

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA

Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários

Doutorando: Cláudio Gabriel Rodrigues

Orientador: Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Recife - 2006

CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES

Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nível Doutorado, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Rodrigues, Cláudio Gabriel

Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários / Cláudio Gabriel Rodrigues. _ Recife: O Autor, 2006.

41 folhas, xix : il., fig., fotografias

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB, Ciências Biológicas.

Biotecnologia 2. Nanotecnologia 3. Biofisica. I. Título.

**620.5
62**

**CDD (22.ed.)
CDU (2.ed.)**

**UFPE
CCB - 2006 -006**

Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários

CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES

COMISSÃO EXAMINADORA

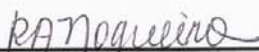
Membros titulares



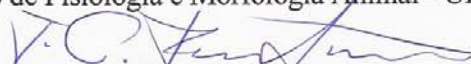
Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica; LIKA –UFPE



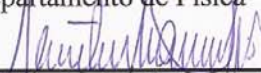
Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov
Departamento de Biofísica – UFPE



Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE



Prof. Dr. José Omar Bustamante
Departamento de Física – UFS



Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo
Departamento de Biologia Molecular –UFPb

Membros suplentes

Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior
Departamento de Antibióticos – UFPE

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE

Ao meu orientador, Oleg Vladimirovich Krasilnikov, os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação, paciência, apoio e pela oportunidade de concluir este trabalho com muita seriedade. Obrigado!!!

A minha amada esposa, que tem me acompanhado durante todo esse tempo que estamos juntos, me apoiando nos momentos difíceis e sempre me incentivando nos momentos certos. Amo-te!

Aos meus pais maravilhosos Mariano e Rita que criaram todos os filhos tentando sempre acertar, portanto estamos todos agradecidos e orgulhosos de vocês.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE BIOSSENSORES	1
1.2. CONSTITUINTES DA MEMBRANA CELULAR COMO ELEMENTOS SENSORES	3
1.3. O NANOPORO PROTÉICO FORMADO PELA α -TOXINA COMO BIOSSENSOR ESTOCÁSTICO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. A MEMBRANA LIPÍDICA PLANA	12
2.2. O SISTEMA DE MONITORAÇÃO E AQUISIÇÃO DE REGISTROS DE CORRENTE IÔNICA	15
2.3. A ANÁLISE DE ASSINATURAS DIGITAIS E DADOS CINÉTICOS	16
2.3.1. <i>O princípio do contador molecular</i>	16
2.3.2. <i>Flutuações de condutância</i>	18
2.3.3. <i>Análise espectral do ruído de corrente</i>	19
2.4. A ESCOLHA DE ANALITOS POLIMÉRICOS	22
2.5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	27
4.1. GERAL	27
4.2. ESPECÍFICOS	27
5. REFERÊNCIAS	28
6. RESULTADOS	36
CAPÍTULO I	36
FIELD-DEPENDENT EFFECT OF CROWN ETHER (18-CROWN-6) ON IONIC CONDUCTANCE OF α -HEMOLYSIN CHANNELS.	36
CAPÍTULO 2	37
PARTITIONING OF SINGLE POLY-(ETHYLENE GLYCOL) MOLECULES INTO A PROTEIN NANOPORE IN THE LIMIT OF STRONG ATTRACTION.....	37
7. CONCLUSÕES GERAIS	38
8. PERSPECTIVAS.....	40
9. ANEXOS	41

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida.

Ao Professor Doutor Oleg Vladimirovich Krasilnikov pelo companheirismo, dedicação e orientação científica que tanto influenciou na minha formação profissional e pessoal culminado com a confecção deste trabalho.

Ao Doutor Sergey Bezrukov pela colaboração na realização de alguns experimentos.

Aos meus amigos e professores do Laboratório de Biofísica das Membranas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia: Petr Merzlyak, Liliya Yuldasheva, Carlos Manuel e Reginaldo Pereira.

A todos os colegas e estudantes do Doutorado pelo apoio e compreensão, permitindo uma convivência saudável e de aproveitamento na realização das disciplinas.

A Doutora Suely Lins Galdino coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio sempre que solicitada.

A Adenilda, Liane e Jace pelo auxílio constante na resolução de pendências burocráticas no decorrer desta tarefa.

Ao Senhor Fredson, pelo apoio e sempre com a maior boa vontade, na solução dos problemas diários do laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas e amigos de fora do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A interação do nanoporo protéico (canal iônico) formado pela α -hemolisina (α -HL) em suporte lipídico plano (membrana) com polímeros do etilenoglicol foi investigada sob dois aspectos: i) entender as bases físico-químicas do processo de transporte destas moléculas orgânicas via poros nanoscópicos e, ii) examinar a viabilidade do emprego do poro nanoscópico como elemento sensor, para detecção estocástica e monitoramento em tempo real de compostos orgânicos em sistemas aquosos. A escolha de duas formas de um mesmo polímero deve-se ao fato de que apesar deles serem quimicamente semelhantes e estáveis, geram estruturas com massa e configurações moleculares diferentes: circular, o éter de coroa (1,4,7,10,13,16-hexaciclooctano, 264 Da), e linear, polietilenoglicóis (PEGs, 200 a 3000 Da). A repulsão entrópica é o principal fator determinante da interação entre o nanoporo e estas moléculas em concentrações de KCl menores que 1 M. O aumento na concentração de KCl até 4 M, aumenta fortemente a força de interação entre o nanoporo e o polímero, tornando-a maior que a repulsão entrópica. O potencial transmembrana, a estrutura e a massa molecular do polímero também influem fortemente nesta interação. A presença destas moléculas orgânicas no lume aquoso do canal manifesta-se por decréscimo na condutância iônica média do nanoporo, e aumento no ruído de corrente iônica. Para o éter de coroa (264 Da) e PEGs com massas moleculares (200-400 Da) semelhantes, o ruído “branco” até 1 kHz, indica um rápido intercâmbio destas moléculas entre o canal e a solução banhante da membrana. Todavia contrariamente aos PEGs (200-400 Da), a redução de condutância (indicativo do particionamento do éter de coroa no canal), e a intensificação do ruído de corrente (relativo à dinâmica do polímero no nanoporo) dependem fortemente e de forma não monotônica do potencial transmembrana, demonstrando que o éter de coroa atua formando complexo com K^+ , enquanto que os PEGs menores, são neutros. Considerando o fenômeno de ocupação do canal pelo éter de coroa, descrito por um modelo Markoviano de dois estados, determinamos que o seu tempo de permanência no interior do canal, é máximo ($\sim 3 \mu s$), na mesma voltagem (100 mV) em que ocorre a maior redução da condutância iônica. Por outro lado, PEGs de massa molecular maior (600, 1000, 1500, 2000 e 3000 Da) em concentrações salinas elevadas ($>1 M$ KCl), interagem com o nanoporo, dependentemente do potencial transmembrana, indicando a presença de carga elétrica nas moléculas destes polímeros, nessas condições. Estas interações são muito mais fortes que àquelas observadas para o éter de coroa e PEGs de menor massa; conseqüentemente manifestam-se não só por aumento do ruído de corrente iônica, mas, principalmente, pela geração de “assinaturas moleculares” específicas, que correspondem a profundidade de bloqueio e o tempo de permanência de cada molécula do PEG, no lume aquoso do nanoporo. Os decréscimos nas condutâncias do canal (bloqueios) induzidos por PEGs foram praticamente proporcionais as variações na condutividade da solução salina banhante da membrana, indicando que a água no lume do poro nanoscópico e na solução banhante da membrana, se comporta de maneira similar, e que a presença do polímero reduz a condutividade em ambos os meios por um mesmo mecanismo. A interação entre os PEGs e o nanoporo depende da massa molecular do polímero. Em 4 M de KCl, o tempo de ocupação do poro aumentou de ~ 0.04 ms, na presença do PEG 600 Da, para ~ 270 ms, no caso do PEG 3000 Da (uma diferença de ~ 6000 vezes), enquanto que o coeficiente de partição aumentou em ~ 250 vezes. A energia de interação entre o nanoporo e os PEGs (≥ 1000 Da) foi estimada em $\sim 0.13 kT$ por monômero do polímero. Deste modo altas concentrações de cloreto de potássio na solução banhante da membrana, aumenta a energia da interação das moléculas poliméricas com o nanoporo, criando as condições favoráveis para detecção estocástica de PEGs (600 a 3000 Da). Outrossim, a viabilização do sistema nanoporo-membrana como elemento sensor para o desenvolvimento de biossensores estocásticos é possível, porém, estudos adicionais referentes à sua estabilização físico-química, aquisição e automação da análise de assinaturas digitais de corrente, são necessários.

Palavras-chave: nanoporo; sensor estocástico, α -hemolisina, membrana, nanotubo.

ABSTRACT

The interaction of protein nanopore formed by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α -HL) in planar lipid bilayers with polymers of ethylene glycol was investigated in order to: *i) understand the physico-chemical basis* of the transport of the organic molecules through nanoscopic pores; *ii) exam the viability* to use this nanoscopic pore as a principal element for stochastic sensing and real-time monitoring of aqueous systems. The rationale on which the polymers of ethylene glycol were utilized is that they are chemically similar, stable and available with different mass and molecular structure: in circular (crown ether; 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctane, 264 Da) and linear (polyethylene glycols; PEGs, from 200 to 3000 Da) forms. The entropic repulsion was found to be the principal factor determined the interaction between nanopore and these molecules at KCl concentrations smaller than 1M. The rise in KCl concentration strongly increases the interaction force and at the extreme, 4M KCl, becomes the principal factor, which suppresses and overcomes the entropic repulsion. The transmembrane potential, molecular mass and structure have influenced considerably on the polymers-pore interaction also. The transport of the crown ether (264 Da) and PEGs with molecular mass (200-400 Da) via α -HL-pore leads to decrease in conductance and increase in noise of ionic current. The noise is “white” up to 1 kHz at least indicated fast exchange of these molecules between the pore and membrane-bathing solution. However, in contrast to linear flexible PEGs, the cyclic rigid molecule of crown ether made both the conductance reduction (reflecting the partitioning) and the noise (reporting the dynamics of the molecule interaction) depends strongly and not monotonically on the transmembrane potential. Such results indicates that the crown interacts with the pore in the form of charged K^+ -crown complex, while the small PEGs are electrically neutral. Considering the phenomenon of α -HL pore occupation in Markovian of two-state model framework, lifetime of the crown could be estimated at microsecond scale. It reaches maximum (~ 3 microseconds) at about ~ 100 mV where the crown-evoked reduction of the channel conductance is most pronounced. The strong non monotonous voltage dependence of the crown effect is result of the presence of effective steric barrier inside of the α -HL pore which could be overcome with voltage. PEGs with larger molecular mass (600, 1000, 1500, 2000 and 3000 Da) at elevated KCl concentration (>1 M) interact somehow similarly to the crown: their effects are voltage dependent, reporting the presence of the electrical charge at the conditions. However, the interaction of these PEGs with the pore is much stronger and manifests itself with “molecule signature”, which integrates the deepness and the life-time of blockage evoked by a single molecule. The mean reduction of α -HL pore conductance provoked by a single molecule of PEGs increased monotonically with molecule mass (600-3000 Da) and is proportional to the change in conductivity of the bulk solution. It points out that: *i) water in nanopore and in the bulk behaves similarly*, and *ii) the presence of polymers inside the nanopore and in bulk solution act by the same mechanism* – decrease their conductance. The mean life time of PEG inside of α -HL pore and the partition coefficient was also dependent of the molecule mass. So, in 4M of KCl, the life-time augments more than 6000 times, from the ~ 0.04 ms (for PEG 600) to ~ 270 ms (PEG 3000), while PEG molecule mass is increased in 5 times only. At the same conditions, the partition coefficient rise in about ~ 250 times. The interaction energy (for PEGs ≥ 1000 Da) was estimated to be of ~ 0.13 kT per monomer. Such, the high KCl concentrations increase the attractive interactions and improve stochastic detecting of organic molecules in aqueous systems. The study shows that the nanopore is a promissory element for a sensor operated on the stochastic principle, however additional efforts have to be done to stabilize lipid bilayer/nanopore system and to optimize the collection of molecular signatures permitting automatization of the analysis.

Key-words: nanopore; stochastic sensor, α -hemolysin, membrane.

Lista de Figuras

FIGURA	Pág.
FIGURA 1 – Esquema geral dos componentes de um biossensor, adaptado de Wang (WANG, 2002).....	02
FIGURA 2 – Modelo do nanoporo formado pela α -toxina com dimensões e entradas em relação a membrana. Adaptado de SONG et al, 1996.....	08
FIGURA 3 - Um único poro projetado é colocado numa bicamada lipídica. Quando um potencial é aplicado, uma corrente iônica flui através do poro carregada pelos íons da solução salina banhante da bicamada. O poro contém um sítio de ligação para o analito, representado pela esfera verde. Cada vez que o analito se liga ao poro a corrente é modulada como ilustrado no traçado. Deste modo, monitoram-se os eventos individuais de ligação. A frequência de ocorrência dos eventos revela a concentração do analito, enquanto que a assinatura de corrente (assinatura digital) revela sua identidade (BAYLEY & CRAMER, 2001).....	11
FIGURA 4. Foto da câmara de Teflon® e esquema representativo do processo de construção e da monitoração da bicamada lipídica plana. A) Câmara de Teflon® com representação dos lados cis e trans, e eletrodos de conexão da solução aquosa (verde e amarelo) ao sistema eletrônico de monitoramento e aquisição. B) Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; C) Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema.....	14
FIGURA 5. Esquema básico do sistema de monitoramento e aquisição de registros de corrente iônica através do nanoporo formado pela α -toxina. O filtro está incorporado no painel de entrada e saída.....	15
FIGURA 6 – O contador de Coulter. O fluxo de líquido mantido por diferença de pressão externa movimenta partículas microscópicas através do orifício numa divisória de vidro. A entrada de cada partícula no orifício produz um pulso na condutância. O número de pulsos por segundo relata a concentração e o tamanho da partícula pode ser inferido pela amplitude do pulso (BERZRUKOV, 2000).....	17

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre biossensores

A prospecção de elementos de reconhecimento (elemento sensor) baseados em biomoléculas, microorganismos, órgãos e até células isoladas para o desenvolvimento de biossensores, é de grande interesse e bastante promissora, considerando que estes sistemas apesar de executarem eficientemente suas funções, encontram-se em constante aperfeiçoamento, portanto ainda não foram suficientemente otimizados durante a evolução das espécies. Por outro lado a complexidade das diferentes condições, as quais, esses sistemas foram submetidos, dotou-os de altíssimo nível de sofisticação, permitindo na maioria das vezes, a execução de várias tarefas simultaneamente, tais como, detecção de mais de um analito, processamento em tempo real e elevada capacidade de resolução, dentre outras. Todas estas características não são encontradas conjuntamente nos biossensores até então desenvolvidos, que normalmente se baseiam numa única propriedade física ou química para reconhecimento do analito.

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico composto por um material biológico ou derivado de um material biológico (biomimético), intimamente associado com, ou integrado num transdutor físico-químico, o qual pode ser óptico, eletroquímico, termoeletrônico, piezoeletrônico ou magnético (FISHMAN et al. 1998, SCHELLER et al, 2001, CASTILLO, et al, 2004, WILSON & GIFFORD, 2005). Assim sendo o biossensor pode ser representado esquematicamente por três partes básicas (figura 1):

- Camada de biorechecimento onde se encontra o elemento sensor ou elemento de reconhecimento que tem a função de interagir diretamente com o analito. Esta parte pode ser composta por: organismos inteiros, tecidos, organelas, células, microorganismo, receptor, enzima, anticorpo, ácido nucléico, entre outras;

- O transdutor que funciona convertendo o resultado da interação elemento sensor-analito, principalmente num sinal elétrico na forma digital, passível de quantificação;
- Unidade de processamento/amplificação, responsável pelo processamento do sinal gerado no transdutor, permitindo sua saída numa forma específica passível de interpretação.

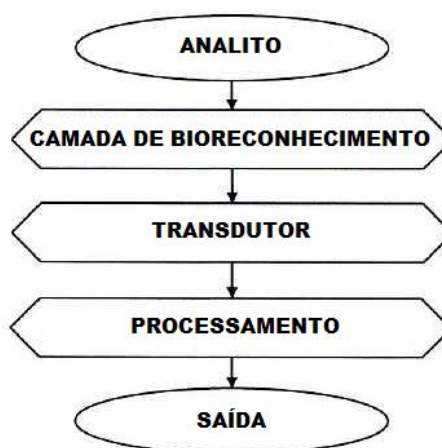


FIGURA 1 – Esquema geral dos componentes de um biossensor, adaptado de Wang (WANG, 2002).

Deste modo podemos classificar os biossensores em relação à natureza do elemento sensor em (FISHMAN et al, 1998):

1. Biossensores baseados em sistemas vivos, cuja resposta se deve ao funcionamento de um órgão ou organismo inteiro. Dentre eles podemos citar órgãos olfatórios como antênulas de crustáceos e de baratas, e até o nariz humano;
2. Biossensores baseados em células íntegras, cuja operação se deve ao funcionamento do conjunto de células ou a uma única célula dissociada. Como exemplo temos o microfisiômetro;

3. Biossensores baseados em enzimas, que funcionam em resposta a ação de uma enzima sobre seu substrato, o exemplo clássico é o acoplamento de uma enzima ao eletrodo de oxigênio de Clarke;
4. Biossensores baseados em anticorpos, cujo funcionamento resulta da reação entre moléculas do sistema imune e antígenos. Podemos citar os ensaios imunoenzimáticos e o radioimunoensaio;
5. Biossensores baseados em lectinas, cujo funcionamento resulta da interação destas moléculas com marcadores superficiais específicos de tecido tumoral (BELTRÃO et al, 2003);
6. Biossensores baseados em receptores de membrana, funcionando em resposta a interação de um único receptor ou grupo de receptores com seus ligantes. Citamos principalmente os ensaios usando a técnica de “*patch clamp*”, em sistemas comerciais recentemente lançados no mercado (MOORE, 2005) – Patch Express da AXON INSTRUMENTS CORPORATION (WWW.AXON.COM, 2005) e Nanion automated PC da NANION CORPORATION (WWW.NANION.DE, 2005), dentre outros.

Esta última classe é particularmente interessante para este trabalho, mais especificamente, a proposição de uma nova abordagem em relação à magnitude, tipo de resposta e funcionalidade da molécula constituinte da membrana, empregada como elemento sensor.

1.2. Constituintes da membrana celular como elementos sensores

A membrana plasmática das células é extremamente diversificada em sua composição lipídica e protéica, estando as proporções destes principais constituintes, diretamente relacionadas às funções biológicas. A bicamada lipídica, além do papel estrutural, representa

uma grande barreira energética e por isto apresenta baixa permeação à substâncias hidrossolúveis; entretanto, oferece as condições bioquímicas adequadas para que as proteínas executem esta permeação de diversas maneiras. A passagem de substâncias hidrofílicas através das proteínas pode alterar a osmolaridade e distribuição de cargas elétricas em ambos os meios, conseqüentemente a regulação do volume e condições eletrofisiológicas da célula (ALBERTS et al, 2002; GENNIS, 1989; SCHULTZ et al, 1996; BALDWIN, 2000).

