

Corso: Canali ionici - Dottorato scienza dei materiali - primavera 2003

Docente: Michael Pusch

0. Introduzione

Le lezioni sulla teoria si basano abbastanza sul libro di Hille (2001) e consiglio a tutti quelli che hanno intenzione di lavorare nel campo dei canali di studiare questo libro profondamente, soprattutto le parti generali teorici.

Ci sono degli esercizi da fare e da consegnare ca. una settimana dopo la lezione. Vengono corretti e per i dottorandi di scienze dei materiali è obbligatorio avere almeno il 50% degli esercizi giusti per essere ammessi all'esame. Consiglio anche agli altri di consegnarmi gli esercizi. Devono essere fatte (pensate!) individualmente anche se si può lavorare in gruppo per discuterli.

1. Proprietà dei canali ionici in generale

- sono proteine integrali delle membrane plasmatiche o di organuli intracellulari
- sono in genere più o meno specifici per una specie di ioni (p.e. per il Na^+ o per il Cl^- o per cationi, ...)
- si aprono/chiudono in risposta a vari stimoli
- sono passivi, cioè la direzione del flusso netto degli ioni è secondo il gradiente elettrochimico
- dipendono dal potenziale in due modi: il potenziale determina la corrente di un singolo canale aperto e può inoltre influenzare la probabilità di apertura (p_{open})

Allora per capire bene i canali ionici è necessario una base solida dei secondi fenomeni che sono importanti per il funzionamento dei canali:

- elettricità
- diffusione
- elettrochimica (basi)
- termodinamica (basi)
- descrizione del gating - il rilassamento (modelli Markoviani; modello di Hodgkin-Huxley)

Si può sempre approfondire il livello ma ci fermiamo qui.

2. Elettricità

Il fenomeno di base per l'elettricità è l'osservazione di cariche positive e negative.

Simbolo: carica $\rightarrow Q$; unità: 1 C = 1 Coulomb

La carica di un protone, è

$e \sim 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$.

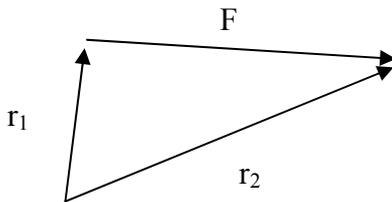
La carica di una mole di protoni è

$$e \cdot N_A \sim 96000 \text{ C} = F \text{ (costante di Faraday)}$$

Tra due cariche elettriche q_1 e q_2 (puntiforme) a distanza r c'è la forza (di Coulomb) (nel vuoto)

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (1)$$

dove ϵ_0 , per adesso, è una costante che si determina sperimentalmente ($\epsilon_0 = 8.8542 \cdot 10^{-12} \text{ CV}^{-1}\text{m}^{-1}$).
 F è un vettore e la sua direzione è quella di $(r_1 - r_2)$ se r_i descrive la posizione di q_i ($i=1,2$).



Si definisce il campo elettrico, E , come

$$E = F / q$$

cioè la forza che agisce su una piccolissima carica, q , diviso q . Il fatto che q è piccola implica che la sua presenza non altera il campo stesso. Visto che la forza è proporzionale alla carica, la definizione di E non dipende dalla carica q . L'unità di misura di E è

$$\text{N/C} = \text{Newton} / \text{Coulomb}$$

Per esempio il campo E di una carica puntiforme, Q , è radiale e della forma

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Q}{r^2}$$

Se misuriamo il campo E in un materiale che è elettricamente polarizzabile, cioè che ha delle cariche che si possono spostare un pochino o dei "dipoli" che si possono osservare, osserviamo che il campo che deriva da una carica fissa, sempre Q , è minore rispetto al campo misurato nel vuoto perché viene "schermato":

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{Q}{r^2}$$

ϵ_r , la permeabilità relativa, descrive la grandezza della schermatura. Esempi:

$$\text{H}_2\text{O} : \epsilon_r \sim 80$$

$$\text{aria} : \epsilon_r \sim 1 \text{ (= vuoto)}$$

lipidi (membrana!): $\epsilon_r \sim 1-2$

proteine (?): $\epsilon_r \sim 2-20$

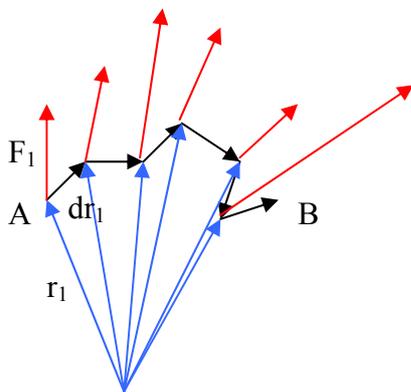
2.1. Il potenziale elettrico:

Il potenziale ("l'energia potenziale") viene dalla meccanica classica:

In un sistema meccanico il lavoro, W , che occorre per andare dal punto A al punto B è definito come

$$W = \int_A^B F(r) dr$$

dove sia F , che r , che dr , (e anche A e B) sono vettori.



($A=r_1$)

$$W = F_1 dr_1 + F_2 dr_2 + \dots$$

$F_1 dr_1$ è il prodotto vettoriale che è p.e. = 0 se i due vettori sono ortogonali.

Un importantissima legge della meccanica classica dice: Se il sistema non ha frizione esiste un POTENZIALE, U , cioè una funzione scalare (e quindi non un vettore) che dipende da r e che mi dà il risultato della integrazione complicata in modo molto semplice:

$$W = \int_A^B F(r) dr = U(B) - U(A)$$

Si chiama anche "energia di potenziale".

Per esempio per la forza gravitazionale tra una sfera di massa M (p.e. la terra) e una di massa m (luna) il potenziale è

$$U(r) \sim M*m/|r| \tag{U1}$$

Al contrario si può sempre calcolare (in modo semplice!) la forza come derivata spaziale del potenziale:

$$F = dU/dr = (\partial U/\partial x, \partial U/\partial y, \partial U/\partial z) \tag{U2}$$

se $r=(x,y,z)$ in coordinate cartesiane. La derivata (U->F) è un'operazione "semplice" mentre l'integrazione (F->U) è complicata.

