fig. 12). O sea, da cuenta de las variaciones de la secuencia de selectividad con el potencial.
2. Reproduce razonablemente las curvas conductancia-concentración cuando se utilizan los mismos parámetros obtenidos del ajuste de las curvas i/V (Fig.

18). Nuevamente, el modelo es capaz de generar la variación de las secuencias de selectividad, en este caso con la concentración de iones.

3. Reproduce las razones de permeabilidad medidas de los potenciales biiónicos con los mismos parámetros obtenidos del ajuste de las curvas i/V y da cuenta de las discrepancias entre las secuencias de selectividad diferentes cuando se analizan razones de permeabilidad o de conductancia (Tabla 7).

El modelo es capaz, entonces, de explicar las peculiaridades de la selectividad de este canal, y la explicación surge de los valores de energía que tienen los distintos iones dentro del canal, ya sea en los sitios de ligamen o en los picos. Lo interesante sería, a continuación, encontrar algún sentido a las secuencias de energía para los distintos iones. En otras palabras, usar estos valores no sólo como simples números empíricos que sirven para relacionar variables como la corriente que circula por el canal con el potencial o la concentración de iones, sino además, usarlos para deducir algunas características estructurales de los sitios de ligamen que presenta el canal a los iones que pudieran explicar las secuencias de selectividad encontradas.

George Eisenman (Eisenman, 1965), trabajando con electrodos de vidrio selectivos a cationes monovalentes y con otros sistemas selectivos artificiales, encontró que de las 120 secuencias posibles de selectividad (considerando a los 5 cationes alcalinos) sólo se daban experimentalmente 11. Partiendo de la suposición que la interacción entre el catión y el sitio era de origen electrostático y que el catión debía desprenderse al menos de una de sus moléculas de agua de hidratación antes de interactuar con el sitio,

Eisenman fue capaz de generar teóricamente las 11 secuencias de selectividad que había observado experimentalmente.

En síntesis, el planteamiento es el siguiente: la diferencia de energía del catión en el sitio cargado negativamente y en el agua, ΔU , es la que, en último término, determina la preferencia por uno u otro ligando (es decir, por el agua o por el sitio):

$$\Delta U = U_{\text{ion-sitio}} - U_{\text{ion-agua}} \quad (17)$$

En el caso en que la carga del sitio proviene de un dipolo, la energía de la interacción entre el catión y el sitio está dada por la relación:

$$U_{\text{ion-sitio}} = -332q(1/(r_n + r_+) + 1/(r_p + r_+)) \quad (18)$$

en que r_n y r_p son las distancias desde el centro negativo y positivo, respectivamente, a la superficie del dipolo, q es la carga del dipolo y r_+ es el radio del catión. En la Figura 25 se muestra un esquema, sacado de Krasne y Eisenman, 1973, que sirve para ilustrar el modelo de la interacción entre un catión y el agua o un dipolo diferente del agua. Se puede usar esta ecuación para calcular las energías de hidratación y las de interacción dipolo-catión, y estimar las diferencias para todos los cationes alcalinos. La Figura 26, sacada de Junge, D., 1981, muestra el resultado de graficar ΔU para todos los cationes alcalinos con sitios cargados negativamente de diferentes radios. Se observa que la función es diferente para cada catión, dependiendo de su radio, y las líneas se cruzan en diferentes puntos que corresponden a diferentes radios de sitio, originando 11 secuencias distintas de ΔU .