As proteínas desempenham as mais diversas funções. Em relação aos mecanismos de transporte, as proteínas podem funcionar como enzimas (bombas eletrogênicas), carregadores (trocadores) e canais iônicos (poros seletivos). As bombas geralmente executam sua função: i) ligando-se à substâncias hidrossolúveis através de sítios específicos em um dos lados da membrana, ii) sofrerem mudanças conformacionais às custas de energia do metabolismo celular, liberando o ligante do outro lado intensificando seu gradiente de concentração, processo conhecido como transporte ativo. Os carregadores também executam o transporte de substâncias de maneira similar às bombas, diferindo principalmente por não consumir energia metabólica. Por outro lado, as proteínas formadoras de canais iônicos sob determinados estímulos, sofrem mudanças conformacionais sem consumo de energia metabólica, criando uma via geralmente hidrofílica de baixa energia através da matriz lipídica, permitindo a passagem seletiva de íons no sentido de dissipação do seu gradiente eletroquímico (HILLE, 1992; ALBERTS et al, 2002; GENNIS, 1989; TIEN & LEITMANNOVA, 2000).

A maioria dos processos de reconhecimento celular envolvem receptores superficiais de constituição geralmente glicoprotéica, que participam nos mecanismos de interação entre células de diversos sistemas, tais como, imunológico, nervoso, dentre outros (ALBERTS et al, 2002; ABBAS & LICHTMAN, 2005). As proteínas também servem de receptores para hormônios, transduzindo para o interior da célula, a mensagem para ativação da maquinaria enzimática, resultando na síntese de compostos indispensáveis à resposta celular (WEISS, 1996; VOET & VOET, 1997). Assim sendo, podemos considerar os constituintes protéicos da

membrana celular, principalmente os receptores e canais iônicos, como elementos sensores naturais.

Os receptores de membrana empregados em biossensores são lábeis e devem ser estabilizados de alguma maneira, podendo ser isolados e incorporados em lipossomas, sinaptossomas e bicamadas lipídicas planas; ou utilizados diretamente em membranas nativas, tais como em “*patch clamp*” nas configurações de célula inteira, “*inside-out*” e “*outside-out*” (HAMILL et al, 1981; NEHER & SAKMANN, 1992).

Todos os receptores externos de membrana interagem com ligantes difusíveis no meio extracelular (VOET & VOET, 1995; ZIGMOND et al, 1999; KANDEL et al, 2000). Nos receptores metabotrópicos o evento de ligação induz a ativação de enzimas de membrana desencadeando uma cascata de reações resultando na produção de mensageiros intracelulares (KANDEL et al, 2000). Por outro lado, nos receptores ionotrópicos o evento de ligação do agonista induz alterações conformacionais resultando na abertura de canais iônicos, e no fluxo iônico através da membrana (NICHOLLS, 1995; KOCH, 1999). Assim sendo o fluxo de corrente iônica é a informação obtida de forma indireta da presença do ligante (analito). Em função da facilidade de monitoramento da corrente iônica através de canais iônicos, os receptores ionotrópicos são preferencialmente escolhidos para o desenvolvimento de biossensores. Apesar da grande diversidade de canais iônicos presentes na membrana celular; somente os dependentes de ligantes foram utilizados inicialmente como elementos sensores. Adotando como critério a seletividade, podemos classificar os canais iônicos em dois grandes grupos: canais seletivos a cátions e canais seletivos a ânions (HILLE, 1992).

Os canais de cátions são muito importantes por participarem na manutenção do potencial de repouso e no potencial de ação em células excitáveis; todavia, por serem extremamente seletivos, apresentam uma geometria desfavorável (região muito estreita) a passagem de moléculas grandes (HILLE, 1992).

Por outro lado, a maioria dos canais aniônicos apresenta geometria favorável, permitindo a passagem de moléculas orgânicas grandes, como por exemplo, ácido desoxirribonucléico e até peptídeos (SZABO et al, 1998; SUTHERLAND, et al, 2004).

Os primeiros relatos da proposta de utilização de canais iônicos independentes de ligantes, porém dependentes de voltagem, como elementos de reconhecimento em biossensores surgiram em meados da década de 90 (CORNELL et al, 1997; SACKMANN, 1996; KASIANOWICZ et al, 1994; TURNER, 1997). Surgiram também os primeiros problemas técnicos para a fabricação de um dispositivo comercial. Dentre estes empecilhos podemos citar basicamente: *i)* confecção de uma membrana lipídica estável; *ii)* incorporação controlada da proteína formadora do canal na membrana, e *iii)* acoplamento do conjunto proteína-membrana ao transdutor. As iniciativas de superação destes obstáculos começou com a confecção da membrana lipídica ligada diretamente a um suporte sólido, ou separada dele por uma finíssima camada de solução aquosa, ou um colchão polimérico altamente hidratado, levando ao surgimento da denominação de membranas suportadas (SACKMANN, 1996). Posteriormente acoplou-se a uma superfície de ouro, uma bicamada lipídica com vários canais de gramicidina incorporados. Uma fina camada de solução aquosa separava da “folha” de ouro, o folheto inferior da membrana. O canal de gramicidina formava-se pelo encontro de suas duas partes complementares: uma imóvel presente no folheto inferior, fixada a folha de ouro através de uma longa molécula polimérica; e a outra móvel, presente no folheto superior. Esta última por sua vez era acoplada a uma molécula de anticorpo específico para o analito em estudo. Assim sendo um aumento na concentração do analito (antígeno), permitia a formação de grandes agregados moleculares, de menor difusibilidade e diminuía a quantidade de canais formados, induzindo alterações na condutância da membrana, que eram detectadas pela folha de ouro, que funcionava como eletrodo para medida da admitância elétrica do sistema (CORNELL et al, 1997; TURNER, 1997). Obviamente muitos canais estavam incorporados na membrana, portanto, monitorava-se a resposta integral dos eventos de ligação

do anticorpo com o analito, usando-se indiretamente as alterações da passagem de corrente iônica pelos canais. Por outro lado nanoporos projetados por mutagênese sítio dirigida, produziu canais iônicos mutantes formados pela alfa-toxina, que apresentavam correlação entre a redução de condutância com a concentração de diferentes íons (zinco, cobalto cobre e níquel). A diminuição de condutância e aumento do ruído de corrente induzido pela presença do íon estudado era realizada unicamente pela análise espectral dos registros temporais de corrente, uma vez que não se observaram bloqueios característicos, dificultando a identificação dos íons investigados (KASIANOWICZ et al, 1994; 1999). Em todos esses estudos não se observou ou correlacionou bloqueios individuais induzidos por uma única molécula da substância potencialmente bloqueante, todavia não foi empregada a abordagem de detecção estocástica, ou seja, de eventos unitários.

Desde então despertou na comunidade científica, a perspectiva de encontrar um canal que apresentasse as características ideais para funcionar como elemento sensor estocástico: *i)* geometria favorável (diâmetro da ordem de nanômetros); *ii)* estabilidade; *iii)* condutância elevada; *iv)* estrutura molecular elucidada e, *v)* facilidade de manipulação genética e química.

1.3. O nanoporo protéico formado pela α -toxina como biossensor estocástico

A α -toxina é uma exotoxina protéica de 33 kDa produzida pelo *Staphylococcus aureus* e sua atividade formadora de canais em bicamadas lipídicas planas foi relatada pela primeira vez em 1981 (KRASILNIKOV et al, 1981).

A estrutura cristalina tridimensional deste canal já foi elucidada (SONG et al, 1996). Os dados cristalográficos denotam a existência de sete monômeros delimitando o nanoporo aquoso, estequiometria recentemente corroborada em estudos eletrofisiológicos de reconstituição de canais iônicos unitários em bicamadas lipídicas planas (KRASILNIKOV et al, 2000). A geometria do poro aquoso e seu posicionamento assimétrico em relação ao plano

da membrana, também já foi elucidada em condições dinâmicas empregando não-eletrólitos (KRASILNIKOV et al, 1988; MERZLYAK et al, 1999). Existem duas regiões do canal bem definidas, o lado *cis* com diâmetro de 4,6 nm que fica praticamente fora da membrana, e o lado *trans* que fica inserido na membrana e tem diâmetro de 2 nm, sendo composto por 14 folhas β -barril. Estes dois domínios estão separados por uma constrição de 1,4 nm de diâmetro, o que torna esse canal, uma ferramenta altamente promissora para aplicações biotecnológicas (figura 2) (BAYLEY, 1995; KASIANOWICZ et al, 1996. BRAHA et al, 1997; GU et al, 1999). O nanoporo formado pela α -toxina apresenta alta estabilidade, facilidade de incorporação em membranas artificiais e condutância iônica elevada, fatores que a tornaram o “protótipo” de nanoporo protéico natural para o estudo do particionamento dinâmico de polietilenoglicol (PEG) (MOVILEANU et al, 2003), peptídeos (MOVILEANU et al, 2005), éteres de coroa (BEZRUKOV et al, 2004) e ácidos nucleicos (KASIANOWICZ et al, 2002) em regime de confinamento.

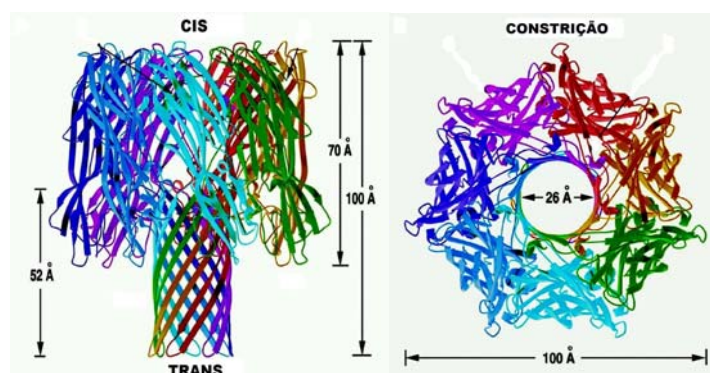


FIGURA 2 – Modelo do nanoporo formado pela α -toxina com dimensões e entradas em relação a membrana. Adaptado de SONG et al, 1996.

Por outro lado, a realização dos estudos de particionamento de polímeros em nanoporos, direcionou a aplicabilidade destas estruturas para o desenvolvimento de

nanobiossensores estocásticos, ou seja, capazes de realizar a detecção ao nível de uma única molécula (BAYLEY & CREMER, 2001).

O primeiro relato de um experimento baseado numa única molécula, permitindo sua identificação funcional foi realizado 35 anos atrás, e consistiu na observação da corrente iônica através de um único poro formado pelo antibiótico peptídico gramicidina incorporado numa bicamada lipídica (HLADKY & HAYDON, 1970). Posteriormente, demonstrou-se que as correntes iônicas nestes canais unitários eram moduladas por compostos conhecidos como bloqueadores de canais, que se ligam reversivelmente dentro do lume aquoso do poro. Esta descoberta é o princípio para o sensor estocástico fundamentado em nanoporos protéicos projetados (BAYLEY et al, 2000).

Para facilitar o entendimento do funcionamento do biossensor estocástico baseado no nanoporo formado pela α -toxina, devemos observar a representação esquemática da figura 3. Um único poro é colocado numa bicamada lipídica que separa dois compartimentos com solução salina. Quando um potencial é aplicado, uma corrente iônica máxima flui através do poro carregada pelos íons da solução salina banhante de ambos os lados da bicamada. O nanoporo contém um sítio de ligação para o analito, e toda vez que o analito ocupa o lume, induz uma modulação, diminuindo a corrente máxima (bloqueio parcial). Na situação mais simples, o elemento sensor tem dois estados - ocupado (pelo analito) e não-ocupado - e uma saída característica associada a cada um dos respectivos estados. Portanto, além de permitir a determinação da concentração do analito, o sensor estocástico é capaz de “sentir” a estrutura molecular e gerar informações específicas do analito, as quais já podem ser suficientes para sua identificação. Deste modo, esta técnica monitora os eventos individuais de ligação, como um contador molecular de Coulter (COULTER, 1953). A frequência de ocorrência dos eventos revela a concentração do analito, enquanto que a assinatura de corrente (“assinatura digital”), ou seja, os tempos médios de duração e profundidade de bloqueio revelam sua identidade. A partir destas informações é possível calcular a constante de associação e a

constante de dissociação do analito-nanoporo. No caso de um equilíbrio simples, $\tau_{\text{off}} = 1/k_{\text{off}}$, onde τ_{off} é o tempo médio de permanência do analito e k_{off} é a constante de dissociação; e $\tau_{\text{on}} = 1/(k_{\text{on}} [A])$, onde τ_{on} é o tempo médio entre os eventos de ligação, e k_{on} é a constante de associação, e $[A]$ é a concentração do analito. Consequentemente o sensor estocástico permite obter informações sobre dados cinéticos que são extremamente úteis, e difíceis de obtenção por outras técnicas. Em outros casos, a cinética de ligação pode ser mais complexa, mas isto pode ser útil na interpretação de “assinaturas digitais” discretas.

Os biossensores estocásticos apresentam vantagens óbvias em relação aos sensores baseados em outros princípios de detecção, dentre elas podemos destacar: detecção simultânea de mais de um analito (multianalito), elevada sensibilidade e rapidez de análise. A capacidade de detecção de mais de um analito é explicada pela ligação mutuamente exclusiva do analito, graças a restrição de confinamento ao lume aquoso do nanoporo. Deste modo mesmo que dois analitos se liguem ao mesmo sítio no lume aquoso, apenas um deles terá acesso por vez, e serão identificados por gerarem “assinaturas digitais de correntes” específicas.

A α -toxina é o nanoporo adequado para este tipo de elemento sensor, pois, oferece condições de alterações em sua estrutura molecular, possibilitando o seu remodelamento para produzir nanoporos adaptados a detecção de analitos com características físico-químicas bem diferentes.

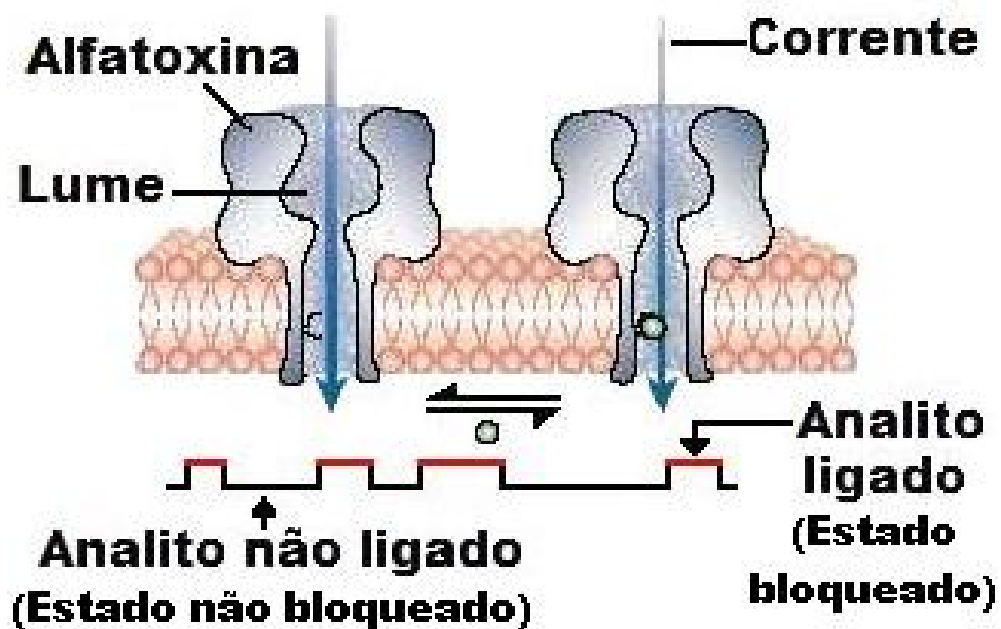


FIGURA 3. Um único poro projetado é colocado numa bicamada lipídica. Quando um potencial é aplicado, uma corrente iônica flui através do poro carregada pelos íons da solução salina banhante da bicamada. O poro contém um sítio de ligação para o analito, representado pela esfera verde. Cada vez que o analito se liga ao poro a corrente é modulada como ilustrado no traçado. Deste modo, monitoram-se os eventos individuais de ligação. A frequência de ocorrência dos eventos revela a concentração do analito, enquanto que a assinatura de corrente (assinatura digital) revela sua identidade (Adaptado de BAYLEY & CREMER, 2001).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem metodológica consiste primordialmente em:

1- Utilização de uma montagem experimental que permite a incorporação de um único nanoporo protéico de estrutura elucidada em uma bicamada lipídica plana de parâmetros conhecidos e controláveis;

2- Sistema de monitoração e aquisição em tempo real dos registros temporais de corrente iônica através do nanoporo aquoso, permitindo a resolução dos eventos de bloqueio a nível molecular;

3- Emprego de métodos teóricos estabelecidos, convencionais e modernos de análise de ruído e cinética de canais iônicos, possibilitando o cálculo dos parâmetros de interesse e sua correlação com os analitos investigados;

4- Escolha de analitos poliméricos quimicamente semelhantes e estáveis, porém de massa e configuração molecular variável, gerando estruturas moleculares de tamanho e formas diferentes, mas, elucidadas.

Obviamente não abordarei o nanoporo formado pela α -toxina nas próximas seções, uma vez que já o fiz anteriormente. Assim sendo descreverei sobre a membrana, sistema de aquisição, emprego dos métodos teóricos e as propriedades físico-químicas dos analitos escolhidos, finalizando com uma descrição geral dos procedimentos experimentais.

2.1. A membrana lipídica plana

Todas as bicamadas lipídicas planas utilizadas neste trabalho foram confeccionadas de acordo com a técnica de MONTAL & MUELLER, 1972. Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica, por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo, em um orifício de uma partição de Teflon[®]

(Politetrafluoretileno) que separa dois compartimentos de uma câmara, também de Teflon[®], contendo soluções aquosas (Figura 4 A). Os filmes monomoleculares de lipídio foram obtidos a partir da deposição de 10 µl de uma solução de diftanoil fosfatidilcolina (Avanti Polar Lipids) 1% (p/v) em hexano (Merck) sobre as soluções aquosas. Depois de 10 minutos, com a evaporação do hexano, há a formação espontânea dos filmes lipídicos na superfície da solução aquosa de cada compartimento. A etapa de formação da membrana propriamente dita, tem início com a injeção de mais solução sob o filme lipídico, elevando-se o nível do líquido no compartimento do lado de trás ou “trans”, até que o menisco atinja o orifício, depositando o primeiro filme. Posteriormente aplica-se o mesmo procedimento para o compartimento frontal ou lado “cis”, até ocorrer a deposição do segundo filme (Figura 4 B e C). Com a finalidade de aumentar a adesão e estabilidade dos filmes lipídicos, as partições foram previamente banhadas em hexadecano 1% (p/v) em hexano (Merck).