Torniamo all'elettricità:

In modo analogo il potenziale elettrico (riferito ad un punto A) è definito come:

$$V_A(r) = \int_A^r E(r) dr$$

L'unità di misura è $1V = 1 J/C$, cioè se si trasferisce una carica di 1 C lungo un percorso che ha come differenza di potenziale tra inizio e fine 1 V si guadagna (o perde) l'energia di 1 J.

Quindi: IL POTENZIALE (o meglio la differenza di potenziale) è L'ENERGIA RIFERITA AD UNA CARICA:

$$V = W/q$$

dove q (come per la definizione di E) non deve alterare il campo stesso.

Si può anche dire:

$$W=V*q.$$

Esercizio 1: Enel fa pagare 10 cent per 1kWh (supponiamo!). Questo mese ho pagato 22€ di bolletta Enel (e supponiamo che non c'è nessuna tassa fissa ...). Quanti Coulomb sono passati dal mio cavo principale di casa? (supponiamo (che è sbagliato ma lo stesso per questo esercizio) che Enel fornisce un potenziale "DC" cioè non alternato di valore 220 V).

La corrente è più semplice da capire: in un filo di ferro (metallo) oppure anche attraverso un canale definiamo la corrente al istante t come la quantità di carica che passa in un certo tempo:

$$I = dQ/dt$$

cioè I è la derivata temporale di Q. L'unità è $1A = 1 C/s$.

Esercizio 2: Una corrente di 1 pA corrisponde allo spostamento di quanti protoni al secondo? E a quanti protoni al ms? Al μs ? Al ns?

E' sempre molto utile usare la corrispondenza "meccanica":

potenziale elettrico = pressione del acqua

corrente elettrica = quanti litri d'acqua passano al secondo (flusso)

La legge di Ohm descrive la dipendenza della corrente in funzione del potenziale:

$$I = V/R = G*V$$

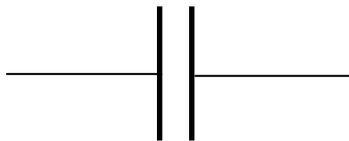
dove R è la resistenza e $G=1/R$ la conduttanza. La legge di Ohm descrive la proprietà di un materiale o di un sistema. Non si può derivare da una teoria generale come l'elettrodinamica e non è per niente triviale. Vale solo per alcuni sistemi, p.e. la corrente attraverso fili di metalli. Ma è comunque spessissimo una buona approssimazione.

2.2. La capacità elettrica

Se creo una differenza di potenziale, V, tra due oggetti materiali sposterò delle cariche parzialmente o completamente mobili di questi oggetti. Per potenziali non troppo grandi la carica spostata, Q, è proporzionale a V, e la costante di proporzionalità si chiama capacità, C:

$$Q = C*V \quad (C1)$$

L'unità è $1 \text{ F} = 1 \text{ C/V}$. Se ho, p.e. pochissime cariche la capacità è piccola. La capacità dice da una parte di quanta carica c'è bisogno per ottenere un certo potenziale e poi, una volta raggiunto, lo "stabilizza" anche perché "tampona" le variazioni del potenziale. L'esempio classico è il condensatore con due piastre metalliche:



La sua capacità è data da

$$C = \epsilon_0 * A/d$$

dove ϵ_0 è la costante di permittività nel vuoto, A è l'area delle piastre e d è la loro separazione.

Se tra le due piastre si trova un materiale con un certo ϵ_r la capacità aumenta e diventa

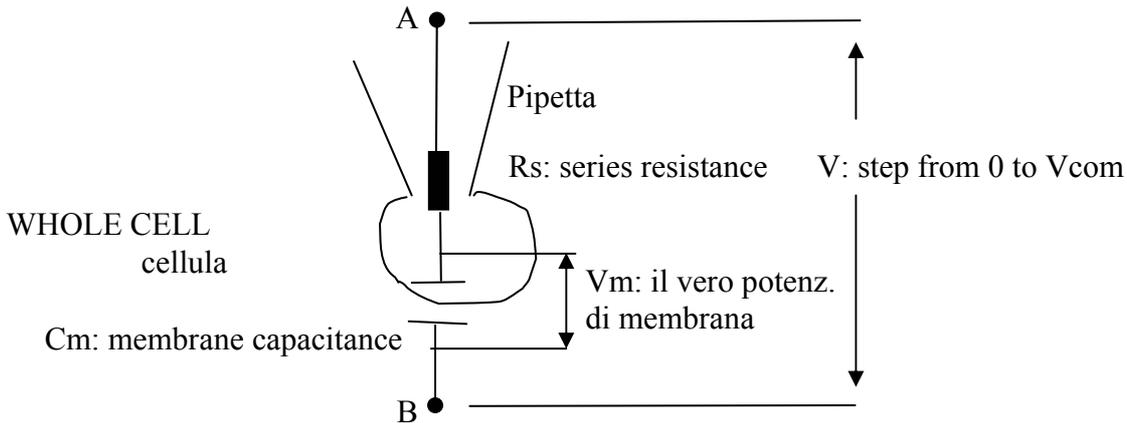
$$C = \epsilon_0 * \epsilon_r * A/d \quad (C2)$$

Per noi la capacità è un concetto importante perché le membrane biologiche si comportano come condensatori.

Le piastre metalliche corrispondono alla soluzione esterna e quella interna (conduttive come un metallo!), mentre sono separate dalla membrana che è abbastanza impermeabile.

Esercizio 3: Data la "capacità specifica" di membrane biologiche di $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ e un $\epsilon_r \sim 2$ per la membrana: quanto è spessa la membrana? (Usa C2!).