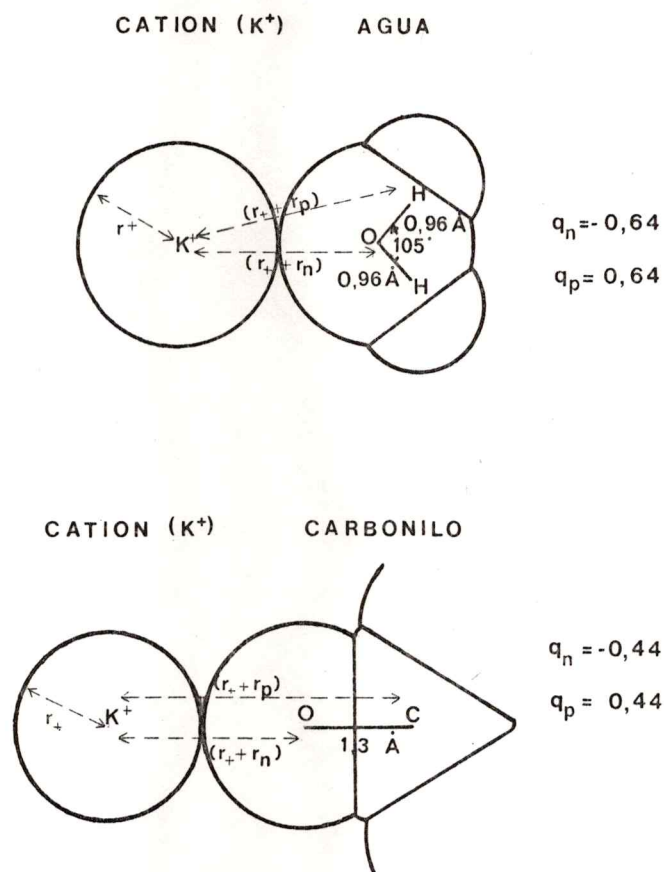


FIGURA 25

Esquema que representa la interacción de un catión monovalente con el agua y con otro ligando dipolar.

Las distancias que aparecen en este esquema corresponden a las del agua (arriba) y a un carbonilo (abajo).

Sacado de Krasne y Eisenman, 1973.

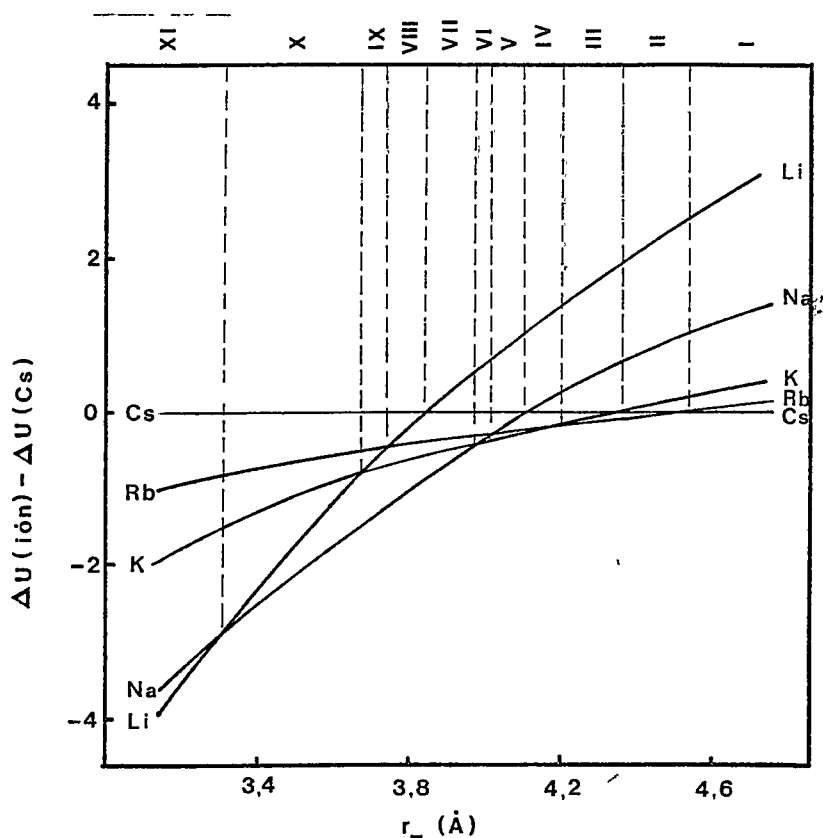


FIGURA 26

Energía de unión entre los diferentes cationes alcalinos y un sitio hipotético de carga -1 , referida a la del cesio.

Sacado de Junge, D., 1981.