Todos os experimentos foram executados sob as seguintes condições: temperatura ambiente de 23 ± 2 °C; todas as partições de Teflon[®] utilizadas apresentavam espessura de 15 µm e orifício de aproximadamente 50-70 µm de diâmetro.

A

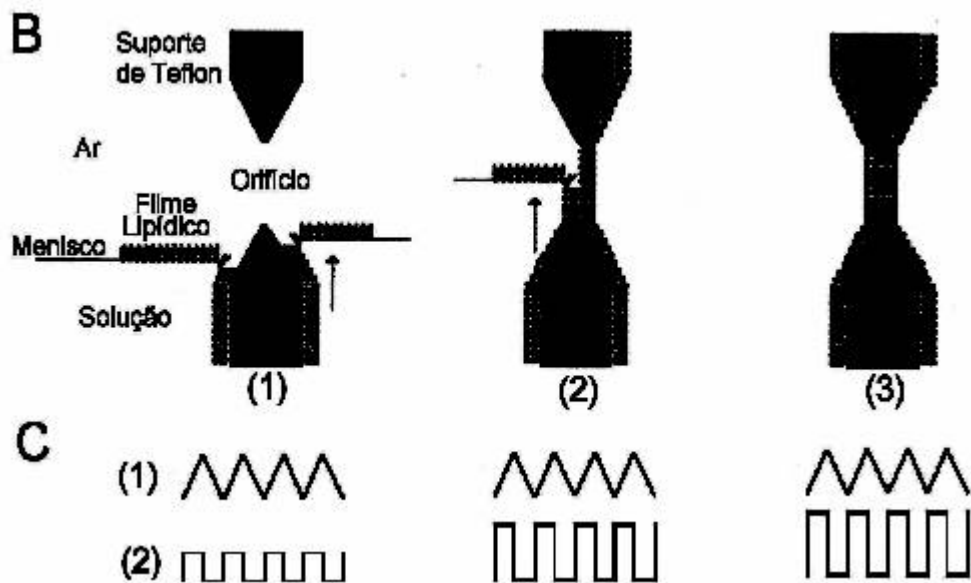
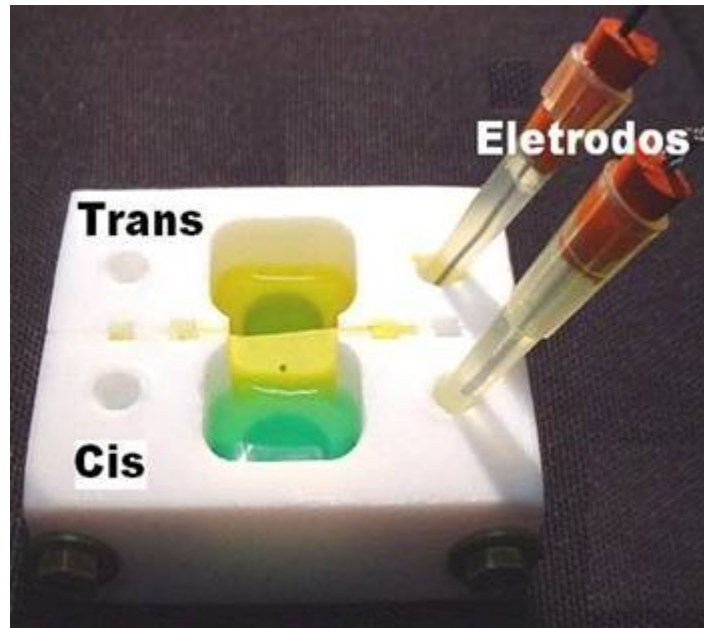


FIGURA 4. Foto da câmara de Teflon® e esquema representativo do processo de construção e da monitoração da bicamada lipídica plana. **A)** Câmara de Teflon® com indicação dos lados cis e trans, e eletrodos de conexão da solução aquosa (verde e amarelo) ao sistema eletrônico de monitoramento e aquisição. **B)** Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; **C)** Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema.

2.2. O sistema de monitoração e aquisição de registros de corrente iônica

Em todos os experimentos o sistema utilizado para aplicação do potencial, monitoração e aquisição dos registros era constituído por um gerador de funções (Hewlett Packard, modelo 3310B), um filtro Butterworth (Frequency devices, modelo 902), um amplificador de patch clamp (Axonpatch 200A ou B) e uma placa conversora analógico-digital (PCI 6221 E, National Instruments Corporation) acoplado a um microcomputador IBM PC, executando o Programa Acquirer gentilmente cedido pelo Doutor Sergey Berzrukov, conectados conforme o esquema da figura 5. Com a finalidade de minimizar a interferência de perturbações mecânicas e eletromagnéticas, a câmara experimental encontrava-se sobre uma mesa de amortecimento de alta performance (TMC 63-500) e blindada por uma gaiola de Faraday.

A conexão dos compartimentos da câmara ao sistema de medidas elétricas era feita através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) (figura 4 A). Ao lado cis (compartimento frontal) da câmara, conectávamos o aterramento do amplificador e, ao lado trans (compartimento de trás), basicamente o amplificador de “patch clamp”.

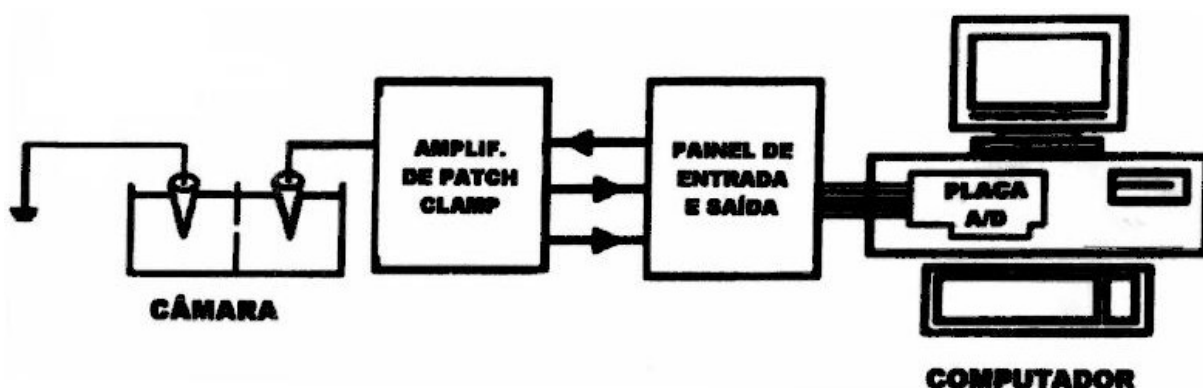


FIGURA 5. Esquema básico do sistema de monitoramento e aquisição de registros de corrente iônica através do nanoporo formado pela α -toxina. O filtro está incorporado no painel de entrada e saída.

2.3. A análise de assinaturas digitais e dados cinéticos

A abordagem geral aplicada na análise de assinaturas digitais e cálculo de parâmetros cinéticos consistem basicamente em (BEZRUKOV, 2000; 2002):

- 1- Calcular a redução relativa (profundidade ou amplitude do bloqueio) de condutância do nanoporo na presença do analito, indicando o grau de preenchimento do lume do canal pelo analito;
- 2- Analisar as flutuações na corrente iônica através do canal, indicativo da cinética de particionamento do polímero entre a solução banhante e o lume aquoso do poro;
- 3- Analisar o espectro do ruído de corrente induzido pela presença do analito no lume aquoso do poro, indicativo da dinâmica do analito no interior do canal.

2.3.1. O princípio do contador molecular

A idéia fundamental da técnica de pulso resistivo empregado nos contadores Coulter (COULTER, 1953), desde a década de 50, pode ser enunciada da seguinte forma: a presença de uma partícula não condutora livre num meio condutor fluindo no interior de um pequeno tubo capilar de vidro, induz um aumento da resistência do capilar em relação àquela quando o meio é preenchido unicamente de partículas condutoras (Figura 6). A magnitude do aumento da resistência está relacionada com o tamanho da partícula.

As mudanças na resistência quando a partícula não condutora se movimenta ao longo do capilar de vidro geram pulsos de corrente, os quais podem ser amplificados e contados. Está técnica foi inicialmente empregada nos equipamentos para contagem de partículas relativamente grandes, como células sangüíneas e bactérias (KUBITSCHKE, 1958).

O decréscimo da condutância (Δg) de um capilar de raio R e comprimento L , preenchido com meio condutor, após a entrada de uma partícula de raio $r < R$ pode ser expressa por (GREGG & STEIDLEY, 1965):

$$\Delta g = \left(\frac{2\pi r^3 \sigma}{L^2} \right) \quad (1)$$

Onde, σ é a condutividade da solução. Obviamente a amplitude do pulso é proporcional a terceira potência do raio da partícula, ou seja, ao seu volume, portanto partículas de tamanho próximo ao raio do capilar, induzem maior profundidade de bloqueio e eventos (pulsos) completamente discerníveis no tempo. Por outro lado, partículas muito menores que o capilar, os “pulsos gerados”, também diminuem a condutância, mas não são discretizados, pelos atuais amplificadores de “*patch clamp*”. Neste caso podemos usar a abordagem três, análise espectral do ruído, para obtermos os parâmetros da “assinatura digital”.

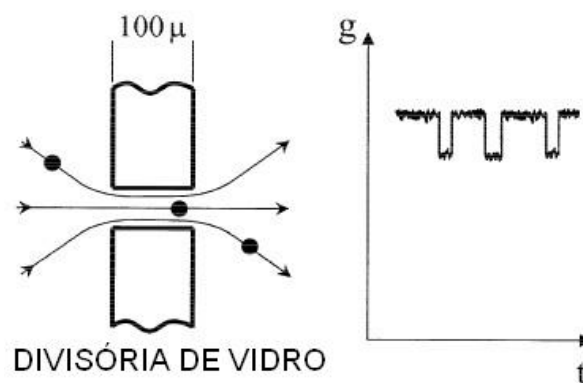
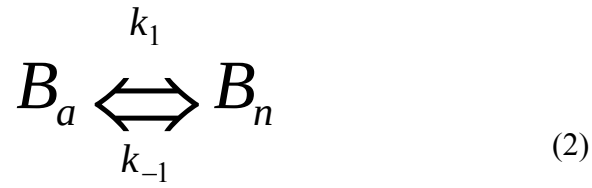


FIGURA 6 – O contador de Coulter. O fluxo de líquido mantido por diferença de pressão externa movimenta partículas microscópicas através do orifício numa divisória de vidro. A entrada de cada partícula no orifício produz um pulso na condutância. O número de pulsos por segundo relata a concentração e o tamanho da partícula pode ser inferido pela amplitude do pulso (BERZRUKOV, 2000).

2.3.2. Flutuações de condutância

A análise dos eventos discretizados de bloqueio pode ser realizada, inicialmente, adotando-se um modelo de dois estados, onde em um, o nanoporo está ocupado pelo analito (estado bloqueado, B_a), e no outro não-bloqueado (B_n), conseqüentemente podemos representá-los esquematicamente por:



Onde, k_1 e k_{-1} correspondem as constantes de transição entre esses estados. Considerando que os fenômenos de bloqueio e desbloqueio do nanoporo são independentes, uma maneira prática de calcular a média do tempo de permanência no estado bloqueado ou no estado não-bloqueado, é estabelecer a função densidade de probabilidade ($F(t)$) regente destes tempos em cada um dos estados. Assim sendo, um histograma de frequência dos tempos de permanência em cada estado, e admitindo uma função densidade de probabilidade do tipo exponencial (COLQUHOUN & SIGWORTH, 1995; COLQUHOUN & HAWKES, 1995),

$$F(t) = ae^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3)$$

Onde τ corresponde a constante de decaimento da curva exponencial, e $a = \tau^{-1}$. Deste modo $1/\tau$ representa a média do tempo de permanência no estado bloqueado ou no estado não-bloqueado, ou seja, é igual a k_1 ou k_{-1} , respectivamente (COLQUHOUN & HAWKES, 1982).

Considerando que o analito interage com o nanoporo numa reação bimolecular, pode-se calcular a constante de associação e a constante de dissociação do analito-nanoporo. No caso de um equilíbrio simples $\tau_1=1/k_1$, onde τ_1 é a média do tempo de bloqueio pelo analito e k_1 é a constante de dissociação; e $\tau_{-1} = 1/(k_{-1} [A])$, onde τ_{-1} é a média do tempo de não-bloqueio, k_{-1} é a constante de associação e $[A]$ é a concentração do analito (MOVILEANU et al, 2005). Deste modo a constante de equilíbrio K pode ser calculada, podemos admitir que o coeficiente de partição (Π) é proporcional a concentração do analito no lume aquoso, representado por:

$$\Pi = K[A_i] \quad (4)$$

Onde, $[A_i]$ é a concentração do analito no interior do nanoporo aquoso.

2.3.3. Análise espectral do ruído de corrente

As duas condições de análise descritas anteriormente são válidas quando é possível discretizar os eventos de bloqueio, ou seja, temporalmente “resolvê-los”. Quando o analito apresenta um tamanho muito menor que o diâmetro do nanoporo, ou a força de interação entre o poro e o analito é pequena, isto não é possível diretamente, mas os parâmetros cinéticos que também permitem a identificação do analito podem ser calculados de maneira indireta, empregando análise espectral do ruído de corrente.

Considerando que a média das flutuações de condutância do nanoporo, pode ser obtida por Δg vezes $\langle N \rangle$, onde, Δg é o decréscimo de condutância induzido pela presença do analito e $\langle N \rangle$, o número de moléculas do analito no nanoporo, pode-se demonstrar que o

coeficiente de difusão (D) do analito no interior do lume aquoso é expresso por (BEZRUKOV & VODYANOV; 1994):

$$D = \Delta g \langle \Delta g_a \rangle L^2 V^2 / 3 S_I(0) \quad (5)$$

Onde $\langle \Delta g_a \rangle$, é o decréscimo médio de condutância do nanoporo induzido pela presença de uma única molécula do analito; V é a voltagem transmembrana, L é o comprimento do nanoporo e $S_I(0)$, é a densidade espectral de potência do ruído de corrente de baixa frequência induzido pela partícula.

O fenômeno de bloqueio e não-bloqueio do nanoporo pode ser descrito por um processo Markoviano de dois estados, e as constantes de interação entre o analito e o nanoporo podem ser calculadas da análise espectral de potência do ruído de corrente ($S_I(f)$) através da expressão (MACHLUP, 1954),

$$S_I(f) = 4(\Delta i)^2 \frac{\tau^2}{\tau_1 + \tau_{-1}} \frac{1}{1 + (2\pi f \tau)^2} \quad (6)$$

onde Δi é a redução da corrente via nanoporo na presença de uma única molécula do analito; f é a frequência; τ_1 é a média do tempo de bloqueio; τ_{-1} é a média do tempo de não-bloqueio e τ , o tempo de relaxação definido como ($\tau = \tau_1 \tau_{-1} / (\tau_1 + \tau_{-1})$). A probabilidade de encontrar o poro ocupado com a substância é,

$$p = \frac{\tau_1}{\tau_1 + \tau_{-1}} \quad (7)$$

Na condição onde $f \ll 1/(2\pi\tau)$, a equação (6) pode ser reescrita de forma simplificada como,

$$\tau_1 = \frac{1}{p(1-p)^2} \frac{S_I(0)}{4(\Delta i)^2} \quad (8)$$

onde $S_I(0)$ é a densidade espectral na região de baixa frequência. Deste modo, o ruído médio de corrente $\langle \Delta I \rangle$, depende da probabilidade de bloqueio $\langle \Delta I \rangle = p \Delta i$, expressa por:

$$p = \langle \Delta I \rangle / \Delta i \quad (9)$$

Conseqüentemente a média do tempo de permanência do analito no poro é dada por:

$$\tau_1 = \frac{S_I(0)}{4\langle \Delta I \rangle \Delta i} \frac{1}{(1 - \langle \Delta I \rangle / \Delta i)^2} \quad (6)$$

Onde um único parâmetro permanece desconhecido, Δi , a redução da corrente iônica do nanoporo, que pode ser determinado experimentalmente. Conhecendo-se τ_1 e τ_{-1} é possível determinar o coeficiente de partição como já descrito no tópico 1.4.2., mesmo na ausência de bloqueios característicos, ou seja, discretizados.

A principal dificuldade da implementação destas abordagens, no sentido de viabilizar o desenvolvimento de um biossensor estocástico baseado na α -toxina, é uma ferramenta computacional, ou seja, um programa que além de integralizar as três formas de análise, tenha

a capacidade de baseado no registro de corrente, reconhecer preliminarmente quais devem ser escolhidas para uma melhor identificação e quantificação da concentração do(s) analito(s).

2.4. A escolha de analitos poliméricos

A escolha de analitos poliméricos do etilenoglicol em suas formas, circular, o éter de coroa, e linear, o polietilenoglicol, deve-se basicamente a sua semelhança e estabilidade química, possibilitando a geração de estruturas moleculares de tamanho e formas diferentes, mas, elucidadas em diversas condições. Adicionalmente esta classe de moléculas têm recebido especial interesse por parte da comunidade científica nos últimos anos, uma vez que diversos estudos nas ciências básicas e aplicações biotecnológicas foram descritos (HARRIS, 1992; SOLOMONS & FRYHLE, 2001). Os éteres de coroa são chamados de x-coroa-y, onde x é o número total de átomos no anel e y é o número de átomos de oxigênio. O 18-coroa-6 consiste de seis unidades de óxido de etileno unidas covalentemente em um anel macrocíclico, portanto diferem do polietilenoglicol (linear), unicamente pela ausência de grupos terminais (BEZRUKOV et al, 2004; WHEI & BRITO NETO, 1998). O 18-coroa-6 interage com cátions, principalmente potássio, aprisionando-o em seu anel macrocíclico, através de campos elétricos gerados por ligações do tipo íon-dipolo (IZATT & CHRISTENSEN, 1981). Este tipo de relacionamento é denominado hospedeiro-hóspede, permitindo o emprego destes compostos cíclicos em diversas aplicações como sondas moleculares (DAVID & BRODBELT, 2003), componentes de sensores (REESE & ASHER, 2003) e até como droga (BORREL et al, 1995).

Por outro lado, os polietilenoglicóis são estruturas lineares e normalmente maiores que os éteres de coroa, apresentando-se em soluções aquosas na forma enovelada, podendo formar complexos com diversos íons, incluindo o potássio. De maneira similar aos éteres de coroa, os polietilenoglicóis não apresentam grupos ionizáveis, portanto, são classificados

como não eletrólitos, possibilitando sua aplicação em diversas áreas. Na pesquisa básica os polietilenoglicóis foram utilizados como sondas moleculares para determinação, em condições dinâmicas, da geometria de canais iônicos (KRASILNIKOV et al, 1992; MERZLYAK et al, 1999). Na área farmacêutica são empregados principalmente como meio dispersor de medicamentos (HARRIS, 1992).