Il caricamento della membrana, il circuito "RC":



Sarebbe ideale poter cambiare il potenziale V_m da 0 a V_{com} ("command") in un tempo molto breve (siamo in voltage-clamp!), ma dobbiamo caricare la capacità della membrana attraverso la resistenza in serie R_s . Se applichiamo uno step da 0 a V_{com} tra i punti A e B il potenziale di membrana varia come:

$$V_m(t) = V_{com}(1 - e^{-t/\tau}) \quad (C2)$$

Esercizio 4: a) Deriva Eq. (C2) dalle seguenti considerazioni: (i) $V_r + V_m = V_{com} = \text{costante}$, dove V_r è il potenziale attraverso la resistenza R_s . (ii) Vale la legge di Ohm: $I = V_r/R_s$. (iii) Dalla definizione della capacità segue: $I = dQ/dt = C * dV_m/dt$. (iv) $V_m(t=0) = 0$. Questi quattro dati definiscono un'equazione differenziale molto semplice per V_m . Bisogna sapere che la soluzione dell'equazione differenziale $dy/dt = k y$ (dove k è una costante) e $y(0) = y_0$ è: $y(t) = y_0 * \exp(kt)$.
b) Deriva un'equazione simile per la corrente $I(t)$.

Il valore della costante di tempo, τ , è

$\tau = RC$, cioè il caricamento diventa più lento se C è grande e se R è grande. Per questo il whole-cell è più accurato se le cellule sono piccole e se le pipette sono grandi.

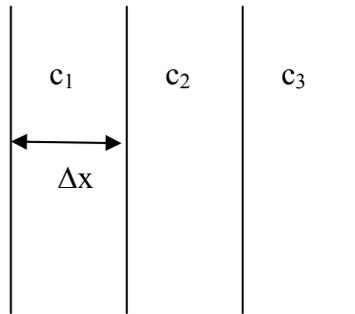
Esercizio 5: Se $R_s = 10 \text{ M}\Omega$ e $C = 20 \text{ pF}$ quant'è τ ?

Basta per un momento l'elettricità.

3. La diffusione e il potenziale elettrichimico

Ioni e tutte le altre molecole in soluzione non sono ferme ma si muovono, subiscono collisioni uno col altro ecc. Questo porta alla diffusione e la diffusione è il processo fondamentale per attraversare i canali. Macroscopicamente, cioè ignorando l'esistenza delle molecole, si definisce il coefficiente della diffusione, D in analogia alla diffusione del calore:

Flusso = $D \cdot \text{gradiente della concentrazione} \cdot \text{area}$



Sia Q_i la quantità di molecole nel compartimento i , A l'area della superficie, dx lo spessore, quindi $V=A \cdot dx$ il volume, e $c_i=Q_i/V$

L'equazione del bilancio per la quantità nello scompartimento 2 per il tempo $t+dt$, conoscendo tutti in valori per il tempo t :

$$Q_2(t+dt) = Q_2(t) - D \cdot ((c_2(t)-c_1(t))/dx) \cdot A \cdot dt - D \cdot ((c_2(t)-c_3(t))/dx) \cdot A \cdot dt$$

↓
↓
↓

valore iniziale flusso attraverso la parete sinistra e quella destra

Quindi

$$c_2(t+dt) \cdot A \cdot dx = c_2(t) \cdot A \cdot dx - A \cdot D \cdot (2 \cdot c_2(t) - c_1(t) - c_3(t)) \cdot dt$$

L'area se ne va:

$$(c_2(t+dt) - c_2(t)) / dt = D \cdot (2 \cdot c_2(t) - c_1(t) - c_3(t)) / dx^2$$

Un *Esercizio* ci potrebbe dimostrare che $(2 \cdot c_2 - c_1 - c_3)/dx = dc_2/dx$, la derivata spaziale (a tempo fisso) e quindi:

$$\partial c / \partial t = D \partial^2 c / \partial x^2$$

Questo vale per la diffusione in una dimensione. In generale l'equazione è

$$\partial c / \partial t = D \Delta c,$$

dove $\Delta c = \partial^2 c / \partial x^2 + \partial^2 c / \partial y^2 + \partial^2 c / \partial z^2$

Δ viene chiamato l'operatore Laplace.

Le unità di D sono m^2/s .

Einstein ha trovato che per una molecola vale

$$\overline{r^2} = 6Dt \quad (D1)$$

dove $\overline{r^2} = \langle r^2 \rangle$ è la mean-squared displacement e t è il tempo. Questo vuol dire che se prendiamo tante molecole (una per volta) che sono al inizio (tempo 0) al punto 0 e misuriamo al tempo t la posizione r (vettoriale in 3 dimensioni!) e facciamo la media di r^2 troviamo il risultato dell' Eq. (D1) (più o meno visto che è una cosa statistica).

Esercizio 6: Se facciamo la media non di r^2 ma di r qual è il risultato?

Esercizio 7: Se $D=2 * 10^{-5} \text{ cm}^2/s$ (ca. il valore di un ione potassio) quanto tempo ci vuole per avere un $(\langle r^2 \rangle)^{1/2}$ di 4 nm (spessore della membrana)? di 1 μm (grandezza di un batterio)? 10 μm (cellula piccola)? 50 μm (cellula grande)? 500 μm (diametro di uno dei nostri tubi di perfusione)? 3 cm (lunghezza della colonna "acqua" in una pipetta da patch)?

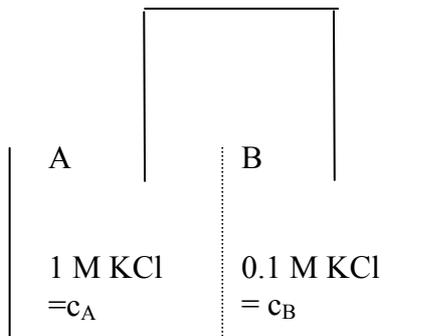
3.1. Il potenziale di Nernst

Il potenziale elettrochimico di un ione è dato da

$$\mu = \mu_0 + RT \ln(c) + zFV$$

dove μ_0 è il potenziale ad una condizione standard (p.e. 25 gradi, 1 bar), c è la concentrazione, z la valenza, F la costante di Faraday e V il potenziale elettrico.