Las 11 secuencias de selectividad son:

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| I. Cs > Rb > K > Na > Li | VII. Na > K > Rb > Cs > Li |
| II. Rb > Cs > K > Na > Li | VIII. Na > K > Rb > Li > Cs |
| III. Rb > K > Cs > Na > Li | IX. Na > K > Li > Rb > Cs |
| IV. K > Rb > Cs > Na > Li | X. Na > Li > K > Rb > Cs |
| V. K > Rb > Na > Cs > Li | XI. Li > Na > K > Rb > Cs |
| VI. K > Na > Rb > Cs > Li | |

Los valores de energía que aparecen en la Tabla 6 representan el cambio de energía libre entre la interacción de los iones con las diferentes zonas del canal y con el agua en la solución acuosa. En otras palabras, valores negativos indican que la interacción con el sitio del canal es más favorable que con el agua y viceversa. La observación de los valores de la Tabla muestra que la secuencia de energía para la interacción con los sitios 1 y 2 es $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$. Esta secuencia corresponde a la secuencia XI de Eisenman (Eisenman, 1962) que indicaría que se trata de un sitio que contiene un grupo capaz de generar un campo eléctrico fuerte. Para los picos de energía, se observa que el pico central muestra la secuencia VI de Eisenman, es decir, $\text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs} > \text{Li}$. El pico de acceso desde el lado *cis* muestra la secuencia XI y el del lado *trans*, la secuencia II o III: $\text{Rb} > \text{Cs} > \text{K} > \text{Na} > \text{Li}$.

Relación entre las energías del ión y la estructura del canal.

Las secuencias de energía para el ligamen de los cationes alcalinos y los sitios del canal de hemocianina indican que se trata de un ligando capaz de generar un campo eléctrico fuerte. Lo interesante sería poder aplicar la teoría desarrollada por Eisenman para reproducir los valores de las energías encontradas para la interacción entre los iones y los sitios. Sin embargo, es muy difícil hacer este cálculo en el caso presente, porque los parámetros que aparecen en la ecuación (18) son desconocidos. A continuación, se muestra un cálculo basado en una serie de suposiciones que tiene como único objetivo ilustrar como es posible generar valores de energía que son del orden de magnitud y que tienen la misma secuencia que los encontrados mediante el ajuste del modelo de tres barreras para el canal de hemocianina. Las

suposiciones que se hicieron para hacer el cálculo tienen alguna justificación:

1. El valor de q se estima en 0,6. El valor de q para el dipolo agua es 0,64. Para el grupo carbonilo, es 0,45.
2. El valor de r_n se estima en 0,14 nm, que es el radio del átomo de oxígeno.
3. El valor de r_p se estima en 0,27 nm. Es el valor que tiene en el carbonilo.
4. Se postula que el catión pierde sólo una molécula de agua de hidratación. El radio hidratado del litio es de alrededor de 0,23 nm (Moore, W. J., 1962; Bockris, J. y Reddy, A. K., 1970) y el radio del canal es de alrededor de 0,24 nm. Es decir, ninguno de los cationes alcalinos, aunque estuviera completamente hidratado, tendría problemas para "caber" en el canal.

Los resultados obtenidos de este cálculo, usando los valores de q , r_n y r_p y las ecuaciones (17) y (18) para todos los cationes alcalinos, están en la Tabla 10. Se observa que con un dipolo de las características descritas más arriba, la secuencia de energías de ligamen es $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$, es decir, la misma que se encontró para los sitios del canal de hemocianina con el ajuste del modelo de tres barreras. Esto aparece en la primera columna de la Tabla. Si se aumenta el valor de r_n de 0,14 a 0,17 nm y el de r_p de 0,27 a 0,30, entonces las

energías de ligamen que resultan son las de la segunda columna de la Tabla. Se observa que en ese caso, la secuencia de cambia a $Rb > K > Cs > Na > Li$ es decir, la secuencia III de Eisemann, que corresponde a un sitio con un campo eléctrico más débil. Con este cálculo se pretende concluir dos cosas:

1. Que es posible generar energías de ligamen del orden de las encontradas con el modelo del canal de hemocianina propuesto en este trabajo. Esto para poder concluir que los números obtenidos son compatibles con los que uno esperaría de la interacción entre los cationes alcalinos y un dipolo de características parecidas al carbonilo, por ejemplo.
2. Que basta con alejar levemente al catión alcalino del sitio (eso es lo que significa, en último término, aumentar los valores de r_n y r_p para el cálculo de la segunda columna) para que la secuencia de energías de ligamen cambie y se transforme en una secuencia correspondiente a un sitio de baja fuerza de campo. Este cálculo se ha hecho para concluir algo respecto al significado de la secuencia de energías encontrada con el modelo para la barrera central de energía: de acuerdo a Hille, 1975, las barreras de energía pueden tratarse como verdaderos "sitios" de ligamen donde la energía libre del ión es sólo levemente superior a la del ión en agua. En el caso del canal de hemocianina, entonces, basta con suponer que en su viaje por el canal, el ión se aleja de los sitios de ligamen, y este alejamiento hace que a mitad de camino entre ellos, sea como estar ligado a un sitio de más baja fuerza de campo que cualquiera de los dos sitios verdaderos.

Un problema que debe ser discutido es que el método de ajuste da como

resultado energías libres de los iones en los sitios y en las barreras. Las energías que se calculan con la ecuación (18) son energías internas, de modo que no es correcto considerarlas iguales en esta discusión. Sin embargo, la contribución del término entrópico al proceso de hidratación es pequeña (Robinson, R. A. y Stokes, R. H., 1959). Por otra parte, de acuerdo a Eisenman, el término entrópico también es despreciable en la interacción entre los cationes y el ligando (Eisenman, 1962).

TABLA 10

Diferencias entre energías de interacción alcalinos-agua y alcalinos con un ligando dipolar.

Los cálculos se hicieron aplicando las ecuaciones (17) y (18) con los parámetros que se describen en el texto. En la primera columna, $r_n = 0,14$ nm y $r_p = 0,27$ nm. En la segunda, $r_n = 0,17$ nm y $r_p = 0,30$ nm.

Cation	ΔU	
	(kcal/mol)	
Li	-9.7	-1.8
Na	-7.9	-2.4
K	-6.4	-2.6
Rb	-6.1	-2.7
Cs	-5.1	-2.5

El potencial que surge debido a la carga de imagen.

El problema que tiene todo este análisis está en que no ha sido posible generar con el cálculo de las diferencias de energía, números idénticos a los encontrados con el modelo de tres barreras. La diferencia más notoria es que los números que resultan son siempre menores (más negativos) que los experimentales.

Es posible que la explicación a ese hecho esté en la presencia dentro del canal de otro componente de energía para los iones, que surge del simple hecho de cambiar al ión desde un medio de alta constante dieléctrica (del agua) a un medio de menor constante dieléctrica, constituido por la proteína que forma el canal. Cuando el ión se aproxima a la membrana, induce en ella cargas del signo contrario que a su vez dejan zonas al interior del canal cargadas con el mismo signo del ión que se aproxima. Las interacciones electrostáticas entre el ión y el canal se ven afectadas por este hecho y la magnitud del potencial eléctrico que surge como resultado de este efecto se ha estudiado en términos de la llamada "carga de imagen".

En síntesis, se considera que la interfase entre la solución y la membrana es como un espejo en el cual se refleja la carga del ión. De esta manera, aparece en el interior de la membrana una carga del mismo signo que la del ión a una distancia igual a la distancia entre el ion y la membrana. De este modelo, se puede calcular la "dificultad" que encontrará el ión en entrar a la membrana debido a la repulsión con su carga de imagen, como una barrera de energía potencial (Bockris y Reddy, 1973). De acuerdo a Jordan, 1981, la barrera de energía potencial para un ión positivo en el interior

del canal de gramicidina, que tiene un poro de 0,4 nm de diámetro y 3 nm de largo resulta del orden de las 5 kcal/mol. En el canal de potasio del nervio (Armstrong, 1974) con un diámetro de poro de 0,3 nm y una longitud de 1 nm la barrera debida a la carga de imagen sería de unas 3 kcal/mol. La energía de esta barrera se sumaría a las energías de interacción específica del ión y el canal.

En consecuencia, en el caso que estamos analizando, todos los valores de energía encontrados del ajuste del modelo de tres barreras estarían sobre un "pedestal" de 3-5 kcal/mol. En todo caso, es necesario reiterar que estos cálculos son solamente tentativos y que su comprobación experimental requeriría un mayor conocimiento de la estructura química del canal, que no está disponible por el momento y cuya dilucidación escapa a los objetivos de este trabajo.