Deste modo em função das propriedades físico-químicas descritas e das investigações relativas a interação de éter de coroa e polietilenoglicóis com poros protéicos já realizados; juntamente com a importância do monitoramento e quantificação destas moléculas em meios aquosos, permite-nos deduzir que este polímeros atendem a abordagem metodológica deste trabalho.

2.5. Procedimentos experimentais gerais

O protocolo experimental consistia basicamente em após a confecção da bicamada lipídica plana, aplicavam-se pulsos de voltagem de ± 80 mV para verificar a integridade elétrica da membrana, através da medida de sua condutância basal. Após constatação da integridade elétrica da membrana, adicionava-se ao compartimento cis da câmara, a α -toxina nas concentrações especificadas no artigo e manuscrito (ver resultados). Após a incorporação de um canal, aplicavam-se pulsos de voltagem de ± 20 a ± 200 mV (faixa de variação de 20 mV), para determinação da condutância do canal em cada uma das voltagens. Posteriormente adicionava-se o analito (éter de coroa ou polietilenoglicol) ao compartimento trans da câmara e repetia-se a seqüência de voltagens. Este procedimento era repetido para concentrações crescentes de cada um dos analitos (ver resultados).

Antes do início de cada experimento testava-se sempre a assimetria nos potenciais de junção dos eletrodos. Em caso de assimetria dos potenciais de junção acima de 1 mV, o par de eletrodos era substituído por outro. A medida dos potenciais dos eletrodos também era feita

logo após o término de cada experimento e nos casos de assimetria acima de 1 mV, descartava-se os registros obtidos.

3. JUSTIFICATIVA

A identificação e quantificação de analitos em diferentes amostras são de importância fundamental em diversas áreas, das ciências básicas até aplicações tecnológicas na medicina diagnóstica, indústria farmacêutica, controle de poluentes, indústria química e biotecnologia, dentre outras.

Assim sendo, o desenvolvimento de novos sensores e biossensores desperta interesse na comunidade científica, e o aporte financeiro tem sido considerável nos últimos anos. Estimativas do National Institute of Standards and Technology indicam que foram investidos nos Estados Unidos, nos anos de 1999 a 2003 aproximadamente 145.000.000,00 (cento e quarenta e cinco milhões) de dólares para o desenvolvimento de novos dispositivos sensores baseados somente na tecnologia de análise de ácido desoxirribonucleico (DNA) (BIOTECHNOLOGY INFORMATION CENTER-NATIONAL AGRICULTURAL LIBRARY/USDA). Nos países em desenvolvimento o investimento tem sido menor, mas, existe unanimidade na comunidade científica e órgãos governamentais financiadores de ciência e tecnologia, como o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que a área de biotecnologia seja priorizada com apoio financeiro (www.cnpq.br).

Com os recentes avanços da nanotecnologia ocorreu naturalmente uma busca pela miniaturização dos dispositivos sensores já existentes, como também o desenvolvimento de sensores baseados em elementos sensores de dimensões nanoscópicas, tais como nanotubos de carbono, nanotubos de ouro, dentre outros (SUN et al, 2000; LI et al, 2003; ITO et al, 2004; SUTHERLAND, et al, 2004).

Os diversos princípios envolvidos nos mecanismos de detecção presentes nos sensores para analitos, comercializados, limita-os ao monitoramento e geração de uma resposta integral, ou seja, que vários eventos ocorram até a expressão de uma resposta

informativa do fenômeno analisado (BAKKER & TELTING-DIAZ, 2002; MARZIALI & AKESON, 2001). Esta limitação não se restringe unicamente à quantificação do analito, mas, impede que o elemento sensor reconheça mais de um analito simultaneamente.

Por outro lado, algumas estruturas biológicas, principalmente, as biomoléculas formadoras de canais iônicos aquosos apresentam propriedades intrínsecas evolutivamente selecionadas, tornando-as elementos sensores naturais, capazes de “sentir” eficientemente eventos imperceptíveis a outros dispositivos.

O princípio do sensoriamento estocástico, ou seja, a capacidade de detecção de eventos unitários quantizados, é constantemente aplicada pelos sistemas vivos, além da detecção simultânea de mais de um analito, portanto, os nanoporos unitários são as ferramentas preferenciais para o desenvolvimento de biossensores. Nesta perspectiva nanoporos aquosos como poros nucleares (BUSTAMANTE et al, 2000; MAZZANTI et al, 2001) e particularmente os poros formados por α -toxina (KRASILNIKOV & BEZRUKOV, 2004; MOVILEANU et al, 2003) têm servido como modelo, no estudo do mecanismo de permeação e particionamento de polímeros naturais e também sintéticos solúveis em água.

Assim sendo, a adaptação destas estruturas nanoscópicas como elemento sensores é um obstáculo a ser vencido, mas, com perspectivas promissoras para a tecnologia de biossensores.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Examinar a viabilidade de utilização do nanoporo protéico formado pela α -toxina, como elemento sensor baseado no princípio estocástico.

4.2. Específicos

1. Estudar o mecanismo de transporte de éteres de coroa e polietilenoglicóis através de nanoporos unitários formados pela α -toxina em bicamadas lipídicas planas;
2. Estudar a dinâmica do particionamento de éteres de coroa e polietilenoglicol no lume aquoso do nanoporo formado pela α -toxina.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. *Imunologia celular e molecular*. pp. 98-2004. Ed. Elsevier (2005).

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. *The plasma membrane*. pp. 255-315. *The molecular biology of the cell*. 4^a Edição. New York. Garland Publishing. Inc. Ed. (2002).

AXON INSTRUMENTS CORPORATION. Internet 2005. Disponível em: <http://www.axon.com>. Acesso em: 06 jun. 2005.

BAKKER E & TELTING-DIAZ M. Electrochemical sensors. *Anal Chem* (2002) 74:2781-2800.

BALDWIN SA. *Membrane transport practical approach*. Ed. Oxford University Press (2000).

BAYLEY H & CREMER PS. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature* (2001) 413 (13): 226-230.

BAYLEY H, BRAHA O, GU LQ. Stochastic sensing with protein pores. *Adv Mater* (2000) 12, 139–142.

BAYLEY H. Pore-forming proteins with built-in triggers and switches. *Bioorg Chem* (1995) 23:340–354.

BELTRÃO EIC, MEDEIROS PL, RODRIGUES OG, FIGUEIREDO-SILVA J, VALENÇA MM, COELHO LCBB, CARVALHO JR, LB. Parkia pendula lectin ashitochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur Jour Histo* (2003) 47:139-142.

BEZRUKOV SM & VODYANOY I. Noise in biological membranes and other relevant ionic systems. In: *Advances in Chemistry Series*, v. 235. *Biomembrane Electrochemistry*. M. Blank and I. Vodyanoy, editors. pp. 375–399. American Chemical Society, Washington, DC. (1994).

BEZRUKOV SM, KRASILNIKOV OV, YULDASHEVA N, BEREZHKOVSKII AM, RODRIGUES CG. Field-Dependent Effect of Crown Ether (18-Crown-6) on Ionic Conductance of α -Hemolysin Channels. *Biophys J* (2004) 8:3162–3171.

BEZRUKOV SM. Dynamic partitioning of neutral polymers into a single ion channel. In *Structure and Dynamics of Confined Polymers* (eds Kasianowicz, J. J., Kellermayer, M. S. Z. & Deamer, D. W.) (Kluwer, Dordrecht) (2002) 117–130.

BEZRUKOV SM. Ion channels as molecular Coulter counters to probe metabolite transport. *J Membrane Biol* (2000) 174:1–13.

BIOTECHNOLOGY INFORMATION CENTER-NATIONAL AGRICULTURAL LIBRARY/USDA (<http://www.accessexcellence.org>). Acesso em 12/2003.

BORREL MN, FIALLO IV, GARNIEAR-SUILLEROT A. The effect of crown ethers, tetraalkylammonium salts, and polyoxyethylene amphiphiles on pirarubicin incorporation in K526 resistant cells. *Biochem pharmacol* (1995) 50:2069-2076.

BRAHA O, B WALKER, CHELEY S, KASIANOWICZ JJ, SONG L, GOUAUX JE, BAYLEY H. Designed protein pores as components for biosensors. *Chem Biol* (1997) 4:497–505.

BUSTAMANTE JO, MICHELETTE ERF, GEIBE, JP, MCDONNELL TJ, HANOVER JA, DEAN DA. Dendrimer-assisted patch-clamp sizing of nuclear pores. *Pflugers Archiv Eur Jour Physiol* (2000) 439(6):123-132.

CASTILLO J, GÁSPÁR S, LETH S, NICULESCU M, MORTARI A, BONTIDEAN I, SOUKHAREV V, DORNEANU SA, RYABOV AD, CSÖREGI E. Biosensors for life quality Design, development and applications. *Sensors and Actuators B* (2004) 102:179–194.

COLQUHOUN D & HAWKES AG. On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts. *Philos T Roy Soc B* (1982) 300:1–59.

COLQUHOUN D & HAWKES AG. The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. In *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York. pp. 397-482, (1995).

COLQUHOUN D & SIGWORTH FJ. Fitting and statistical analysis of single channel records. In *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York. pp. 483-587 (1995).

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. Internet 2004. Disponível em <http://www.cnpq.br>. Acesso em: 04 mar. 2004.

CORNELL BA, BRAACH-MAKSVYTIS VLB, KING LG, OSMAN PDJ, RAGUSE B, WIECZOREC L, PACE RJ. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* (1997) 387:580–83.

COULTER WH. U.S. Patent No. 2,656,508, issued 20 Oct. (1953).

DAVID WM, BRODBELT JS. Threshold dissociation energies of protonated amine/polyether complexes in a quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14:383-92.

FISHMAN HA, GREENWALD DR, ZARE RN. Biosensors in chemical separations *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (1998) 27:165–98.

GENNIS, RB. *Biomembranes molecular structure and function*. pp 1-35. Ed. Springer-Verlag, (1989).

GREGG EC, STEIDLEY KD. Electrical counting and sizing of mammalian cells in suspension. *Biophys J* (1965) 5:393–405.

GU LQ, BRAHA O, CONLAN S, CHELEY S, BAYLEY H. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* (1999) 398:686-690.

HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membranes. *Pflüger Arch Ges Physiol* (1981) 391:85-100.

HARRIS JM. Poly(ethylene glycol) chemistry biotechnical and biomedical applications. Ed. Plenum press (1992).

HILLE B. Ionic channels of excitable membranes. Ed. Sinauer Associates Inc. Publishers (1992).

HLADKY SB, HAYDON DA. Discreteness of conductance change in biomolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. *Nature* (1970) 225:451–453.

ITO T, SUN L, BEVAN MA, CROOKS RM. Comparison of nanoparticle size and electrophoretic mobility measurements using a carbon-nanotube-based Coulter counter, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and phase analysis light scattering. *Langmuir* (2004) 20:6940-6945.

IZATT RM & CHRISTENSEN JJ. Progress in macrocyclic chemistry. pp. 43-84. Ed. John Wiley e sons inc. (1981).

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. Principles of neural science. Ed. McGraw-Hill, (2000).

KASIANOWICZ JJ, BRANDIN E, BRANTON D, DEAMER DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sc USA*. (1996) 93:13770–13773.

KASIANOWICZ JJ, HENRICKSON SE, MISAKIAN M, WEETALL, HH, ROBERTSON B. In: Structure and Dynamics of Confined Polymers (eds Kasianowicz, J. J., Kellermayer, M. S. Z. & Deamer, D.W.) 141–163 (Kluwer, Dordrecht) (2002).

KASIANOWICZ JJ, WALKER B, KRISHNASASTRY M, BAYLEY H. Genetically engineered pores as metal ion biosensors. *MRS Symp Proc* (1994) 330:217-223.

KASIANOWICZ JJ, BURDEN DB, HAN LC, CHELEY S, BAYLEY H. Genetically engineered metal ion binding sites on the outside of a channel's transmembrane β -barrel. *Biophys J* (1999) 76:837–845.

KOCK C. Biophysics of computation information processing in single neurons. Ed. Oxford University Press (2000).

KRASILNIKOV OV, BEZRUKOV SM. Polymer partitioning from nonideal solutions into protein voids. *Macromolecules* (2004) 37:2650-2657.

KRASILNIKOV OV, MERZLYAK PG, YULDASHEVA LN, RODRIGUES CG, BHAKDI S, VALEVA A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* (2000) 37:1372–1378.

KRASILNIKOV OV, SABIROV RZ, TERNOVSKY VI, MERZLIAK PG, TASHMUKHAMEDOV BA. The structure of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced ionic channel. *Gen Physiol Biophys* (1988) 7:467–473.

KRASILNIKOV OV, SABIROV RZ, TERNOVSKY VI, MERZLIAK PG, MURATKHODJAEVJ N. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *Microbiol Immunology* (1992) 5: 93-100.

KRASILNIKOV OV, TERNOVSKY VI, TASHMUKHAMEDOV BA. Properties of conductivity channels induced in phospholipid bilayer membranes by alpha-staphylotoxin. *Biofizika* (1981) 26:271–275.

KUBITSCHKE HE. Electronic counting and sizing of bacteria. *Nature* (1958) 182:234–235.

LI J, GERSHOW M, STEIN D, BRANDIN E, GOLOVCHENKO JA. DNA molecules and configurations in a solid state nanopore microscope. *Nature materials* (2003) 2:611-615.

MACHLUP S. Noise in semiconductors: spectrum of a two-parameter random signal. *J Appl Phys* (1954) 25:341–343.

MARZIALI A & AKESON M. New DNA sequencing methods. *Ann Rev Biomed Eng* (2001) 3:195-223.

MAZZANTI M, BUSTAMANTE JO, OBERLEITHNER H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol Rev* (2001) 81(1):1-19.

MERZLYAK PG, YULDASHEVA LN, RODRIGUES CG, CARNEIRO CMM, KRASILNIKOV OV, BEZRUKOV SM. Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the alpha-toxin transmembrane channel. *Biophys J* (1999) 77:3023–3033.

MONTAL M & MUELLER P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Nat Acad Sci USA* (1972) 69(12):3561-3566.

MOORE P. Ion channels and stem cells. *Nature* (2005) 438:699-702.

MOVILEANU L, CHELEY S, BAYLEY B. Partitioning of individual flexible polymers into a nanoscopic protein pore. *Biophys J* (2003) 85:897–910.

MOVILEANU L, SCHMITTSCHMITT JP, SCHOLTZ JM, BAYLEY B. Interactions of peptides with a protein pore. *Biophys J* (2005) 89:1030–1045.

NANION CORPORATION. Internet 2005. Disponível em: <http://www.nanion.de>. Acesso em: 06 jun. 2005.

NEHER E, SAKMANN B. The patch clamp technique. *Sci Am* (1992) 266(3):28-35.

NICHOLLS DG. Proteins, transmitters and synapses. Ed. Blackwell Scientific Publications (1995).

REESE CE & ASHER SA. Photonic crystal optrode sensor for detection of Pb²⁺ in high ionic strength environments. *Anal Chem* (2003) 75 (15):3915-8.

SACKMANN E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* (1996) 271:43-48.

SCHELLER FW, WOLLENBERG U, WARSINKE A, LISDAT F. Research and developments in biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* (2001) 12:35-40.

SCHULTZ GS, ANDREOLI TE, BROWN AM, FAMBROUGH DM, HOFFMAN JF, WELSH MJ. *Molecular biology of membrane transport disorders*. Ed. Plenum Press (1996).

SOLOMONS G & FRYHLE C., *Química orgânica*. pp. 442 e 443. Ed. LTC, sétima edição, volume 1, 2001.

SONG L, HOBAUGH MR, SHUSTAK C, CHELEY S, BAYLEY H, GOUAUX JE. Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* (1996) 274:1859–1866.

SUN L & CROOKS R. Single carbon nanotube membranes: a well-defined model for studying mass transport through nanoporous materials. *J Am Chem Soc* (2000) 122:12340-12345.

SUTHERLAND TC, LONG YT LONG, STEFUREAC RI, BEDIAKO-AMOA I, KRAATZ HB, LEE JS. Structure of peptides investigated by nanopore analysis. *Nano letters* (2004) 7(4):1273-1277.

SZABO I, BATHORI G, TOMBOLA F, COPPOLA A, SCHMEHL I, BRINI M, GHAZI A, DE PINTO V, ZORATTI M. Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin. *FASEB J* (1998) 12:(6)495-502.

TIEN HT, LEITMANNOVA AO. *Membrane biophysics as viewed from experimental bilayers lipid membranes (planar lipid bilayers and spherical liposomes)*. Ed. Elsevier (2000).

TURNER APF. Switching channels makes sense. *Nature* (1997) 387:555-556.

VOET D & VOET JG. *Biochemistry*. 2 Edição. Ed. John Wiley & Sons (1995).

WANG J. Real-time electrochemical monitoring: toward green analytical chemistry. *Acc Chem Res* (2002) 35:811-816.

WEISS FT. Cellular biophysics. Ed. MIT Press, vol.1, (1996).

WHEI OL, BRITO NETO JTX. Complexing agents: podands, coronands and cryptands classification and nomenclature. Quím Nova (1998) 21(5):630-634.

WILSON GS, GIFFORD R. Biosensors for real-time in vivo measurements. Biosensors & Bioelectronics (2005) 20:2388-2403.

ZIGMOND MJ, BLOOM FE, LANDIS SC, ROBERTS JL, SQUIRE LR. Fundamental neuroscience. Ed. Academic Press (1999).

6. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Field-Dependent Effect of Crown Ether (18-Crown-6) on Ionic Conductance of α -Hemolysin Channels.

Autoria: Bezrukov SM, Krasilnikov OV, Yuldasheva N, Berezhkovskii AM, Rodrigues CG. Biophys. J (2004) 8:3162–3171.

Este artigo foi em colaboração com o grupo do Doutor Sergey M Berzrukov do Laboratory of Physical and Structural Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 USA.

Impact Factor: 4.585.