Supponiamo di avere 2 compartimenti con concentrazioni di KCl diversi. Se i due compartimenti sono in contatto attraverso una membrana che è SOLO permeabile per K^+ ma non per il cloro, le concentrazioni non si possono equilibrare perché il cloro non passa. Ma per il K^+ il potenziale elettrochimico a sinistra e a destra deve essere uguale perché sono in contatto e in equilibrio:



$$\mu_0 + RT \ln(c_A) + zFV_A = \mu_0 + RT \ln(c_B) + zFV_B$$

=>

$$V = V_B - V_A = RT/(zF) \ln(c_A/c_B) \quad (\text{Nernst})$$

Esercizio 8: Quant'è V per l'esempio fatto sopra? (per temperatura di 20 °C)? Qual è il valore di $RT/(zF)$ (per $z = 1$ e per temperatura di 20 °C)? Se invece $c_A = 100 \text{ mM}$, $c_B = 1 \text{ mM}$? Oppure $c_A = 1.8 \text{ mM}$, $c_B = 50 \text{ nM}$ e $z = 2$ (calcio!)? Come cambia V se mettiamo una membrana semipermeabile per il cloro?

L'equazione di Nernst si può anche derivare dall'equazione di Boltzmann (vedi Hille).

TABLE 1.3 Free Ion Concentrations and Equilibrium Potentials for Mammalian Skeletal Muscle

Ion	Extracellular concentration (mM)	Intracellular concentration (mM)	$\frac{[Ion]_o}{[Ion]_i}$	Equilibrium potential ^a (mV)
Na ⁺	145	12	12	+67
K ⁺	4	155	0.026	-98
Ca ²⁺	1.5	100 nM	15,000	+129
Cl ⁻	123	4.2 ^b	29 ^b	-90 ^b

^a Calculated from Equation 1.11 at 37°C.

^b Calculated assuming a -90-mV resting potential for the muscle membrane and that Cl⁻ ions are at equilibrium at rest.

3.2 Il potenziale di membrana

3.2.1 The chord-conductance equation

Consideriamo solo conduttanze ioniche e non altri trasportatori/pompe elettrogenici e neanche il potenziale di Donnan. Se ci fosse un'unica conduttanza attiva che è selettiva per un ione A, il potenziale di membrane sarebbe il potenziale di Nernst di questo ione:

$V_m = V_A$. Se ci sono delle conduttanze anche per ioni B, C, ... e se supponiamo una IV lineare per ogni tipo di ione:

$$I_A = G_A * (V_m - V_A), I_B = G_B * (V_m - V_B), \dots$$

e supponiamo uno stato di zero-current (cioè non voltage-clamp ma una cellula libera) la somma di tutte le correnti deve essere uguale a 0:

$$G_A * (V_m - V_A) + G_B * (V_m - V_B) + \dots = 0.$$

Risolviamo questa equazione per V_m troviamo

$$V_m = (G_A V_A + G_B V_B + \dots) / (G_A + G_B + \dots) \quad (\text{Chord})$$

cioè una media dei V_i pesata con i G_i .

Se predomina uno dei G_i il valore di V_m è vicino al suo V_i .

C'è un flusso continuo di ioni se almeno due G_i sono notevoli.

Esercizio 9: Supponiamo $[K]_{int} = 130 \text{ mM}$, $[K]_{ext} = 5 \text{ mM}$, $[Na]_{int} = 10 \text{ mM}$; $[Na]_{ext} = 140 \text{ mM}$, $[Cl]_{int} = 30 \text{ mM}$, $[Cl]_{ext} = 130 \text{ mM}$. Calcola V_m per i seguenti casi:

(i) $G_K = 1$, $G_{Na} = G_{Cl} = 0$

(ii) $G_K = 10$, $G_{Na} = G_{Cl} = 2$

(iii) $G_K = 10$, $G_{Na} = 1$, $G_{Cl} = 10$

3.2.2 The GHK (Goldman-Hodgkin-Katz) equation

L'equazione (chord) suppone un'IV lineare che non è molto realistico. Un altro approccio è di supporre

- (i) indipendenza dei flussi
- (ii) un campo elettrico costante attraverso la membrana ("constant field")

Un po' di notazione:

La permeabilità di una specie di molecola è definita tramite

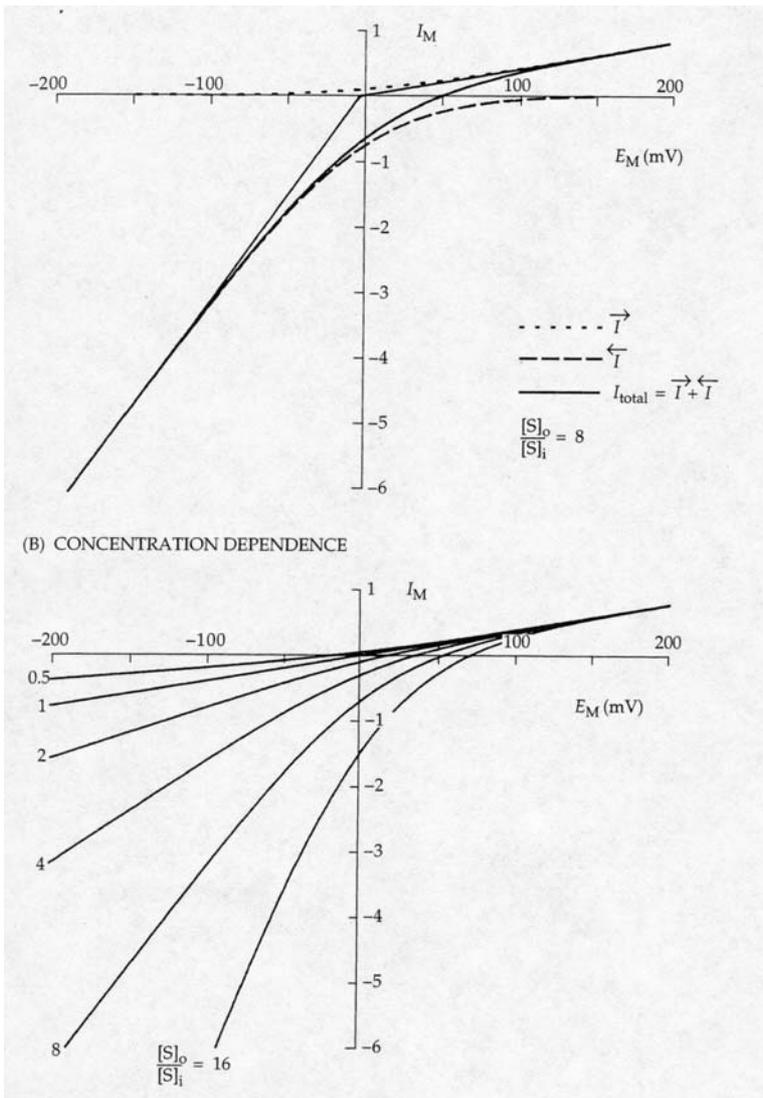
$$M = -P \Delta c$$

dove M è il flusso (netto) e Δc è la differenza di concentrazione. Con questo segue dalle due assunzioni la "GHK-current equation".