APENDICE

Ecuaciones generales de flujo.

En un modelo de transporte como el que aparece esquematizado en la Figura 23, y aplicando la teoría de velocidad absoluta de reacción (Glasstone *et al*, 1941), las constantes cinéticas, k_i , se describen como:

$$k_i = RT \exp(-\Delta G_i/RT) \quad (19)$$

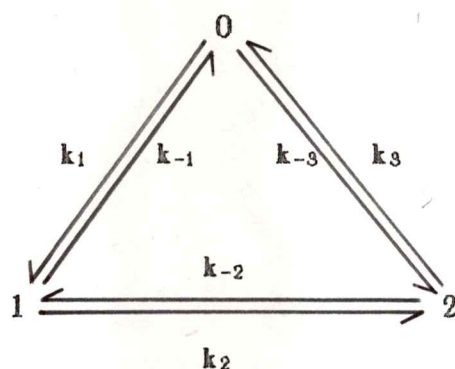
en que G_i representa la diferencia de energía libre del ión entre el pico (p_i) y el valle anterior (w_{i-1}), R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. Si ponemos la condición que el canal puede aceptar un solo ión a la vez, puede encontrarse en sólo una de $n+1$ condiciones posibles: vacío o con el ión en uno de los n valles. El flujo de iones, J , a través de este canal en el estado estacionario estará dado por el flujo a través de cualquiera de las barreras, por ejemplo:

$$J = RT (P_0 \cdot k_1 - P_1 \cdot k_{-1}) \quad (20)$$

en que P_0 es la probabilidad de encontrar al ión fuera del canal y P_1 , la probabilidad de encontrarlo en el sitio 1. Las expresiones para las probabilidades se pueden obtener empleando el método de King y Altman, (Segel, 1975), y son funciones de las constantes cinéticas que a su vez

dependen de la energía libre del ión dentro del canal.

Para un modelo de dos sitios y tres barreras, como el que se propone para el canal de hemocianina y que aparece en la Figura 14, donde se propone que un solo ión puede permanecer dentro del canal a la vez, el canal puede encontrarse sólo en uno de tres estados posibles: vacío, con el ión en el sitio 1 o con el ión en el sitio 2. En un esquema cinético, este modelo puede representarse así:



La contribución del potencial eléctrico aplicado a las constantes cinéticas se introduce en el modelo suponiendo que el pico central siente una fracción D_2 del potencial aplicado y el valle 1, una fracción D_1 . De acuerdo a estas suposiciones, las expresiones para las seis constantes cinéticas son:

$$k_1 = a \cdot \exp(-G_A) \quad (21)$$

$$k_{-1} = \exp((G_1 + D_1 \cdot U) - G_A) \quad (22)$$

$$k_2 = \exp((G_1 + D_1 \cdot U) - (G_B + D_2 \cdot U)) \quad (22)$$

$$k_{-2} = \exp((G_2 + U) - (G_B + D_2 \cdot U)) \quad (23)$$

$$k_3 = \exp(G_2 - G_0) \quad (24)$$

$$k_{-3} = a \cdot \exp(-G_3) \quad (25)$$

en que a es la actividad del ión en la solución, U se define como eV/kT , donde V es el potencial aplicado, e es la carga del electrón y kT tiene su significado habitual. Los valores de energía para el ión en los sitios y barreras (G 's) están expresados en unidades de $1/RT$.

Las expresiones para las probabilidades P_0 , P_1 y P_2 de encontrar al canal en alguno de los tres estados se encuentran utilizando el método gráfico de King y Altman (Segel, 1975) y son:

$$P_0 = k_{-1} \cdot k_{-2} + k_3 \cdot (k_2 + k_{-1}) \quad (26)$$

$$P_1 = k_{-3} \cdot k_{-2} + k_1 \cdot (k_{-2} + k_3) \quad (27)$$

$$P_2 = k_{-3} \cdot k_{-1} + k_2 \cdot (k_1 + k_{-3}) \quad (28)$$

La corriente iónica en el estado estacionario está dada por el flujo neto a través de cualquiera de las tres barreras:

$$I = e kT/h \cdot (P_0 \cdot k_1 - P_1 \cdot k_{-1}) / (P_0 + P_1 + P_2) \quad (29)$$

donde e es la carga elemental ($1.6 \cdot 10^{-19}$ C) y kT/h vale $6.2 \cdot 10^{12}$ s⁻¹. El denominador surge de la necesidad que la suma total de las tres probabilidades debe ser uno.