Field-Dependent Effect of Crown Ether (18-Crown-6) on Ionic Conductance of α -Hemolysin Channels

Sergey M. Bezrukov,* Oleg V. Krasilnikov,[†] Liliya N. Yuldasheva,[†] Alexander M. Berezhkovskii,[‡] and Claudio G. Rodrigues[†]

*Laboratory of Physical and Structural Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 USA; [†]Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; and [‡]Mathematical and Statistical Computing Laboratory, Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 USA

ABSTRACT Closing linear poly(ethylene glycol) (PEG) into a circular “crown” dramatically changes its dynamics in the α -hemolysin channel. In the electrically neutral crown ether (C₂H₄O)₆, six ethylene oxide monomers are linked into a circle that gives the molecule ion-complexing capacity and increases its rigidity. As with linear PEG, addition of the crown to the membrane-bathing solution decreases the ionic conductance of the channel and generates additional conductance noise. However, in contrast to linear PEG, both the conductance reduction (reporting on crown partitioning into the channel pore) and the noise (reporting on crown dynamics in the pore) now depend on voltage strongly and nonmonotonically. Within the whole frequency range accessible in channel reconstitution experiments, the noise power spectrum is “white”, showing that crown exchange between the channel and the bulk solution is fast. Analyzing these data in the framework of a Markovian two-state model, we are able to characterize the process quantitatively. We show that the lifetime of the crown in the channel reaches its maximum (a few microseconds) at about the same voltage (~100 mV, negative from the side of protein addition) where the crown’s reduction of the channel conductance is most pronounced. Our interpretation is that, because of its rigidity, the crown feels an effective steric barrier in the narrowest part of the channel pore. This barrier together with crown-ion complexing and resultant interaction with the applied field leads to behavior usually associated with voltage-dependent binding in the channel pore.

INTRODUCTION

Crown ether molecules can be thought of as cyclic versions of linear poly-(ethylene glycol) (PEG) molecules. Disregarding end groups, crown ether (C₂H₄O)₆ differs from its linear counterpart only in its topology. Our experiments with single α -hemolysin channels reconstituted in planar lipid bilayers reveal dramatic differences between the crown and PEG effects on the channel conductance. Fig. 1 compares effects of the two compounds on the channel conductance in 1 M KCl aqueous solutions at their symmetrical addition on both sides of the bilayer. The crown effect on the small-ion current through the channel is highly voltage dependent and asymmetric, whereas the PEG-induced conductance reduction is only slightly sensitive to the voltage. The effect of the crown increases >10-fold with the decreasing positive voltage and shows a characteristic turnover behavior at high negative voltages. Thus, changing topology of the molecule by closing linear PEG into a circle leads to dramatic changes in the effect of the molecule on the channel conductance.

The focus of this article is on the voltage-dependent exchange of the crown between the channel pore and the

bulk solution, the process underlying the crown effect on conductance. Using experimentally measured current-voltage dependences and the power spectral densities of the current fluctuations, we are able to extract parameters of the exchange kinetic. We find that the crown residence time in the channel shows a turnover behavior as a function of the applied voltage. An explanation of the turnover behavior in the framework of a voltage-biased diffusion model is suggested whereas the complete theory will be published separately.

Large ion channels are key structural elements of metabolite exchange between different cellular compartments and between cells (Nikaido, 2003). Understanding of the main physical principles and structural aspects involved in large-channel permeability and selectivity is still far from being satisfactory, and our progress relies on the detailed knowledge of the transport phenomenology. This knowledge can be obtained in experiments with single channels reconstituted into planar bilayers by studying the effect of penetrating molecules on the ionic current through the channel. High-resolution conductance recording and appropriate statistical analyses allow one to quantitatively evaluate solute partitioning into, and dynamics within, the confines of ion channel aqueous pores (Bayley and Martin, 2000; Bezrukov, 2000).

α -Hemolysin is one of the toxins produced by *Staphylococcus aureus*. The ability of this 33.2-kDa protein to form channels in planar lipid bilayers was discovered more than

Submitted April 19, 2004, and accepted for publication August 19, 2004.

Address reprint requests to Dr. Oleg V. Krasilnikov, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Depto. de Biofísica e Radiobiologia, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP 50670-901. Tel.: 55-81-2126-8535; Fax: 55-81-2126-8560; E-mail: kras@ufpe.br.

© 2004 by the Biophysical Society

0006-3495/04/11/3162/10 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.104.044453

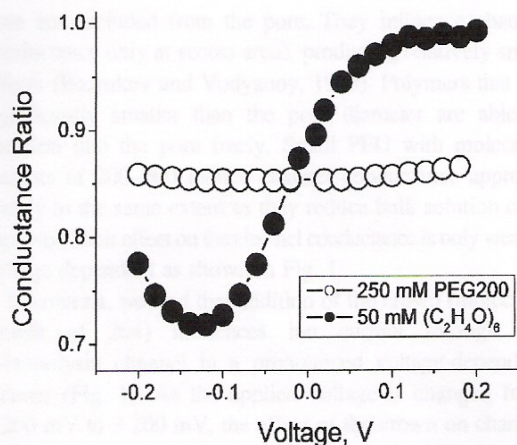


FIGURE 1 Comparison of the effects of the crown ether ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)₆ (●) and poly(ethylene glycol) (PEG) with molecular weight of 200 (○) on the conductance of a single α -hemolysin channel reconstituted in a planar bilayer. Both the crown and PEG were added symmetrically to 1 M KCl solutions on both sides of the membrane. In both cases conductance is normalized to its value in pure salt solution. To facilitate the comparison, PEG was applied in a fivefold higher concentration than the crown.

20 years ago (Krasilnikov et al., 1980, 1981). The three-dimensional crystal structure of the channel is now known with high resolution (Gouaux et al., 1994; Song et al., 1996). According to the crystal structure, the channel is comprised of seven monomers – a result recently confirmed in electrophysiological experiments with single α -hemolysin channels reconstituted into planar lipid bilayers (Krasilnikov et al., 2000). The geometry of the water-filled lumen of such reconstituted channels and their asymmetrical position with respect to the membrane plane were also studied (Krasilnikov et al., 1988; Merzlyak et al., 1999). There are two distinct regions of the lumen of the channel (Fig. 2 A). On the *cis*-side (which is the side of the protein addition) the channel has a large cavity, which measures ~ 4.6 nm in the internal diameter and is mainly located outside the membrane. In the transmembrane domain, the channel lumen narrows to form a 14-stranded β -barrel with an average internal diameter of ~ 2.0 nm. These two domains are separated by a constriction zone whose diameter is ~ 1.4 nm. α -Hemolysin channel is recognized as a highly promising tool for biotechnology (Bayley, 1995; Kasianowicz, et al., 1996; Braha et al., 1997; Gu et al., 1999, 2000; Bayley and Martin, 2000; Howorka et al., 2001; Cheley et al., 2002; Nakane et al., 2003; Meller, 2003).

Here we investigate interactions between the α -hemolysin channel and the crown ether 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctane (18-crown-6) whose structure is shown in Fig. 2 B. Studies of the crown ethers' effects on the conductance of ion channels are important because the crown ether superfamily was shown to exhibit a range of pharmacological effects (Pressman, 1976; Brown and Foubister, 1983; Kolbeck et al., 1992; Gurbanov et al., 1993; Borrel et al., 1995). The 18-crown-6 consists of six ethylene oxide

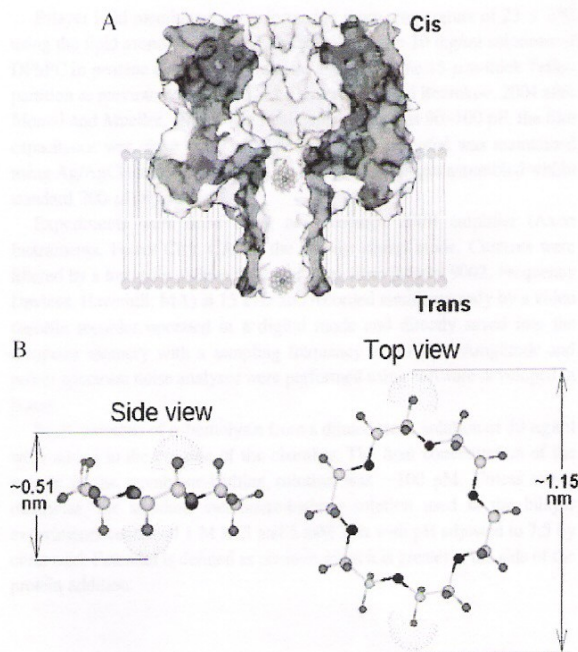


FIGURE 2 Schematic illustrations of the channel and crown. (A) α -Hemolysin channel in the presence of the crown ether. The stem region of the channel is a cylindrical β -sheet barrel. Cartoon shows the relative sizes of the open channel and crown/ K^+ complexes. Adapted from Gu et al. (2000). (B) Ball-and-stick model of the crown ether. CS Chem3D Pro (CambridgeSoft, Cambridge, MA) was used to build the model and to draw the figure. The atoms are represented with the following color scheme: O (black), H (gray), and C (light gray). Van der Waals spheres (dotted) are shown for two opposite H atoms. The largest and smallest sizes of the crown molecule are 1.15 nm and 0.51 nm, correspondingly. The structure is in agreement with crystallographic data (Steed and Atwood, 2000).

$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ units joined covalently in a macrocyclic ring. Neglecting the end groups of linear poly(ethylene glycol) (PEG), the only difference between the two molecules is in their topology.

The crown does not possess ionizable groups and, therefore, belongs to nonelectrolytes. However, it has a ring of oxygen atoms surrounded by an external hydrophobic ring. These structural features enable the crown to form stable complexes with alkaline metal ions (Pedersen, 1968, 1988; Ozutsumi and Ishiguro, 1992) in which the metal ion binds near the center of the oxygen ring.

In our previous studies of the PEG effects on the α -hemolysin channel conductance it was shown that polymer partitioning is size (Krasilnikov et al., 1988, 1992; Bezrukov et al., 1996) and concentration (Krasilnikov and Bezrukov, 2004) dependent. Polymer partition coefficient was deduced from the effect of polymers on channel conductance. Added at the same weight concentration, differently sized polymers reduce the bulk solution conductivity to a similar extent (e.g., Krasilnikov, 2002; Stojilkovic et al., 2003). However, they act on channel conductance in a size-dependent manner. When polymer concentrations are not too high, polymer coils that are much larger than the diameter of the channel

pore are excluded from the pore. They influence channel conductance only at access areas, producing relatively small effects (Bezrukov and Vodyanoy, 1993). Polymers that are significantly smaller than the pore diameter are able to partition into the pore freely. Small PEG with molecular weights of 200–300 reduce channel conductance approximately to the same extent as they reduce bulk solution conductivity. Their effect on the channel conductance is only weakly voltage dependent as shown in Fig. 1.

In contrast, we find that addition of the crown (molecular weight of 264) influences ion current through the α -hemolysin channel in a pronounced voltage-dependent manner (Fig. 1). As the applied voltage is changed from -200 mV to $+200$ mV, the effect of the crown on channel conductance varies >10 -fold. Importantly, this channel-imposed asymmetry is seen at otherwise symmetrical conditions when the crown is added on both sides of the membrane in equal concentrations. The effect on the conductance is not monotonic in the applied voltage: for 1 M KCl it has a maximum at potentials close to -120 mV.

From the current-voltage dependences and current fluctuations around the steady-state value (open channel noise) we learn about the kinetics of crown partitioning in the channel. The exchange of the crown between the channel pore and the bulk is so fast that the power spectrum of the crown-induced noise is “white”, that is, frequency independent, over the whole frequency range accessible in reconstitution experiments. Analyzing the low-frequency part of the spectrum together with the crown effect on the average conductance we are able to determine the lifetime of the crown in the channel. This time increases from hundreds of nanoseconds at positive (from the *cis*-side) voltages to several microseconds at ~ -100 mV where the crown effect on the channel conductance is maximal. Further increase in magnitude of the negative voltage decreases the lifetime to ~ 0.5 μ s at -200 mV. This suggests that the crown translocation through the channel is field dependent (Woodhull, 1973; Hille, 1992; Tikhonov and Magazanik, 1998).

The strong voltage dependence of the crown effects and its marked asymmetry indicate that it is the charged crown/ K^+ complex that is responsible for the blockage. We hypothesize that closing a linear polymer molecule into a circle affects its translocation because the complex of the cyclic molecule with a potassium ion sees an effective barrier in the channel. This barrier together with the applied voltage distribution along the channel axis is responsible for the observed asymmetric voltage dependence.

MATERIALS AND METHODS

Diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The wild type of *S. aureus* α -hemolysin was a generous gift of Dr. Hagan Bayley (Texas A&M University). Crown ether 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctane (18-crown-6) was purchased from Sigma-Aldrich (Allentown, PA). Other chemicals were of analytical grade.

Bilayer lipid membranes were formed at room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ using the lipid monolayer opposition technique from 10 mg/ml solutions of DPhPC in pentane on a $70\text{-}\mu\text{m}$ diameter aperture in the $15\text{-}\mu\text{m}$ -thick Teflon partition as previously described (e.g., Krasilnikov and Bezrukov, 2004 after Montal and Mueller, 1972). The total capacitance was $90\text{--}100$ pF, the film capacitance was close to 50 pF. The membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3 M KCl, 2% agarose bridges assembled within standard $200\text{-}\mu\text{l}$ pipette tips.

Experiments were done using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in the voltage clamp mode. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Butterworth filter (Model 9002, Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and recorded simultaneously by a video cassette recorder operated in a digital mode and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50 kHz. Amplitude and power spectrum noise analyses were performed using software developed in house.

Small amounts of α -hemolysin from a diluted stock solution of $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ were added to the *cis*-side of the chamber. The final concentration of the protein in the membrane-bathing solution was ~ 100 pM. Unless stated otherwise, the standard membrane-bathing solution used in the bilayer experiments contained 1 M KCl and 5 mM Tris with pH adjusted to 7.5 by citric acid. Potential is defined as positive when it is greater at the side of the protein addition.

EXPERIMENTAL RESULTS

Conductances of single α -hemolysin channels show certain dispersion from channel to channel (e.g., Krasilnikov et al., 1988; Krasilnikov and Bezrukov, 2004). For example, at 23°C in 1 M KCl solutions at -40 mV and neutral pH it is 960 ± 70 pS. Therefore, to measure the conductance changes with appropriate accuracy, the effect of the crown in each experiment was evaluated by comparing conductance of the same single channel in crown-free and crown-containing solutions.

Fig. 3 shows the current through a single channel before and after symmetric addition of the crown to 10-mM concentration in the membrane-bathing solutions on both sides of the membrane. There are two crown-induced effects: a decrease in the mean current and an increase in the current noise. Both effects strongly depend on the applied voltage. They are considerably larger for the negative sign of the applied voltage. In addition, the effects depend on the salt concentration.

Fig. 4 A demonstrates the voltage dependence of the channel conductance for several crown concentrations. The uppermost curve shows that even in the absence of the crown the channel is not Ohmic—its conductance depends on the applied voltage. To make the effect of crown addition seen more clearly, Fig. 4 B gives the ratio of the channel conductance in the presence of the crown to that in the crown-free solution. The crown-induced conductance reduction is nonmonotonic in the applied voltage. In 1 M KCl solutions the crown effect reaches its maximum around -120 mV.

The dependence of the crown-induced conductance reduction on KCl concentration is illustrated by the results shown in Fig. 5. The ratio of the channel conductance to its

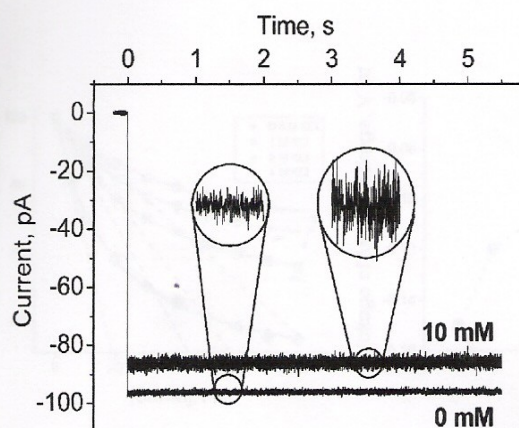


FIGURE 3 Ion currents through a single α -hemolysin channel as altered by the presence of 10 mM of the crown ether. The recordings were taken from the same single channel before and after crown addition to 1 M KCl buffer solution. At time zero potential was switched from 0 to -100 mV. Note that in the presence of the crown the mean current decreases while the current noise grows. Current recordings are filtered by averaging over 0.5-ms intervals. The insets show current recordings at a fourfold finer scale.

value in the absence of the crown at voltages corresponding to the maximum of the crown-induced effect in solutions of different KCl concentrations is shown in Fig. 5 A as a function of the crown concentration. It is seen that the crown effect on channel conductance is increased by increasing salt concentration. This result may indicate the strengthening of hydrophobic interaction between the crown and the channel—the phenomenon described earlier for poly(ethylene glycol)s (Bezrukov et al., 1996; Merzlyak et al., 1999).

Fig. 5 B shows how the optimal maximum effect depends on the salt concentration in 10-mM crown solutions. As the salt concentration increases, the maximum effect of the crown on the channel conductance is reached at smaller (in magnitude) negative voltages. Identical dependences on salt concentration were found at other crown concentrations.

The crown-induced reduction in the average ionic current through the channel is accompanied by generation of excess noise (Fig. 3). Fig. 6 gives the power spectral density of the current in the presence of 10 mM crown at -100 mV applied potential (top trace) versus the background measured at 0 mV

(bottom trace). Equilibrium noise of a single channel with the relatively high conductance (~ 1 nS in 1 M KCl) contributes significantly to the level of the background noise (Krasilnikov and Bezrukov, 2004). However, in the particular case of the bottom curve, most of the noise comes from the amplifier's feedback resistor. The rising part of the power spectrum is related to finite electrode and electrolyte resistance, amplifier noise, and membrane and film capacitance (Sigworth, 1995). The middle trace shows noise of the channel at -100 mV in the crown-free solution. It exceeds the equilibrium channel noise significantly due to modulation of the channel conductance by fluctuating charges of ionizable residues (Bezrukov and Kasianowicz, 1993; Kasianowicz and Bezrukov, 1995). The sharp decrease seen in all three spectra at frequencies $>10,000$ Hz is due to anti-aliasing signal filtering (Materials and Methods).

Fig. 6 shows that the spectrum of the crown-induced noise is "white" (frequency independent) up to frequencies of ~ 10 kHz. The absence of dispersion at these frequencies means that the process of crown exchange between the channel pore and the bulk is fast in the sense that the characteristic relaxation time is much smaller than the inverse of the highest frequency in the measurement range, $1/2\pi f_{\text{max}} \approx 20$ μ s. For this reason we build our analysis on the low-frequency spectral density, $S_I(0)$, studied as a function of the applied voltage at different crown concentrations.

Fig. 7 compares results of the noise and conductance measurements at small crown concentrations obtained in 1 M KCl (A and B) with those in 4 M KCl (C and D). The low-frequency spectral density, $S_I(0)$, was calculated as the average between frequencies $100 \text{ Hz} < f < 1000 \text{ Hz}$ with the background subtracted. It is seen that both the conductance reduction and the excess noise are much stronger at the higher salt concentration.