$$I_S = P_S z_S^2 \frac{VF^2}{RT} \frac{[S]_{int} - [S]_{ext} \exp(-z_S FV / (RT))}{1 - \exp(-z_S FV / (RT))} \quad (\text{GHK-current})$$

Questa equazione è molto importante. Non usa il concetto di pori o canali e descrive pertanto una situazione macroscopica. Bisogna tenere in mente anche le altre due assunzioni fondamentali: indipendenza dei vari flussi ionici e campo elettrico costante nella membrana. Comunque descrive abbastanza bene le IV di molti canali.

Una proprietà tipica della (GHK-current) è la cosiddetta Goldman-rectification: Se $[S]_{int}=[S]_{ext}$, la (GHK-current) è lineare, mentre se soluzioni sono asimmetriche c'è meno flusso oltre il potenziale di reversal.



Esercizio 10: a) Verifica che la (GHK-current) ha il potenziale di Nernst come reversal. b) Come cambia la forma della (GHK-current) se si cambia la valenza del ione da più a meno?

Per ioni monovalenti, p.e. K^+ , Na^+ , Cl^- segue la (GHK-voltage):

$$V_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{ext} + P_{Na}[Na]_{ext} + P_{Cl}[Cl]_{int}}{P_K[K]_{int} + P_{Na}[Na]_{int} + P_{Cl}[Cl]_{ext}} \quad (\text{GHK-voltage})$$

Nota la diversa "comparsa" delle concentrazioni intra e extracellulari di cationi e anioni!
Dalla (GHK-voltage) si possono determinare solo rapporti di permeabilità e mai valori assoluti.

Esercizio 11: Supponi: $[K]_{ext} = 5 \text{ mM}$, $[Cl]_{ext} = 100 \text{ mM}$, $[K]_{int} = 100 \text{ mM}$, $[Cl]_{int} = 30 \text{ mM}$ e supponi di misurare un V_{rev} di -40 mV (sodio non c'è). Quant'è P_K/P_{Cl} ?

La GHK-voltage è molto usata per determinare i "permeability ratios".

TABLE 14.5 Permeability Ratios for Nonselective Cation Channels^a

Ion or molecule	P_X/P_{Na}				P_X/P_K
	nAChR ¹	GluR6 ²	NMDAR ³	CNG channel ⁴	I_h ⁵
Li ⁺	0.87	—	0.74	1.16	0.02
Na ⁺	1.00	[1.00]	1.00	1.00	0.33
K ⁺	1.11	—	1.05	1.05	1.00
Cs ⁺	1.42	1.30	1.18	0.78	—
Tl ⁺	2.51	—	—	—	>1.55
Ca ²⁺	0.2	0.27	4.9	87	—
NH ₄ ⁺	1.79	—	1.43	2.80	0.17
Guanidinium	1.59	—	—	1.12	—
Methylammonium	1.34	1.2	0.57	0.60	0.06
Ethylammonium	1.13	—	—	0.16	<0.01
Dimethylammonium	0.87	0.78	0.24	0.14	<0.02
Trimethylammonium	0.36	—	0.09	<0.003	—
Tris	0.18	0.13	<0.01	—	—
Choline	0.13	—	<0.02	<0.019	—
Urea	0.13	—	—	—	—
Triethylammonium	0.09	—	<0.02	<0.003	—
Arginine	<0.014	—	<0.01	—	—
Tetrakisethanolammonium	<0.010	—	—	—	—

¹Ions, frog neuromuscular junction, Dwyer et al. (1980); Adams, Dwyer and Hille (1980). Urea, from isotope fluxes in cultured chick muscle, Huang et al. (1978).

²Rat GluR6 in Q form, Burnashev et al. (1995, 1996). P_X/P_{Na} values are measured P_X/P_{Cs} values multiplied by 1.30.

³Cloned and expressed rodent receptors: metals, Tsuzuki et al. (1994); calcium, Burnashev et al. (1995); organic ions, Villarroel et al. (1995). Many P_X/P_{Na} values are measured P_X/P_{Cs} values multiplied by 1.18.

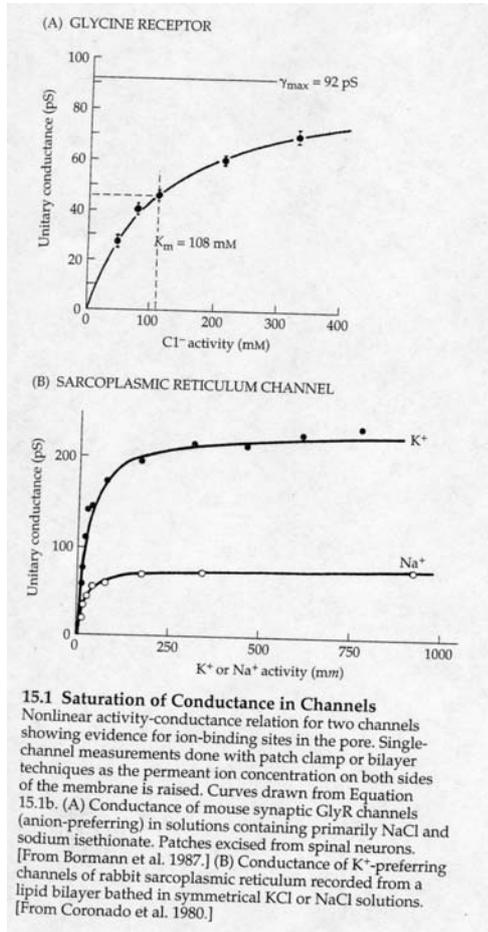
⁴Metal ions, catfish cones, Haynes (1995a,b). Other ions, salamander rods, Picco and Menini (1993).