Las ecuaciones (20) al (29) se usaron para calcular la corriente en función del potencial, a diferentes concentraciones. Al comienzo, se calculaba con un conjunto de estimaciones de los valores de energía en los

sitios y barreras (G's). Luego, utilizando el programa de ajuste no lineal, el computador cambiaba los valores de estas energías, hasta encontrar el conjunto que produjera las curvas corriente voltaje más parecidas a las experimentales, de acuerdo al criterio de los mínimos cuadrados. El cálculo se hizo para todos los iones alcalinos.

Estas ecuaciones también se usaron para calcular la corriente que pasa por el canal cuando hay mezclas de potasio y litio en la solución acuosa. Este cálculo se hizo para probar si el modelo podía predecir la competencia entre estos dos iones, es decir, no se usó el programa de ajuste, y las corrientes se calcularon usando como parámetros los valores de energía encontrados mediante el ajuste descrito más arriba. Primero, se calculaban las probabilidades para el potasio, como si el litio no estuviera; luego, las del litio, como si no estuviera el potasio, y por último, se calculaban las probabilidades combinadas. Por ejemplo, la probabilidad de que el potasio esté en el sitio 1 es el producto de la probabilidad de que esté en dicho sitio en ausencia del litio multiplicado por la probabilidad de que el litio no esté en el sitio en ausencia del potasio.

Por último, estas ecuaciones también se usaron para calcular los potenciales biiónicos entre potasio y los demás cationes alcalinos que predice el modelo de barreras. Para ello, se calculó la corriente que pasa por el canal a diferentes potenciales cuando hay potasio por un lado de la membrana y cualquiera de los cationes alcalinos por el otro, para lo cual se consideran las probabilidades combinadas que se describen arriba. El potencial que hace que la corriente sea cero es el potencial biiónico.

REFERENCIAS

Alvarez, O. y Latorre, R., 1978

Voltage-dependent capacitance in lipid bilayer membranes made from monolayers
Biophys. J. 21:1-17

Alvarez, O., Díaz, E. y Latorre, R., 1975

Voltage-dependent conductance induced by hemocyanin in black lipid films.
Biochim. Biophys. Acta 389: 444-448

Alvarez, O., Reyes, J. y Latorre, R., 1977

Ion transport through the hemocyanin channel.
Biophys. J. 17: 214a (Abst.)

Apell, H. J., Bamberg, E. y Lauger, P., 1979

Effects of surface charge on the conductance of the gramicidin channel.
Biochim. Biophys. Acta 552: 369-378

Armstrong, C., 1974

Ionic pores, gates and gating currents.
Quart. Rev. Biophys. 7: 179-210

Aveyard, R. y Haydon, D. A., 1973

An introduction to the principles of surface chemistry.
Cambridge University Press, London, 200 pp.

Bauman, G. y Mueller, P., 1974

A molecular model of membrane excitability.
J. Supramolec. Struc. 2: 538-557

Bockris, J. O'M y Reddy, A. K. N., 1970

Modern electrochemistry.

Plenum Publishing Co., 1432 pp.

Boheim, G., 1974

Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes.

J. Membr. Biol. 19: 277-303

Boheim, G. y Kolb, H. A., 1978

Analysis of the multipore system of alamethicin in a lipid membrane.