DISCUSSION

Noise analysis usually involves determination of the "corner frequency" that immediately relates the noise spectrum with the characteristic time of a system (Conti and Wanke, 1975; Neher and Stevens, 1977; DeFelice, 1981). In the case studied here this frequency is out of reach. Fig. 6 shows that

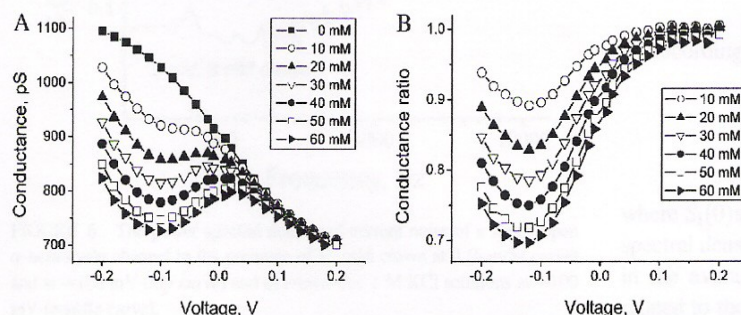


FIGURE 4 Effect of the crown on single-channel ionic conductance is strongly voltage dependent. (A) Channel conductance in 1 M KCl solutions at different crown concentrations (see the inset). (B) The same data replotted as a ratio of channel conductance in the presence of the crown to that in the crown-free solution. Application of negative voltages (negative from the *cis*-side; see Fig. 2 A) favors crown-induced conductance reduction. The effect of the crown saturates with the crown concentration—the increment of conductance reduction is smaller at the 50–60-mM concentration step than at the 0–10-mM step.

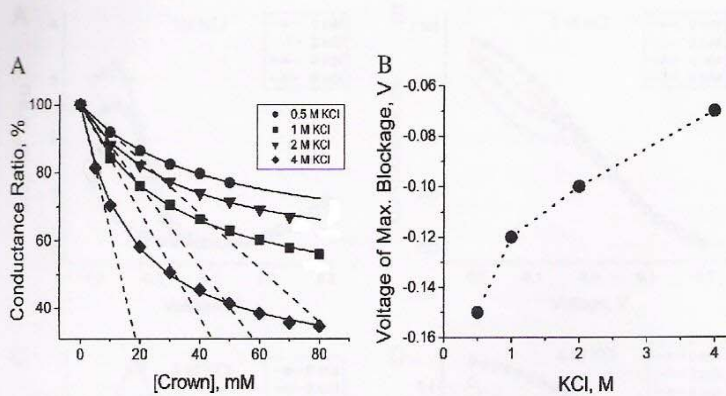


FIGURE 5 Crown effects on the channel conductance at different salt concentrations. (A) Ratios of the channel conductance in the presence of the crown (at the voltages corresponding to maximum effect; see Fig. 4) to the conductance in crown-free solutions at different salt concentrations (the data are shown by different symbols as explained in the inset). Dashed lines demonstrate the crown effect on the channel conductance as a linear extrapolation from small crown concentrations. Solid lines illustrate the fitting of the channel conductance data to the first-order binding isotherm. Data points represent averages over at least three experiments for the voltages corresponding to the maximum in the crown-induced effect. (B) The voltage where the maximum in the crown-induced effect on channel conductance is reached (see Fig. 4) in KCl solutions containing 10 mM of the crown as a function of the salt concentration.

within the range of accessible frequencies the spectrum is white. Using an alternative language, the experimental points contributing to the noise track in Fig. 3 are uncorrelated in time (except for the correlations introduced by the anti-aliasing filter). Analysis of such data sets presents a special challenge (e.g., Boguna et al., 2001).

In principle, the white part of the spectrum allows one to estimate mobility of a particle in a channel using a concept of “molecular Coulter counting” (Bezrukov et al., 1994; Rostovtseva and Bezrukov, 1998; Bezrukov, 2000). However, in practically important cases of inhomogeneous pores, as in this study (Fig. 2 A), this approach gives an order of magnitude estimate only. In contrast to ATP molecules in VDAC channel (Rostovtseva and Bezrukov, 1998), formal application of this approach to the results shown in Fig. 7 yields the voltage-dependent values for the crown mobility in the channel. As the applied voltage changes from -200 mV to $+200$ mV, the calculated effective diffusion co-

efficient varies ~ 10 -fold staying from two to one orders of magnitude smaller than its bulk value of $4.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Yuldasheva et al., 2003).

Two-state model

In this article the low-frequency part of the noise spectrum is used to determine kinetic parameters of the crown exchange between the channel and the bulk in the framework of a two-state model. This model was used previously to estimate the lifetime of PEG molecules in alamethicin channels (Bezrukov and Vodyanoy, 1993). The model assumes that the blockage effect on the channel conductance can be described as a two-state Markov process. We start with the Machlup's original formula for the power spectral density of such a process (Machlup, 1954). In our case it can be written in the form:

$$S_I(f) = 4(\Delta i)^2 \frac{\tau^2}{\tau_b + \tau_o} \frac{1}{1 + (2\pi f \tau)^2}, \quad (1)$$

where f is frequency, τ_b is the mean lifetime of the channel in the crown-blocked state, τ_o is the mean time between successive blockages, Δi is the change in the current induced by a single-molecule blockage event, and $\tau = \tau_b \tau_o / (\tau_b + \tau_o)$ is the relaxation time. Blockage probability in this model is given by

$$p = \frac{\tau_b}{\tau_b + \tau_o}. \quad (2)$$

According to Eqs. 1 and 2 time τ_b can be written as

$$\tau_b = \frac{1}{p(1-p)^2} \frac{S_I(0)}{4(\Delta i)^2}, \quad (3)$$

where $S_I(0)$ stands for the low-frequency limit of the power spectral density. In the framework of the model the decrease in the average ionic current through the channel, $\langle \Delta i \rangle$ is related to the blockage probability by $\langle \Delta i \rangle = p \Delta i$ so that

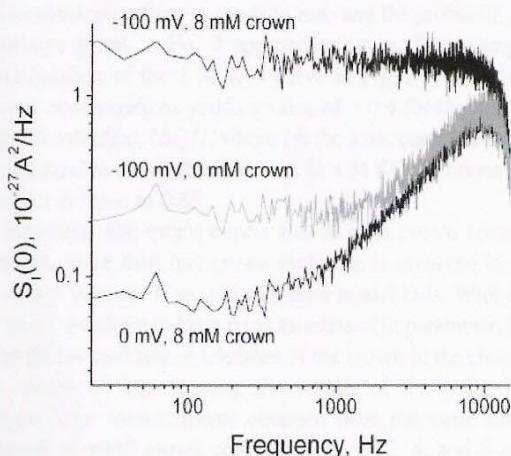


FIGURE 6 The power spectral density of current noise of a single open α -hemolysin channel in the presence of 10 mM crown at 0 (bottom curve) and at -100 mV (top curve) and in crown-free 1 M KCl solutions at -100 mV (middle curve).

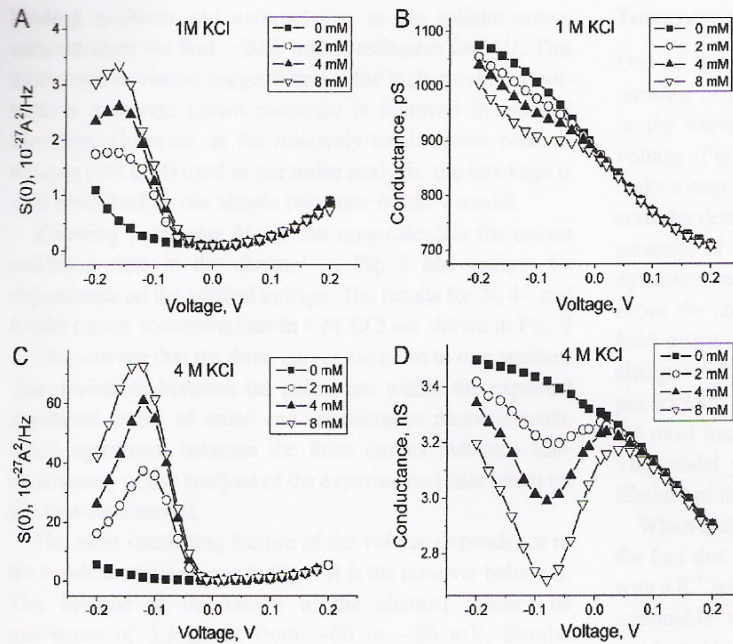


FIGURE 7 The low-frequency power spectral density of the voltage-dependent current noise (A) and the conductance of the channel (B) in 1 M KCl at different crown concentrations as functions of the applied voltage. The crown effects are much stronger in 4 M KCl (C and D).

$$p = \langle \Delta I \rangle / \Delta i. \quad (4)$$

Therefore, the mean lifetime of the crown-blocked state is given by

$$\tau_b = \frac{S_I(0)}{4\langle \Delta I \rangle \Delta i} \frac{1}{(1 - \langle \Delta I \rangle / \Delta i)^2}. \quad (5)$$

$S_I(0)$ and $\langle \Delta I \rangle$ are directly measured in experiment. The only uncertain parameter required to find τ_b is the amplitude of the current drop in an elementary blockage event, Δi . In principle, one can find this parameter by measuring the average current reduction, $\langle \Delta I \rangle$, in the limit of high crown concentrations, where τ_b tends to zero and the probability of blockage given in Eq. 2 approaches unity. For example, extrapolation of the 1 M KCl curve in Fig. 5 A to infinite crown concentrations yields a value of ~ 0.4 for the relative current reduction, $\langle \Delta I \rangle / I$, where I is the ionic current through the channel in crown-free solution. In 4 M KCl solutions this number is close to 0.65.

However, one might expect that at high crown concentrations, more than one crown molecule is involved in the blockage process. If so, our two-state model fails. With this in mind, we chose to keep Δi as an adjustable parameter. For 4 M KCl we calculated lifetimes of the crown in the channel by means of Eq. 5 using the results of the noise and conductance measurements obtained from the same single channel at small crown concentrations of 2, 4, and 8 mM (Fig. 7, C and D). The lifetimes for the data set at -80 mV calculated for different values of parameter $\Delta i / I$ are presented in Fig. 8. It is seen that they are indeed sensitive to the choice of this parameter. At the same time, within the

framework of the accepted model, the lifetime of the crown in the channel should be independent of the crown concentration. Guided by this criterion we find that the best choice for the value of the ratio $\Delta i / I$ is 0.55 (Fig. 8). This analysis was repeated at several negative voltages from the range of -200 mV $< V < -40$ mV. The ratio $\Delta i / I$ was found to be voltage independent within the accuracy of the measurements, $\Delta i / I = 0.55 \pm 0.07$.

Using this procedure the adjustable parameter Δi was also found for other salt concentrations. The results are: $\Delta i / I = 0.35$ at 1 M KCl and $\Delta i / I = 0.4$ at 2 M KCl. Together with 0.55 found for 4 M KCl, these values are in fair agreement with $\Delta i / I$ values determined from the conductance versus crown concentration data (Fig. 5 A), though they are systematically smaller. Fitting data in Fig. 5 A to a simple

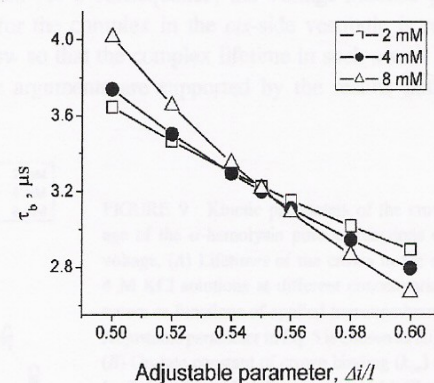


FIGURE 8 Crown lifetime from the 4 M KCl data at -80 mV for 2 mM, 4 mM, and 8 mM crown concentrations calculated according to Eq. 5 for different values of the adjustable parameter $\Delta i / I$.

binding isotherm and extrapolating to the infinite crown concentration we find $\sim 20\%$ higher estimates for $\Delta i/I$. This systematic deviation suggests that at the high crown concentrations a second crown molecule is involved in channel blockage. However, at the relatively small crown concentrations (≤ 8 mM) used in our noise analysis, the blockage is well described by our simple two-state Markov model.

Knowing parameter Δi we can now calculate the crown residence time in the channel by Eq. 5 and analyze its dependence on the applied voltage. The results for 2-, 4-, and 8-mM crown concentrations in 4 M KCl are shown in Fig. 9 A. One can see that the three curves are close to one another. The deviations between the points are within the expected combined errors of noise and conductance measurements. Good agreement between the three curves indicates self-consistency of our analysis of the experimental data based on the two-state model.

The most interesting feature of the voltage dependence of the residence time shown in Fig. 9 A is the turnover behavior. The lifetime of the crown in the channel reaches its maximum of $3.3 \mu\text{s}$ at from -60 to -80 mV. Similar behavior was found in 1 and 2 M KCl solutions (data not shown). It turns out that the maximum residence time decreases at lower salt concentrations. The voltages corresponding to the maxima shift to more negative values. The maximum residence time in 1 M KCl is about twofold smaller than this time in 4 M KCl solution.

Crown-induced noise and conductance reduction allow us to determine another important parameter: the average time between successive crown bindings, τ_o . From Eq. 2 it follows that

$$\tau_o = \frac{1-p}{p} \tau_b, \quad (6)$$

where the blockage probability p , given in Eq. 4, can be readily determined if the parameter Δi is known. The on-rate constant, k_{on} , can then be calculated as $1/(\tau_o c_{\text{crown}})$. Its dependence on voltage in 4 M KCl solutions is shown in Fig. 9 B. It is seen that the on-rate constant increases with the negative voltage magnitude. Thus, our analysis of the low-frequency, white part of the noise spectrum makes it possible to determine both kinetic parameters of the two-state model.

Turnover of the residence time

One of the most interesting results of our analysis is the turnover behavior of the average residence time of the crown in the channel, considered as a function of the applied voltage (Fig. 9 A). To rationalize this behavior we have to make a step beyond the scope of our two-state model and to consider detailed dynamics of the crown in the channel in the presence of the external voltage. Realistic analysis of such dynamics requires not only the fine structural information about the channel pore but also the knowledge of electric field distribution in the channel, including fields from the charges on the pore-forming protein molecules. Instead, we put forward a one-dimensional diffusion model that grasps the most important qualitative features of the phenomenon. The model predicts the turnover behavior of the average lifetime of the crown in the channel.

When evaluating the average lifetime we take into account the fact that the crown forms a positively charged complex with a K^+ ion. Based on the channel geometry (Fig. 2 A) it is reasonable to assume that the complex reduces channel conductance mainly when it is located in the narrow part of the pore. The time spent by the complex in this part is very sensitive to the sign of the applied voltage. Negative voltages drag the complex into the channel from the *trans*-side. To traverse the channel, the complex has to pass through the constriction zone that forms an almost impermeable barrier for the complex at moderate voltages. To escape from the same side from which the complex entered, it has to diffuse against the driving force produced by the applied voltage. Thus, the complex is effectively trapped at the constriction zone. However, at high enough voltages complexes pass through the constriction zone and translocate. The turnover of the average lifetime is determined by the competition between the two scenarios.

The situation is quite different at positive voltages. Because the *cis*-side vestibule of the pore is wide, the complex-induced conductance reduction is small. In addition, the voltage mainly drops in the narrow part of the channel. As a consequence, the voltage-induced potential well for the complex in the *cis*-side vestibule is relatively shallow so that the complex lifetime in such a well is short. These arguments are supported by the results obtained at

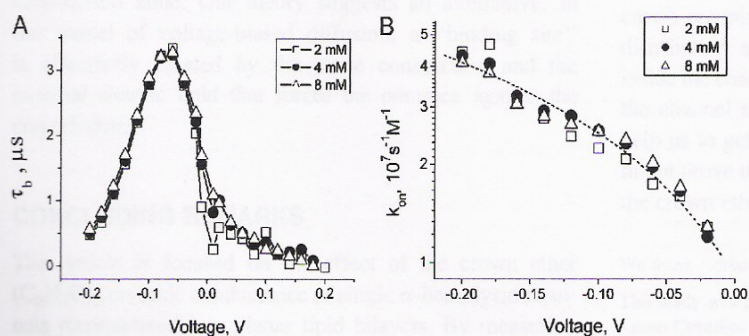


FIGURE 9 Kinetic parameters of the crown blockage of the α -hemolysin pore as functions of applied voltage. (A) Lifetimes of the crown in the channel in 4 M KCl solutions at different concentrations of the crown as functions of applied transmembrane voltage. Adjustable parameter in Eq. 5 is chosen as $\Delta i/I = 0.55$. (B) On-rate constant of crown binding (k_{on}) calculated for 2, 4, and 8 mM of the crown in 4 M KCl membrane-bathing solution. The dashed curve is a first-order regression for the data.

asymmetrical crown addition (data not shown). At negative voltages, within the accuracy of our measurements, the effect of crown addition only to the *trans*-side of the membrane was the same as for symmetrical addition. At positive voltages the effect of the *cis*-side addition was measurable but small. At +200 mV, 50 mM of the crown in 1 M KCl solutions decreased channel conductance by $\sim 5\%$.

We have developed a theory that describes the dynamics of the complex in the narrow part of the channel in the framework of a one-dimensional diffusion model. For impermeable barriers our theory predicts only monotonic decrease of the complex lifetime in the channel with voltage, whereas for permeable barriers, the theory predicts a turnover behavior. In the case of impermeable barriers and high negative voltages, $|V| \gg kT/e$, where e is the charge of the complex and k and T are the Boltzmann constant and the absolute temperature, the average lifetime is given by

$$\tau_D \cong \frac{l^2 \exp(-eV/kT)}{D (eV/kT)^2}. \quad (7)$$

Here l is the distance between the channel opening and the constriction zone and V is the voltage drop at this distance. Substituting $l = 5$ nm (half the channel length; Fig. 2 A), $D = 4.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Yuldasheva et al., 2003), and $V \approx -100$ mV we arrive at $\tau_D \approx 2 \times 10^{-7}$ s, which is only an order of magnitude smaller than the experimental value at this voltage that is close to the critical one. In this estimate we have used the bulk value of the complex diffusion coefficient. However, in reality, a particle whose size is comparable to the pore aperture can be greatly slowed down by interactions with the pore walls. If we account for this "restricted diffusion" (Bean, 1972; Bezrukov, 2000) by using a smaller value of the diffusion coefficient, the estimation in Eq. 7 gets close to the experimental value. Increase of the residence time with the salt concentration may be due to the increasing interaction of the crown with the pore-lining residues of the protein, analogously to the salt-dependent PEG-protein interactions (Timasheff, 1993).

In several recent studies with the α -hemolysin channel (Sanchez-Quesada et al., 2000; Cheley et al., 2002; Gu et al., 2003) it has been suggested that different molecules, both neutral and charged, can bind in the channel pore near the constriction zone. Our theory suggests an alternative. In our model of voltage-biased diffusion, a "binding site" is effectively created by the steric constriction and the external electric field that forces the complex against the constriction.