⁵Salamander cone photoreceptors, Wollmuth and Hille (1992).

^aPermeability ratios calculated from reversal potentials.

3.3 Saturazione e blocco

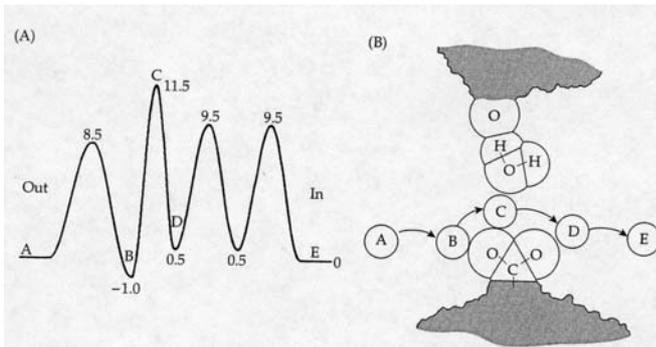
La GHK-current prevede che la corrente, e quindi anche la conduttanza, aumenta in modo lineare in funzione della concentrazione. Invece si osserva spesso una saturazione:



Spesso si descrive supponendo un sito saturabile per lo ione permeante:

$$\gamma = \gamma_{max} / (1 + K/[S])$$

con una costante di tipo Michaelis Menten. Modelli più complicati con più siti di legame diventano subito abbastanza complicati perché richiedono molti parametri (vedi Hille p. 478 ff). Una proprietà che sembra essere valida per molti canali e che ha un fortissimo influsso sulle proprietà della permeazione è il "single-filing": gli ioni non si possono sorpassare e non possono andare in direzione opposta nello stesso canale.



6. Blocco

Il blocco della corrente può avvenire tramite un "tappamento" del poro ("pore-block") oppure tramite una modificazione dell'gating ("gating modifier").

Se si suppone che si lega una molecola del bloccante al canale e se il canale legato è bloccato si può descrivere con il formalismo di Michaelis-Menten con una costante ("apparente") di dissociazione, K_D :



dove U indica lo stato libero ("unbound"), B è lo stato legato ("bound"), e k_{on} è la costante di associazione e k_{off} è la costante di dissociazione e $K_D = k_{off}/k_{on}$.

(B1) è la simbolizzazione delle seguenti equazioni differenziali:

$$\begin{aligned} dU/dt &= -[S]k_{on} * U + k_{off} * B \\ dB/dt &= [S]k_{on} * U - k_{off} * B \end{aligned} \quad (B2)$$

dove U, B sono le probabilità di essere liberi o legati (rispettivamente).

Da (B2) segue che se si fa un salto della concentrazione da qualche valore a [S] oppure un cambiamento istantaneo delle costanti (p.e. in voltage-clamp, se le costanti k_{on} , k_{off} dipendono dal potenziale)

$$U(t) = U_{\infty} + (U(0) - U_{\infty}) \exp(-t/\tau) \quad (B3)$$

dove U_{∞} è il valore di U(t) in equilibrio, U(0) è il valore iniziale (dipende dalle condizioni prima del salto delle condizioni) e τ è la costante di tempo. Vale

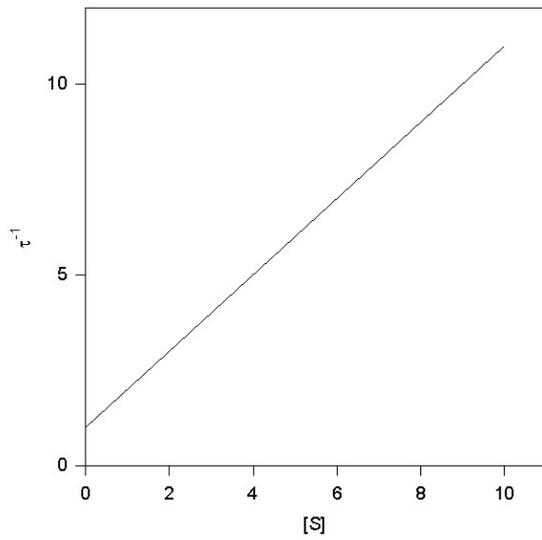
$$U_{\infty} = 1 / (1 + [S]/K_D) \quad (B4)$$

e

$$\tau^{-1} = k_{off} + [S]k_{on} \quad (B5)$$

Esercizio 12: (i) Da (B2) e dal fatto che $U+B=1$ deriva (B3), (B4) e (B5).

Se si "plotta" τ^{-1} in funzione della concentrazione si trova una retta con pendenza k_{on} e che assume il valore k_{off} per $[S] \rightarrow 0$.