I. Voltage-jump-current relaxation measurements.

J. Membr. Biol. 38: 99-150

Boheim, G., Hanke, W., Barrantes, F. J., Eibl, H., Sakmann, B.,

Feels, G., y Maelicke, A., 1981

Agonist-activated ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78 : 3586-3590

Cecchi, X., Alvarez, O. y Latorre, R., 1981

A three barrier model for the hemocyanin channel

J. Gen. Physiol. 78 : 657-681

Cecchi, X., Bull, R., Franzoy, R., Coronado, R. y Alvarez, O., 1982

Probing the pore size of the hemocyanin channel

Biochim. Biophys. Acta 693 : 173-176

Cecchi, X., Latorre, R. y Alvarez, O., 1984

Alkali metal ion selectivity of the hemocyanin channel

J. Membr. Biol. 77 : 277-283

Chrisman, B. L. y Tumolillo, T. A., 1969

Computer analysis of Mossbauer spectra

En: Technical Report N° 178, National Science Foundation, Grant N° GP 9311
Physics Department, University of Illinois, Urbana, Illinois.

Coronado, R. y Miller, C., 1980

Decamethonium and hexamethonium block K^+ - channels of sarcoplasmic reticulum.

Nature 288: 495-497

Coronado, R., Rosemberg, R. L. y Miller, C., 1980

Ionic selectivity, saturation and block in a K -selective channel from sarcoplasmic reticulum.

J. Gen. Physiol. 76: 425-446

Chapman, D. L., 1913

A contribution to the theory of electrocapillarity.

Philos. Mag. 25: 475-481

Edwards, J. T., 1970

Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation.

J. Chem. Educ. 47: 261-270

Ehrlich, B., Finkelstein, A., Forte, M. y King, C., 1984

Voltage-dependent calcium channels from *Paramecium* cilia incorporated into planar lipid bilayers.

Science En Prensa

Eisenman, G., 1962

Cation selective glass electrodes and their mode of operation.

Biophys. J. 2: 259-323

Eisenman, 1965

Some elementary factors involved in specific ion permeation.

En: Proceedings of the XXIII International Congress of Physiological Sciences, Tokio, 87: 489-506

Glasstone, S., Laidler, K. J. y Eyring, H., 1941

The theory of rate processes.

McGraw Hill Book Co., New York

Goldman, D. E., 1943

Potential, impedance and rectification in membranes.

J. Gen. Physiol. 27: 37-60

Gouy, M., 1910

Sur la constitution de la charge electrique a la surface d'un electrolyte.

J. Phys. (Paris) 9: 457-468

Hanke, W. y Miller, C., 1983

Single chloride channels from *Torpedo* electroplax: activation by protons.

J. Gen. Physiol. 82 : 25-45

Hille, B., 1975

Ionic selectivity of Na and K channels of nerve membranes.

En: Membranes, Ed.: G. Eisenman, Marcel Dekker, New York,

Vol. 3, pp. 256-323

Huang, I. Y. M., Moran, N. y Ehrenstein, G., 1984

Gating kinetics of batrachotoxin-modified sodium channels in neuroblastoma cells determined from single-channel measurements.

Biophys. J. 45 : 313-322

Jordan, P. C., 1981

Energy barriers for passage of ions through channels. Exact solutions of two electrostatic problems.

Biophysical Chem. 13: 203-212

Junge, D., 1981

Nerve and muscle excitation.

Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts

Karlin, A., 1980

Molecular properties of nicotinic acetylcholine receptors.

En: The Cell Surface and neuronal Function. Ed.: W. Cotman, G. Poste y G. L. Nicolson. Elsevier North Holland Biomedical Press. pp. 191-260

Krasne, S. y Eisenman, G., 1973

The molecular basis of ion selectivity

En: Membranes, Ed.: G. Eisenman. Marcel Dekker Inc., New York, Vol. 2, pp. 277-328

Labarca, P., Coronado, R. y Miller, C., 1980

Thermodynamic and kinetic studies of the gating behavior of a K^+ -selective channel from the sarcoplasmic reticulum membranes.

J. Gen. Physiol. 76 : 397-424

Latorre, R. y Alvarez, O., 1981

Voltage-dependent channels in planar lipid bilayer membranes.

Physiol. Rev. 61: 77-149

Latorre, R. y Miller, C., 1983

Conduction and selectivity in potassium channels.