CONCLUDING REMARKS

This article is focused on the effect of the crown ether $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_6$ on ionic conductance of single α -hemolysin channels reconstituted into planar lipid bilayers. By measuring

the reduction of the channel conductance and the power spectral density of current fluctuations induced by the crown, we analyze how the effect depends on the applied voltage and the crown and salt concentrations. We find that the blockage efficiency of the crown exhibits a strong dependence on both the sign and magnitude of the applied voltage and increases at higher salt concentrations.

To rationalize our experimental results we assume that the channel has two conductance states: open state and partially blocked state in which the current through the channel is reduced because of the presence of the crown. We additionally assume that transitions between the two states are Markovian. With these assumptions we have determined all parameters of the model from the experimental data and analyzed their dependence on the voltage. One of the most interesting results of our analysis is the dependence of the average crown residence time in the channel on the applied voltage, which is nonmonotonic and has a maximum around 100 mV.

We suggest that this behavior can be explained by a model that treats the complex dynamics in the pore in terms of one-dimensional voltage-biased diffusion. The turnover of the residence time is a consequence of a competition between two tendencies: voltage-induced trapping of the crown in the constriction zone and voltage-dependent passage of the crown through this. Indeed, the crown forms a complex with positive ions. Negative voltages drive the complex from the *trans*-side into the narrow part of the channel pore. The complex reaches the constriction zone (Fig. 2 A) where it gets stuck because this part of the pore is almost impermeable for it. Being at the constriction zone, the complex partially blocks the channel. At not-too-high negative voltages the complex does not pass through the constriction and mostly escapes from the channel moving against the electric field. This is why its lifetime in the channel increases when the negative voltage grows in magnitude. However, high-enough voltages drive the complex through the constriction zone and the complex lifetime in the channel starts to decrease with the voltage magnitude. The diffusion model of voltage-dependent blockage will be discussed in detail elsewhere.

Crown ethers appear to be a promising tool for investigating channel-facilitated membrane transport. At the same time, many aspects of the crown dynamics in the channel remain unclear. The list includes interaction of the crown complex with the pore-forming protein, electric field distribution along the channel, hydration of the complex inside the channel, and the effect of the hydration variation at the channel entrance. Further studies of these aspects will help us to get better understanding of the phenomenon and might prove useful for explaining pharmacological effects of the crown ether superfamily at the molecular level.

We thank Adrian Parsegian and Daniel Harries for fruitful discussions.

This study was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil).

REFERENCES

- Bayley, H. 1995. Pore-forming proteins with built-in triggers and switches. *Bioorg. Chem.* 23:340–354.
- Bayley, H., and C. R. Martin. 2000. Resistive-pulse sensing: from microbes to molecules. *Chem. Rev.* 100:2575–2594.
- Bean, C. P. 1972. The physics of porous membranes—neutral pores. In *Membranes*. G. Eisenman, editor. Marcel Dekker, New York, NY. 1–54.
- Bezrukov, S. M. 2000. Ion channels as molecular Coulter counters to probe metabolite transport. *J. Membr. Biol.* 174:1–13.
- Bezrukov, S. M., and J. J. Kasianowicz. 1993. Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. *Phys. Rev. Lett.* 70:2352–2355.
- Bezrukov, S. M., and I. Vodyanoy. 1993. Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states. *Biophys. J.* 64:16–25.
- Bezrukov, S. M., I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, and J. J. Kasianowicz. 1996. Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. *Macromolecules.* 29:8517–8522.
- Bezrukov, S. M., I. Vodyanoy, and V. A. Parsegian. 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature.* 370:279–281.
- Boguna, M., L. Kullman, S. M. Bezrukov, A. M. Berezhkovskii, and G. H. Weiss. 2001. Rate constants from uncorrelated single-molecule data. *J. Phys. Chem.* 105:6246–6250.
- Borrel, M. N., M. Fiallo, I. Veress, and A. Garnier-Suillerot. 1995. The effect of crown ethers, tetraalkylammonium salts, and polyoxyethylene amphiphiles on pirarubicin incorporation in K526 resistant cells. *Biochem. Pharmacol.* 50:2069–2076.
- Braha, O., B. Walker, S. Cheley, J. J. Kasianowicz, L. Song, J. E. Gouaux, and H. Bayley. 1997. Designed protein pores as components for biosensors. *Chem. Biol.* 4:497–505.
- Brown, G. R., and A. J. Foubister. 1983. Anticoccidial activity of crown polyethers. *J. Med. Chem.* 26:590–592.
- Cheley, S., L. Q. Gu, and H. Bayley. 2002. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. *Chem. Biol.* 9:829–838.
- Conti, F., and E. Wanke. 1975. Channel noise in nerve membranes and lipid bilayers. *Quart. Rev. Biophys.* 8:451–506.
- DeFelice, L. J. 1981. *Introduction to Membrane Noise*. Plenum Press, New York, NY.
- Gouaux, J. E., O. Braha, M. R. Hobaugh, L. Song, S. Cheley, C. Shustak, and H. Bayley. 1994. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12828–12831.
- Gu, L. Q., O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley. 1999. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature.* 398:686–690.
- Gu, L. Q., S. Cheley, and H. Bayley. 2003. Electroosmotic enhancement of the binding of a neutral molecule to a transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:15498–15503.
- Gu, L. Q., M. Dalla Serra, J. B. Vincent, G. Vigh, S. Cheley, O. Braha, and H. Bayley. 2000. Reversal of charge selectivity in transmembrane protein pores by using noncovalent molecular adapters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3959–3964.
- Gurbanov, K. G., A. A. Paperno, N. G. Luk'yanenko, and S. S. Basok. 1993. Anti-ischemic properties of crown ether derivatives. *Eksp. Klin. Farmakol.* 56:18–21 [in Russian].
- Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, UK.
- Howorka, S., S. Cheley, and H. Bayley. 2001. Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nature Biotechnol.* 19:636–639.
- Kasianowicz, J. J., and S. M. Bezrukov. 1995. Protonation dynamics of the α -toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophys. J.* 69:94–105.
- Kasianowicz, J. J., E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13770–13773.
- Kolbeck, R. C., C. La Neave, A. Aquirre, T. M. Nosek, and K. H. Pannell. 1992. Inotropic influence of macrocyclic polyethers on tracheal smooth muscle. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42:645–650.
- Krasilnikov, O. V. 2002. Sizing channels with polymers. In *Structure and Dynamics of Confined Polymers*. J. J. Kasianowicz, M. S. Z. Kellermayer, and D. W. Deamer, editors. Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 97–115.
- Krasilnikov, O. V., and S. M. Bezrukov. 2004. Polymer partitioning from non-ideal solutions into protein voids. *Macromolecules.* 37:2650–2657.
- Krasilnikov, O. V., P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva, C. G. Rodrigues, S. Bhakdi, and A. Valeva. 2000. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol. Microbiol.* 37:1372–1378.
- Krasilnikov, O. V., R. Z. Sabirov, V. I. Ternovsky, P. G. Merzliak, and J. N. Muratkhodjaev. 1992. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiol. Immunol.* 5:93–100.
- Krasilnikov, O. V., R. Z. Sabirov, V. I. Ternovsky, P. G. Merzliak, and B. A. Tashmukhamedov. 1988. The structure of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced ionic channel. *Gen. Physiol. Biophys.* 7:467–473.
- Krasilnikov, O. V., V. I. Ternovsky, Yu. M. Musaev, and B. A. Tashmukhamedov. 1980. Influence of staphylo toxin on conductance of bilayer phospholipid membranes. *Dokl. Akad. Nauk UzSSR.* N7:66–68 [in Russian].
- Krasilnikov, O. V., V. I. Ternovsky, and B. A. Tashmukhamedov. 1981. Properties of conductivity channels induced in phospholipid bilayer membranes by alpha-staphylo toxin. *Biophys. J.* 26:271–276 [in Russian].
- Machlup, S. 1954. Noise in semiconductors: spectrum of a two-parameter random signal. *J. Appl. Phys.* 25:341–343.
- Meller, A. 2003. Dynamics of polynucleotide transport through nanometre-scale pore. *J. Phys. Condens. Matter.* 15:R581–R607.
- Merzlyak, P. G., L. N. Yuldasheva, C. G. Rodrigues, C. M. M. Carneiro, O. V. Krasilnikov, and S. M. Bezrukov. 1999. Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the alpha-toxin transmembrane channel. *Biophys. J.* 77:3023–3033.
- Montal, M., and P. Mueller. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:3561–3566.
- Nakane, J. J., M. Akeson, and A. Marziali. 2003. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *J. Phys. Condens. Matter.* 15:R1365–R1393.
- Neher, E., and C. F. Stevens. 1977. Conductance fluctuations and ionic pores in membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6:345–381.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593–656.
- Ozutsumi, K., and S. I. Ishiguro. 1992. A precise calorimetric study of 18-crown-6 complexes with sodium, potassium, rubidium, cesium, and ammonium ions in aqueous solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65:1173–1175.
- Pedersen, C. J. 1968. Ionic complexes of macrocyclic polyethers. *Fed. Proc.* 27:1305–1309.
- Pedersen, C. J. 1988. The discovery of crown ethers. *Science.* 241:536–540.
- Pressman, B. C. 1976. Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.* 45:501–530.
- Rostovtseva, T. K., and S. M. Bezrukov. 1998. ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys. J.* 74:2365–2373.
- Sanchez-Quesada, J., M. R. Ghadiri, H. Bayley, and O. Braha. 2000. Cyclic peptides as molecular adapters for a pore-forming protein. *J. Am. Chem. Soc.* 122:11757–11766.

- Sigworth, F. J. 1995. Electronic design of the patch clamp. *In* Single-Channel Recording, 2nd Ed. B. Sakmann, and E. Neher, editors. Plenum Press, New York, NY. 95–127.
- Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. 1996. Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 274:1859–1866.
- Steed, J. W., and J. L. Atwood. 2000. *Supramolecular Chemistry: An Introduction*. John Wiley, New York, NY.
- Stojilkovic, K. S., A. M. Berezhkovskii, V. Yu. Zitserman, and S. M. Bezrukov. 2003. Conductivity and microviscosity of electrolyte solutions containing polyethylene glycols. *J. Chem. Phys.* 119:6973–6978.
- Tikhonov, D. B., and L. G. Magazanik. 1998. Voltage dependence of open channel blockage: onset and offset rates. *J. Membr. Biol.* 161:1–8.
- Timasheff, S. N. 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:67–97.
- Woodhull, A. M. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61:687–708.
- Yuldasheva, L. N., F. Hallwass, S. M. da Cruz Gonçalves, A. M. Simas, and O. V. Krasilnikov. 2003. Anion influence on complex formation between 18-crown-6 and sodium ion in aqueous solutions. *J. Mol. Liq.* 106:31–41.

CAPÍTULO 2

Partitioning of single poly-(ethylene glycol) molecules into a protein nanopore in the limit of strong attraction.

Autoria: Krasilnikov OV, Bezrukov SM, AM, Rodrigues CG.

Este manuscrito em colaboração com o grupo do Doutor Sergey M Berzrukov do Laboratory of Physical and Structural Biology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 USA, encontra-se em fase de conclusão e será submetido brevemente ao Physical Review Letters.

Impact fator: 7.218

Partitioning of single poly-(ethylene glycol) molecules into a protein nanopore in the limit of strong attraction

Oleg V. Krasilnikov¹, Claudio G. Rodrigues¹, and Sergey M. Bezrukov²

¹*Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;*

²*Laboratory of Physical and Structural Biology, NICHD, NIH, Bethesda, MD, USA*

ABSTRACT

High salt concentrations dramatically increase attractive interactions between the alpha-Hemolysin channel and poly-(ethylene glycol) (PEG) and, thereby, change polymer partitioning qualitatively, enhancing it by orders of magnitude. At 4 M KCl the capture of a single PEG molecule by the channel can be observed as a well-defined step in the small-ion current through the channel. As expected, the amplitude of these steps and their duration increase monotonically with PEG molecular weight. However, the on-rate of polymer capture is a surprisingly weak function of polymer molecular weight.

Keywords: ionic conductance; fluctuations; diffusion-limited reactions.

INTRODUCTION

The progress in physics of polymer partitioning into the confines of nanopores is crucial for many areas of fundamental science and technology. Recent experimental [1-3] and theoretical [4-7] work suggests that not only quantitative but qualitative picture of polymer interactions with a nanoscopic pore needs a thorough refinement. Another important aspect concerns the mechanisms of ion conduction in nano-structures [8,9]. Effects of water ordering by the surface, electrostatic and hydrodynamic interactions of ions with the channel walls, ion-ion interactions at the nanoscale, etc., are among the questions of interest.

In the present study we examine the time-resolved blockages of ion current through the alpha-Hemolysin channel that are induced by single poly-(ethylene glycol) (PEG) molecules. We use the extreme of potassium chloride concentration of 4 M to take advantage of the polymer/pore attraction promoted by salt [10]. These strong interactions change polymer partitioning qualitatively. They slow down the polymer exchange between the channel and the bulk to a degree that makes polymer capturing and release by the channel time-resolvable. They also dominate the forces of entropic repulsion. For PEG 600 to PEG 3000, the free energy component which is due to polymer confinement by the pore is nearly completely suppressed by the attraction thus increasing polymer partition coefficient by orders of magnitude (Figure 1) and making the on-rate of polymer capture by the pore only a weak function of polymer molecular weight.

The blockage of small-ion current through the channel by a single polymer molecule is incomplete. Larger molecules reduce its ionic conductance more efficiently. They also stay in the channel longer, allowing us to estimate the attractive interaction as 0.13 kT per monomer.

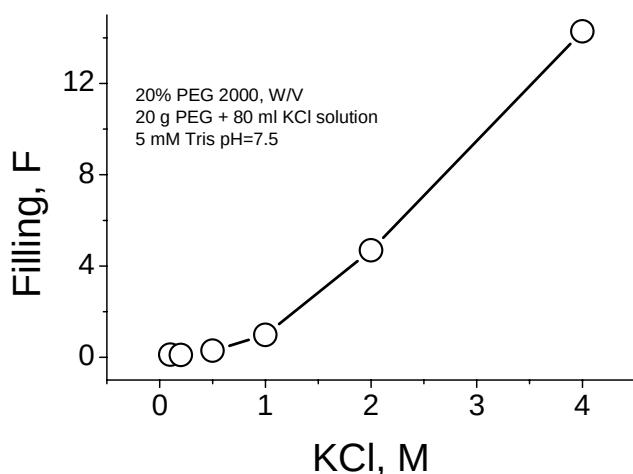


Figure 1. The partitioning of PEG 2000 molecules into the alpha-Hemolysin channel with the KCl concentration. Conditions: 20% (w/v) PEG 2000 both sides; 20 g PEG + 80 ml KCl solution; 5 mM Tris pH=7.5; 40 mV - trans; ST - cis.

RESULTS AND DISCUSSION

We quantify polymer partitioning by measuring ion current through a single nanopore of the alpha-Hemolysin channel in the presence of dilute solutions of PEG of different molecular weights. Upon entering the channel a polymer molecule partially blocks its ionic conductance. Three parameters of this process are analyzed as functions of polymer molecular weight: the average rate of the blockage events, their average duration, and their average amplitude.

Examples of the records of ion currents through single alpha-Hemolysin channels in the presence of PEG of different molecular weights in the membrane-bathing solution are shown in Figure 2. It is seen that partitioning of polymer molecules induces stepwise current fluctuations whose amplitude and duration depend on the polymer molecular weight.

Only one polymer molecule is involved in the blockage. Figure 3 demonstrates that the blockage rate (the average number of the stepwise fluctuations per second) is strictly proportional to PEG concentration, thus suggesting that the blockage is a first order reaction.

The blockage of ion current is never complete, but the degree of blockage grows with the size of a polymer molecule. Figure 4 summarizes the results of statistical analysis of the blockage amplitudes. PEG 600 reduces current by about 45%, PEG 3000 by 95%. The solid line compares the effect on channel conductance with the prediction for PEG-induced decrease of the bulk solution conductivity [11]:

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} \cong (1 - \phi) \exp\left(-2.7 \frac{\phi}{1 - \phi}\right) \quad (1)$$

where σ/σ_0 is the ratio of bulk solution conductivity in the presence and absence of PEG and ϕ is polymer volume fraction.

To perform this comparison we assume that the polymer volume fraction in Eq. (1) is proportional to PEG molecular weight. Specifically, we calculate the polymer volume fraction approximately as the weight of a single PEG molecule divided by the adjustable parameter, the weight of 7.5 nm^3 of water (see ref. [11] for a more accurate procedure). This volume is very close to the volume of the stem part of the channel – the part which contributes most to the total channel resistance. It is seen that the solid line fits the data reasonably well (Figure 4).

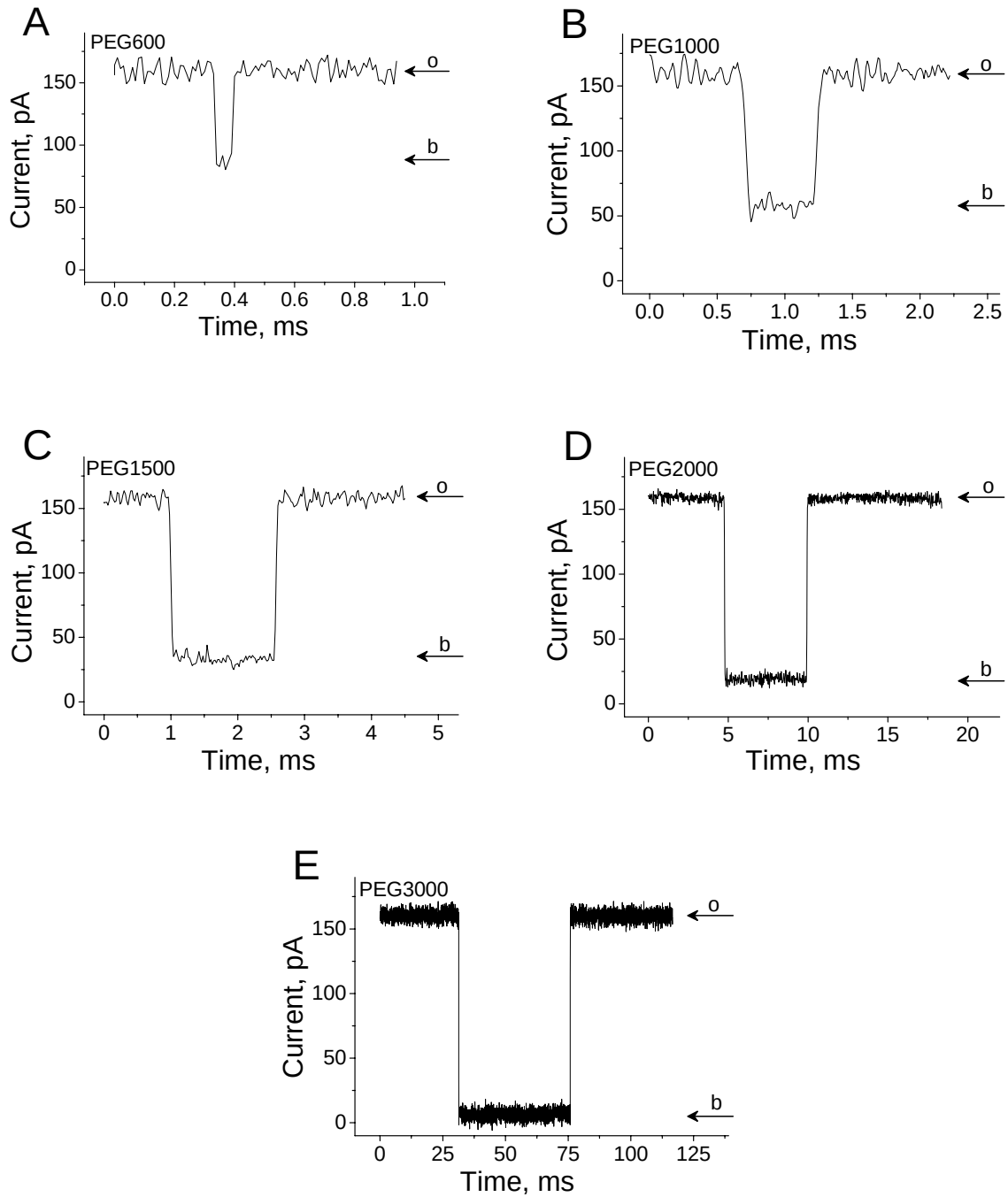


Figure 2. In the presence of PEG ionic current through the alpha-Hemolysin channel exhibits step-wise transitions between completely open and partially blocked states. Both the duration and amplitude of blockage increase with the polymer molecular weight. Conditions for these and other experiments of the present study (if not specified otherwise): bilayer lipid membranes were formed by the monolayer opposition technique from diphytanoyl phosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) at room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ as previously described [3]; membrane-bathing aqueous solution contained 4 M KCl at pH 7.5 buffered by 5 mM Tris with $40 \mu\text{M}$ of PEG (polyethylene glycol standard, Fluka, GmbH, Germany) added from the trans-side of the membrane; alpha-Hemolysin was added from the cis-side of the membrane, the final concentration of the protein in the membrane-bathing solution was about 100 pM; applied voltage was 40 mV, negative from the side of protein addition. Averaging = 0.02 ms. High conductance (o) and particularly blocked (b) states are shown with arrows.