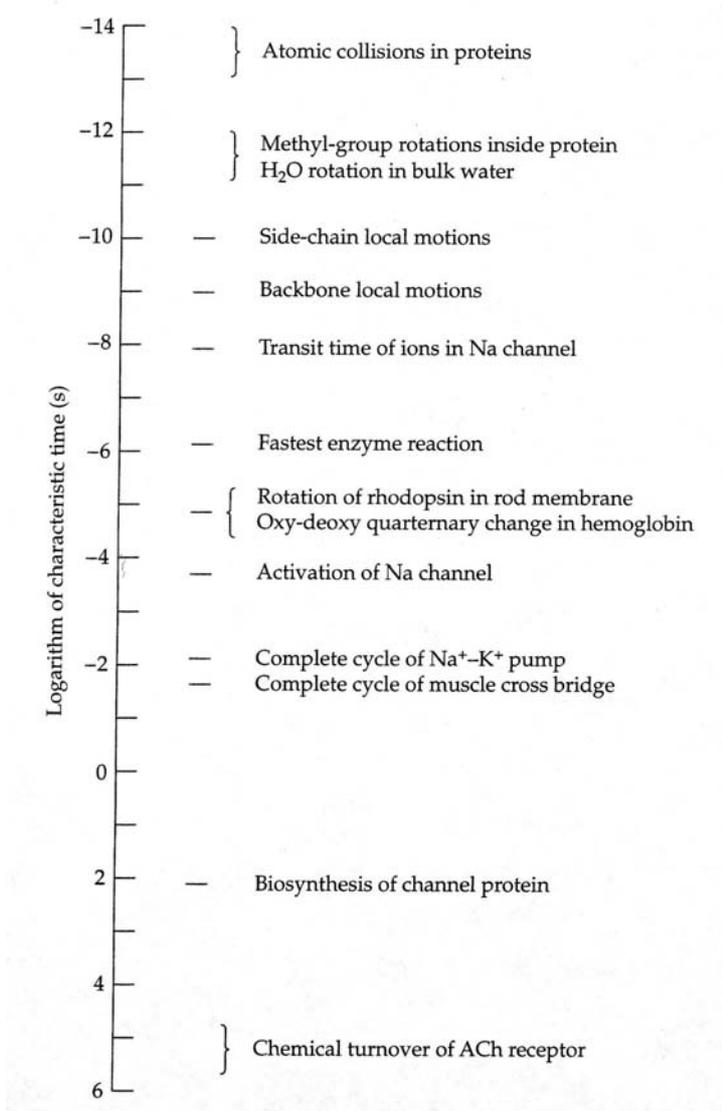
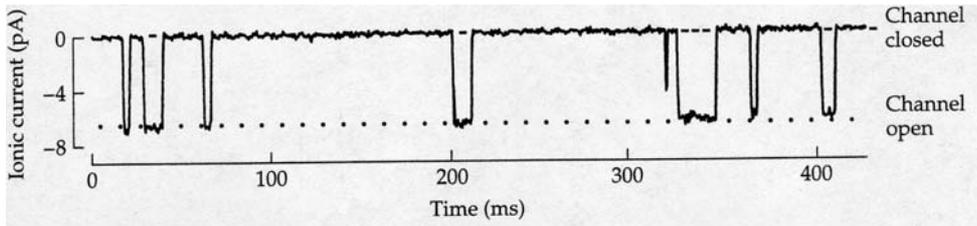


Un'analisi di questo tipo si fa per verificare un meccanismo del tipo (B1).

Capitolo II

7. Il gating

Quasi tutti canali naturali non sono permanentemente aperti come dei pori rigidi ma assumono delle conformazioni chiuse che non permettono il passaggio di ioni. I stati chiusi/aperti hanno in genere una durata molto più lunga del tempo che ci vuole per la transizione da uno stato ad un altro. Nei termini della risoluzione temporale dei metodi elettrofisiologici la transizione da uno stato di conduttanza ad un altro è in pratica istantanea.



Per questo motivo si può descrivere matematicamente il gating come delle transizioni tra vari stati discreti. Il caso più semplice sarebbe un canale che può assumere solo 2 stati: chiuso (C) e aperto (O):



Questo è un tipico modello Markoviano che si descrive praticamente con la stessa matematica come il blocco semplice (vedi sopra e sotto). L'assunzione fondamentale per la descrizione del gating come processo Markoviano è:

Il canale non ha memoria.

Questo vuol dire che se il canale si trova in un certo stato, S, la probabilità di cambiare conformazione e quindi di fare una transizione in un altro stato S', non dipende da quanto tempo si trova già nello stato S. Per l'esempio semplice di due stati questo implica:

Sia $p_C(t)$ la probabilità di trovare il canale nello stato C e $p_O(t)$ la probabilità di trovarlo nello stato O. Il significato delle rate-constant (che hanno unità s^{-1}), α e β , è il seguente:

Se avanziamo il tempo di un piccolo passo dt abbiamo:

$$p_C(t+dt) = p_C(t) - \alpha * p_C(t) * dt + \beta * p_O(t) * dt$$

e

$$p_O(t+dt) = p_O(t) - \beta * p_O(t) * dt + \alpha * p_C(t) * dt$$

perché $\alpha * p_C(t) * dt$ è la "frazione" dei canali che vanno da C a O e $\beta * p_O(t) * dt$ è la "frazione" dei canali che vanno da O a C nel tempo dt . dt deve essere abbastanza piccolo per garantire che non c'è abbastanza tempo che il canale vada "avanti" e "indietro".

Osserva che da queste due equazioni segue che

$$p_C(t+dt) + p_O(t+dt) = p_C(t) + p_O(t)$$

e quindi le equazioni garantiscono automaticamente la conservazione della probabilità. La somma delle due probabilità $p_C + p_O$ deve essere naturalmente = 1 per il caso di due stati: il canale è o aperto o chiuso. Non è prevista nessun'altra possibilità.

Facendo il limite $dt \rightarrow 0$ seguono le solite equazioni differenziali lineari:

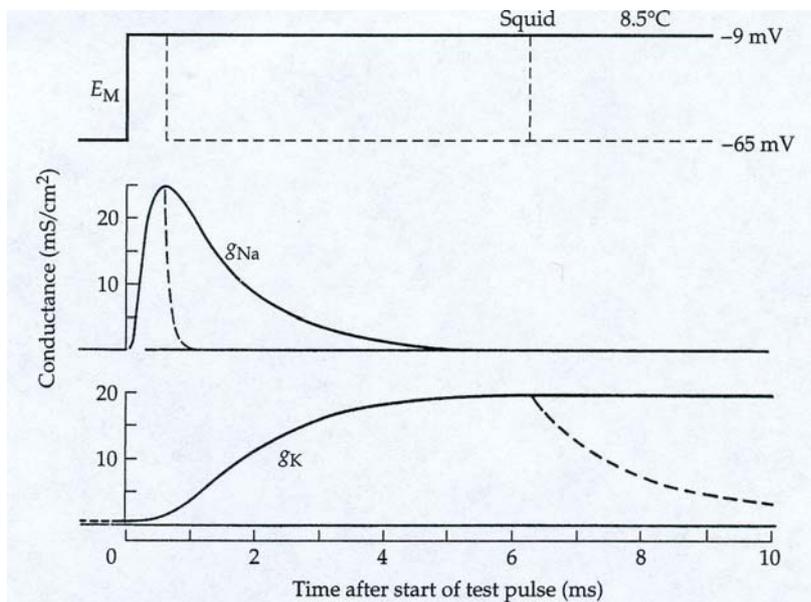
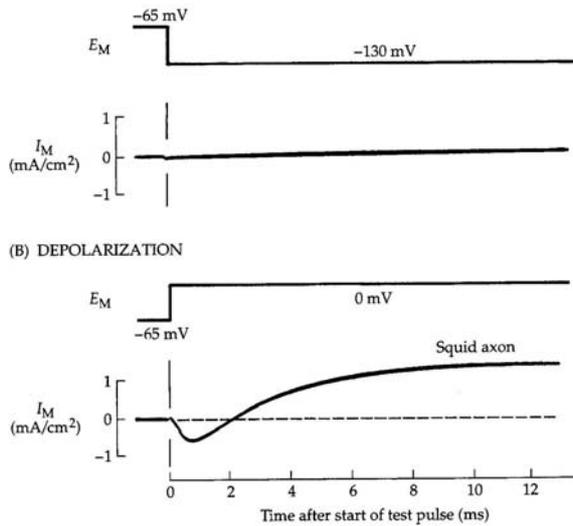
$$dp_O/dt = -\beta * p_O(t) + \alpha * p_C(t)$$