J. Membr. Biol. 71 : 11-30

Latorre, R., Alvarez, O., Ehrenstein, G., Espinoza, M. y Reyes, J., 1975
The nature of the voltage-dependent conductance of the hemocyanin channel.
J. Membr. Biol. 25: 163-181

Latorre, R., Vergara, C. y Hidalgo, C., 1982
Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{+2} -dependent K^+ channel
from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79 : 805-809

Lauger, P., 1973
Ion transport through pores: a rate theory analysis.
Biochim. Biophys. Acta 311: 423-441

Lauger, P., 1980
Kinetic properties of ion carriers and channels.
J. Membr. Biol. 57 : 163-178

Levitt, D. G., Elias, S. R. y Hautman, J. M., 1978
Number of water molecules coupled to the transport of Na^+ , K^+ and H^+
via gramicidin, nonactin and valinomycin.
Biochim. Biophys. Acta 512: 436-451

McIntosh, T. J., Robertson, J. D., Ting-Beall, H. P., Walter, A.
y Zampighi, G., 1980
On the structure of the hemocyanin channel in lipid bilayers.
Biochim. Biophys Acta 601: 289-301

McLaughlin, S., 1977
Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces.
En: Current Topics in Membranes and Transport.
Eds.: F. Bonner y A. Kleinzeller, Academic Press, New York, 9: 71-145

Menestrina, G. y Antolini, R., 1981

Ion transport through hemocyanin channels in oxidized cholesterol artificial bilayer membranes.

Biochim. Biophys. Acta 643: 616-625

Miller, C., 1978

Voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum: steady state electrical properties.

J. Membr. Biol. 40 : 1-23

Miller, C., 1982

Bis quaternary ammonium blockers as structural probes of the sarcoplasmic reticulum K-channel.

J. Gen. Physiol. 79: 869-891

Miller, C., 1983

Integral membrane channels: studies in model membranes.

Physiol. Rev. 63 : 1209-1241

Montal, M. y Mueller, P. O., 1972

Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69: 3561-3566

Neher, E. y Sakmann, B., 1976

Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers

Nature 260 : 799-802

Pant, H. C. y Conran, P., 1972

Keyhole limpet hemocyanin (KLH)-lipid bilayer membrane (LBM) interaction.

J. Membr. Biol. 8: 357-362

Parsegian, A., 1969

Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solution to four relevant electrostatic problems.

Nature 221: 844-846

Robinson, A. y Stokes, R. H., 1970

Electrolyte solutions.

Butterwood and Co. Publishers, London.

Rojas, E. y Luxoro, M., 1963

Microinjection of trypsin into axons of squid.

Nature 199: 78-79

Rosenberg, P. A. y Finkelstein, A., 1978

Interaction of ions and water in gramicidin A channels: streaming potentials across lipid bilayer membranes.

J. Gen. Physiol. 72: 327-340

Schindler, H. y Quast, U., 1980

Functional acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in planar membranes.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 : 3052-3056

Segel, I., M., 1975

Enzyme kinetics. John Wiley and Sons, Inc., New York. 506-517

Senozan, N. M., 1976

Hemocyanin: the copper blood.

J. Chem. Ed. 53: 684-688

Singer, S. y Nicholson, G., 1972

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.

Science 175: 720-731

Takagi, M., Azuma, K. y Kishimoto, U., 1965

A new method for the formation of bilayer membranes in aqueous solutions.

Annual Reports of Biological Works, Faculty of Sciences, Osaka University, 13: 107-110

Van Bruggen, E. F., Wiebenga, E. H. y Gruber, M., 1962

Structure and properties of hemocyanins. I. Electron micrographs of hemocyanin and apohemocyanin from *Helix pomatia* at different pH values.

J. Mol. Biol. 4: 1-7

Van Bruggen, E. F., Schuiten, V., Wiebenga, E. H. y Gruber, M., 1963

Structure and properties of hemocyanins from different gastropods and crustacea.

J. Mol. Biol. 7: 249-253

Weigle, J. B. y Barchi, R. L., 1982

Functional reconstitution of the purified Na channel protein from rat sarcolemma.

Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 79: 3651-3655

White, M. M. y Miller, C., 1979

A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*.

J. Biol. Chem. 25 : 10161-10166

White, M. M. y Miller, C., 1981

Probes of the conduction process of a voltage-gated Cl⁻ channel from *Torpedo* electroplax.