Larger polymers stay in the pore longer. Figure 5 shows the dependence of polymer residence time τ_{off} as a function of polymer molecular weight W . The dependence is quite sharp and for larger PEG is close to exponential. Using a simple reasoning that involves escape from a potential well whose depth $\Delta F(N)$ is proportional to the number of monomers N we can write

$$\tau_{off} \propto \exp\left(\frac{\Delta F(N)}{kT}\right), \quad \Delta F(N) = \chi N \quad (2)$$

Defining the number of monomers within a PEG molecule as $W/44$, from the linear part of the curve we infer the energy of attraction per monomer as $\chi \approx 0.13 kT$.

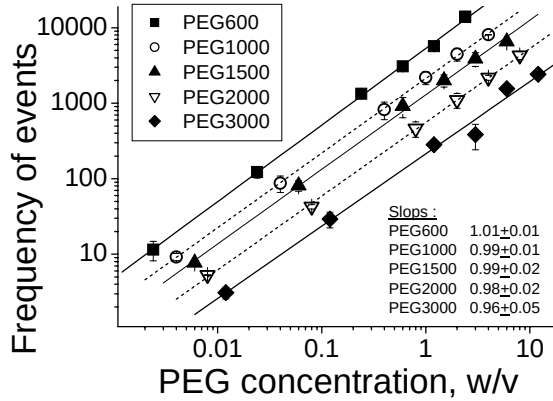


Figure 3. The on-rate of ion current blockage by polymers is proportional to their concentration. For a larger polymer (PEG 3000) the same on-rate is achieved at larger weight/volume concentration than for any of smaller one. However, the slope of the curves is the same in all cases. The proportionality between the on-rate and polymer concentration means that only one polymer molecule is responsible for the blockage.

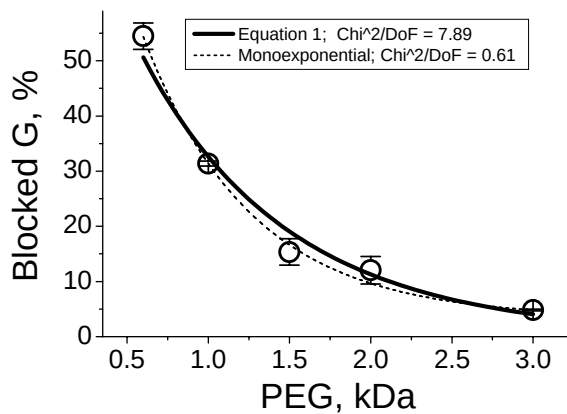


Figure 4. The relative conductance of the channel in the PEG-blocked state (symbols) shows that the blocking efficiency increases with the polymer molecular weight. The larger is the polymer, the smaller is the remaining conductance. The solid line is a fit by Eq. (1) to the data. The volume fraction ϕ is set to be proportional to the polymer molecular weight with an adjustable parameter described in the text. Data are mean of 3-4 experiments. Other conditions are equal to Figure 1. Data were fitted with an equation 1 (solid line) and with a monoexponential function (dashed line).

The proportionality between the average rate of blockage events ν and polymer concentration $[C]$ demonstrated in Figure 3 allows us to quantify the on-rate constant of polymer capture by the channel, $\kappa_{on}(W)$, as a function of polymer molecular weight using $\nu = \kappa_{on}(W)[C]$. Figure 6 presents these data for 40 μM polymer concentration. Surprisingly, the dependence on polymer molecular weight is weak. The moderate drop in the on-rate can be attributed almost completely to the decrease in the diffusion coefficient $D(W)$ calculated as

$$k_{on}(W) \propto D(W) \propto W^{-\frac{3}{5}} \quad (3)$$

(solid line in Figure 5). Thus, the entropic part of interaction which is a leading interaction term at small salt concentrations [1, 10, 12, 13] and which allows pore sizing by polymer partitioning [14] is practically negligible at this high salt concentration. Importantly, experiments reported in the present study were performed using dilute polymer solutions where non-ideality effects [3, 7] are virtually non-existent. The largest weight/volume concentration was used for 4 mM PEG 3000. It was 1.2% which is well below the c^* concentration for this PEG, which is about 13% [3].

This anomalous behavior most probably is a consequence of the strong polymer/pore attraction induced by high salt concentrations that compensates for the free energy of polymer confinement. This argument is in qualitative agreement with the energy of 0.13 kT per monomer, deduced from Figure 5 data. From the partitioning measured at small salt concentrations [e.g., 1, 10, 12] where the attraction is weak, the free energy of confinement for e.g. PEG 2000 is of the order of one kT ($\sim 0.02 kT/\text{monomer}$). Therefore, the energy of interaction between several monomers (of 45 monomers comprising PEG 2000) and the pore is enough to offset the entropy loss. Indeed, the actual mechanism of polymer capture by the pore is necessarily much more complicated [4]; however, our simple estimate shows the importance of the attraction between the pore and the polymer.

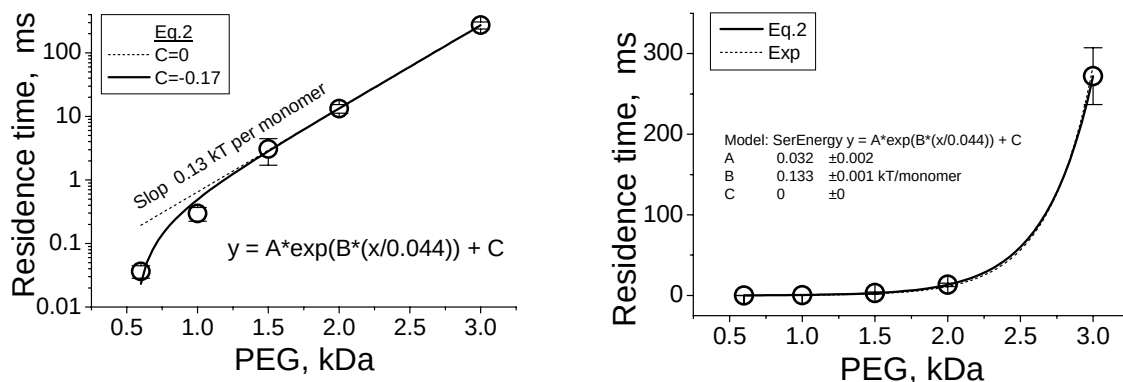


Figure 5. The dwell time of a captured polymer sharply increases with the polymer molecular weight. The data for the larger PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000 and PEG 3000 allows us to estimate the free energy of attraction per monomer (see text).

Two versions: in semiLog and linear scales.

$$\chi^2/\text{DoF} = 0.05651$$

$$A = 0.03166 \quad 0.00158$$

$$B = 0.13286 \quad 0.00072$$

$$C = 0 \quad 0$$

$$\chi^2/\text{DoF} = 0.05132$$

$$A = 0.033 \quad 0.002$$

$$B = 0.132 \quad 0.001$$

$$C = -0.179 \quad 0.157$$

B is the energy (kT) for monomer

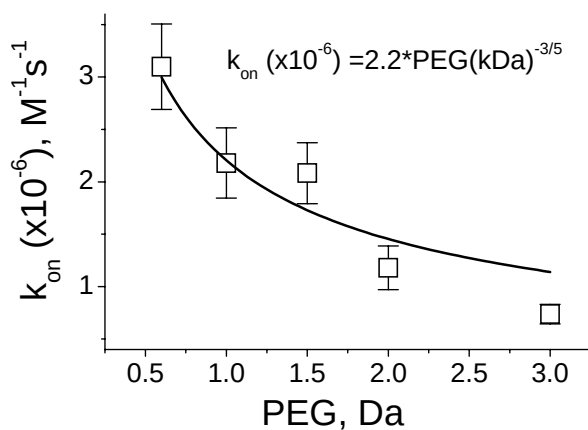


Figure 6. The on-rate of polymer capture by the channel is a surprisingly weak function of the polymer molecular weight. The solid line is drawn according to Eq. (3) with an adjustable multiplier to fit the data for the smallest PEG. It shows the on-rate decrease expected from the size-dependent decrease in the diffusion coefficient of the polymer in the bulk.

The solid line is drawn according to Eq. (3) with an adjustable multiplier to fit the data for the smallest PEG.

CONCLUSIONS

Partitioning of water-soluble polymers into ion channel pores has long been used for sizing of ion channel pores [14, 15]. In the case of alpha-Hemolysin, it was shown that there are attractive interactions between PEG and the channel, which grow with the salt concentration in the membrane-bathing solution. Under otherwise identical experimental conditions, PEG partition coefficient was found to be higher in 1 M KCl than in 0.1 M KCl solutions [10]. In the present study we went to the extreme, 4 M potassium chloride concentration, which is very close to the limit of this salt solubility at the room temperature of 23^o C. This high salt concentration changed polymer partitioning qualitatively and allowed us to observe time-resolved events of single PEG molecule exchange between the channels and the bulk. The main findings are:

(i) Comparison of blockage amplitudes with the bulk effect (Figure 4) suggests that both the conductance of the channel with a trapped PEG molecule and the conductivity of PEG-containing bulk solutions scale similarly with the polymer monomeric concentration. Based on the results obtained we conclude that the nanoscopic volume of water in the alpha-Hemolysin pore behaves quite macroscopically in what concerns conduction of ions. Reduction of the aqueous phase conductivity by PEG seems to have identical mechanisms both in the channel and in the bulk.

(ii) The sharp increase of polymer residence time in the pore with PEG molecular weight (Figure 5) supports the idea of strong salt-induced interaction. For the free energy of polymer/pore attraction it gives an estimate of 0.13 *kT* per monomer.

(iii) The anomalously weak dependence of the capture on-rate on polymer molecular weight (Figure 6) suggests that entropic repulsion is suppressed by the strong polymer/pore attraction.

Thus, partitioning of PEG molecules into the alpha-Hemolysin channel in the limit of strong attraction studied here is qualitatively different from this polymer partitioning at small salt concentrations [10, 12-15] including the recent single-molecule study [1] where the entropic term was found to lead in polymer/pore interaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Adrian Parsegian and Sasha Berezhkovskii for fruitful discussions and reading the manuscript. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil) and the Intramural Research Program of the NIH, National Institute of Child Health and Human Development.

REFERENCES

1. L. Movileanu, S. Cheley, and H. Bayley. *Biophys. J.* **85**, 897 (2003).
2. A. Meller. *J. Phys. Condens. Matter.* **15**, R581 (2003).
3. O. V. Krasilnikov and S. M. Bezrukov. *Macromolecules* **37**, 2650 (2004).
4. M. Muthukumar. *J. Chem. Phys.* **118**, 5174 (2003).
5. A. M. Berezhkovskii and I. V. Gopich. *Biophys. J.* **84**, 787 (2003).
6. I. Teraoka and Y. Wang. *Polymer* **45**, 3835 (2004).
7. V. Yu. Zitserman, A. M. Berezhkovskii, V. A. Parsegian, and S. M. Bezrukov. *J. Chem. Phys.* **123**, 146101 (2005).
8. B. Roux. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 153 (2005).
9. A. Aksimentiev and K. Schulten, *Biophys. J.* **88**, 3745 (2005).
10. P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva, C. G. Rodrigues, C. M. M. Carneiro, O. V. Krasilnikov, and S. M. Bezrukov. *Biophys. J.* **77**, 3032 (1999).
11. K. S. Stojilkovic, A. M. Berezhkovskii, V. Yu. Zitserman, and S. M. Bezrukov. *J. Chem. Phys.* **119**, 6973 (2003).
12. S. M. Bezrukov, I. Vodyanoy, R. A. Brutyan, and J. J. Kasianowicz. *Macromolecules* **29**, 8517 (1996).
13. T. K. Rostovtseva, E. M. Nestorovich, and S. M. Bezrukov. *Biophys. J.* **82**, 160 (2002).
14. O. V. Krasilnikov, R. Z. Sabirov, V. I. Ternovsky, P. G. Merzlyak, and J. N. Muratkhodjaev. *FEMS Microbiol. Immun.* **105**, 93 (1992).
15. S. M. Bezrukov and I. Vodyanoy. *Biophys. J.*, **64**:16 (1993).

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados dos trabalhos desenvolvidos nesta tese permitem concluir:

1- A força de interação entre o nanoporo formado pela α -toxina incorporado numa bicamada lipídica plana, e polímeros do etilenoglicol nas formas circular (éter de coroa) e linear (polietilenoglicóis), aumenta com a concentração de cloreto de potássio presente na solução aquosa banhante da membrana;

2- A repulsão entrópica é o principal responsável pelo particionamento do éter de coroa $(C_2H_4O)_6$ e polietilenoglicóis de massa molecular (<400 Da) no lume aquoso do nanoporo, quando a membrana é banhada por solução aquosa de KCl menor que 1 M; sendo superada por interações atrativas, em concentrações de KCl, maiores;

3- A presença de éter de coroa e polietilenoglicóis de massa molecular <400 Da, reduzem a condutância iônica do nanoporo, enquanto aumentam o ruído de corrente;

4- O tempo de ocupação máximo ($\sim 3 \mu s$) do nanoporo pelo éter de coroa $(C_2H_4O)_6$, e a redução máxima de condutância iônica acontecem no potencial transmembrana de 100 mV, enquanto que, para polietilenoglicóis de massa molecular (<400 Da) estes parâmetros, praticamente não dependem do campo elétrico transmembrana;

5- A força de interação entre o nanoporo e polietilenoglicóis de massa molecular (600, 1000, 1500, 2000 e 3000 Da) é maior que àquela observada para o éter de coroa $(C_2H_4O)_6$ e polietilenoglicóis de menor massa molecular, manifestando-se, não só por aumento do ruído de corrente iônica, mas, principalmente por bloqueios de amplitudes e tempos característicos e dependentes da massa molecular do polímero, denominados “assinaturas moleculares”;

6- A redução média da condutância iônica do nanoporo da α -toxina induzida por uma única molécula de PEG aumenta monotonicamente com a massa molecular (600-3000 Da), e é proporcional a mudança de condutividade da solução banhante da membrana,

indicando que água no interior do poro e na solução externa são semelhantes, portanto, o PEG atua da mesma forma nos dois compartimentos.

7- A interação entre o nanoporo e polietilenoglicóis depende fortemente da massa molecular do polímero, de tal maneira que em 4 M KCl, o tempo de ocupação do poro aumentou em mais do que 6000 vezes de ~ 0.04 ms á ~ 270 ms, enquanto a massa molecular do PEG aumentou somente em 5 vezes de 600 á 3000 Da;

8- A energia de interação entre o nanoporo e os polietilenoglicóis de massa molecular (≥ 1000 Da) é da ordem de ~ 0.13 kT por monômero do polímero, na presença de 4 M de KCl;

9- O nanoporo formado pela alfa-toxina incorporado em bicamada lipídica plana funciona como elemento sensor, detectando estocasticamente polietilenoglicóis de massa molecular maior que 600 Da em meios aquosos;

10- A capacidade de detecção estocástica do nanoporo formado pela alfa-toxina incorporado em bicamada lipídica plana é favorecida em elevadas concentrações salinas de KCl na solução banhante da membrana, uma vez que, a interação nanoporo-polímero é intensificada nestas condições.

8. PERSPECTIVAS

- Descobrir condições que favoreçam a estabilidade mecânica e físico-química do sistema nanoporo-membrana;
- Criar bancos de dados de assinaturas moleculares;
- Desenvolver programas capazes de automatizar a análise de assinaturas digitais de corrente;
- Miniaturizar a montagem experimental permitindo sua portabilidade.

9. ANEXOS

Comunicações em congressos a partir desta tese:

- KRASILNIKOV, Oleg Vladimirovich; MERZLYAK, Petr G; YULDASHEVA, Liliya N; **RODRIGUES, Cláudio Gabriel**; BEZRUKOV, Sergey M. INTERACTION OF 18CROWN6 WITH AQUEOUS PORE OF STAPHYLOCOCCAL ALPHA-HEMOLYSIN. In: 48TH ANNUAL MEETING BIOPHYSICAL SOCIETY, 2004, Baltimore, USA. Biophysical Journal. 2004. v. 86, p. 338a-338a.

- KRASILNIKOV, Oleg Vladimirovich; BEZRUKOV, Sergey M; MERZLYAK, Petr G; YULDASHEVA, Liliya N; **RODRIGUES, Cláudio Gabriel**. CURRENT FLUCTUATION ANALYSIS OF AN ORGANIC MOLECULE TRANSPORT THROUGH A SINGLE NANOSCOPIC PORE. In: V CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE BIOFISICA, 2003, Rio de Janeiro. Anais do V congresso Ibero-Americano de Biofísica. Rio de Janeiro: 2003. p. 162-162.