$$dp_C/dt = \beta * p_O(t) - \alpha * p_C(t)$$

Esercizio 13: Supponiamo che $p_O(0)=0$, $p_C(0)=1-p_O(0)=1$. Come si evolvono $p_O(t)$ e $p_C(t)$?

8. Il modello di HH

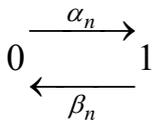
Prima di approfondire il formalismo dei modelli Markoviani trattiamo il modello di Hodgkin-Huxley (HH). HH hanno misurato con il voltage-clamp le correnti al Na^+ e al K^+ del assone gigante del calamaro.



Per spiegare la sigmoidicità del andamento temporale delle correnti hanno supposto che i canali hanno diverse porte ("gate") che devono essere in una posizione aperta per permettere il flusso degli ioni. HH non facevano neanche riferimento a canali come entità molecolari. Non ne sapevano niente. L'identificazione dei canali come proteine di membrana veniva molto più tardi. Comunque per facilitare la terminologia parleremo qui dei *canali*.

La corrente al Na^+ inattiva mentre quella al K^+ no (ci sono anche molte correnti al K^+ che inattivano ma quelle misurate da HH no). Per il K^+ HH hanno supposto la presenza di 4 gate del tipo "n" che sono indipendenti e che devono tutti essere nello stato aperto.

Ogni gate può assumere due posizioni: chiuso o aperto oppure 0 o 1. La probabilità che il gate n si trovi nella posizione "1" viene scritta come n e ha la stessa matematica di un processo Markoviano a due stati:



Esercizio 14: Supponiamo che $n(0)=0$, $\alpha_n = 100 \text{ s}^{-1}$, $\beta_n=1 \text{ s}^{-1}$. Come si evolve $n(t)$?

La sigmoidicità del andamento della corrente viene dall'assunzione che tutti i 4 gate n devono essere aperti simultaneamente perché il canale possa essere aperto. Quindi, visto che i gate sono indipendenti, la probabilità di apertura del canale è il prodotto delle singole probabilità e allora è

$$p_o(t) = n(t)^4$$

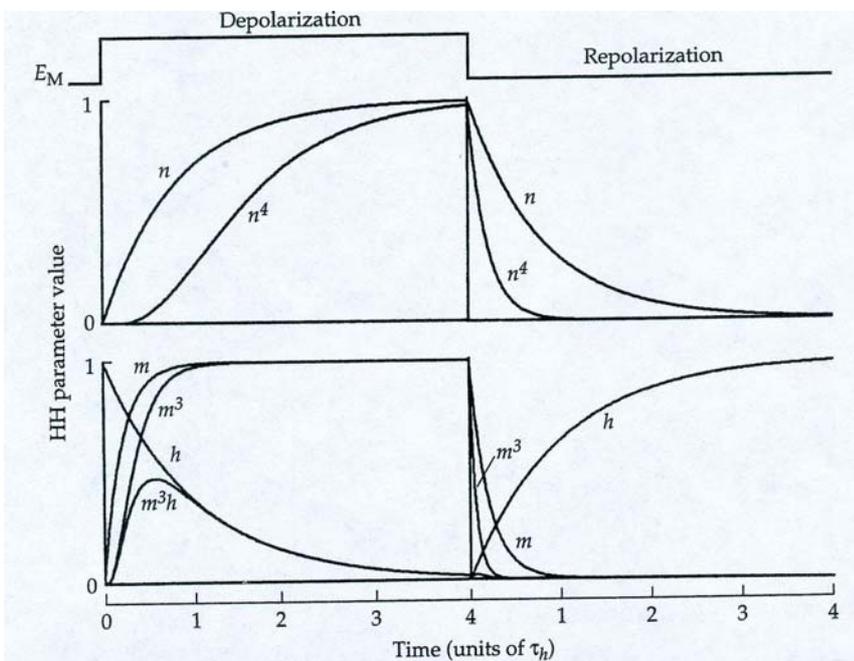
e se $n(t)$ ha una forma del tipo

$$n(t) = n_\infty(1-e^{-t/\tau_n})$$

vale

$$p_o(t)=n_\infty^4(1-e^{-t/\tau_n})^4$$

che è fortemente sigmoidale.



I due parametri n_∞ e τ_n sono quelli misurati direttamente da HH.

Esercizio 15: Come si determina α_n e β_n da n_∞ e τ_n ? (Vedi matematica del blocco semplice).

HH hanno previsto 4 gate n indipendenti il che coincide con il numero di 4 segmenti S4 nei canali al K^+ . Questo è da considerare uno dei più grandi trionfi della teoria di HH che si è verificata molti anni dopo la sua pubblicazione nel 1954.

Il canale al sodio è leggermente più complicato perché dimostra l'inattivazione. HH l'hanno descritto assumendo 3 gate indipendenti di attivazione (gate "m") e un gate ("h") per l'inattivazione

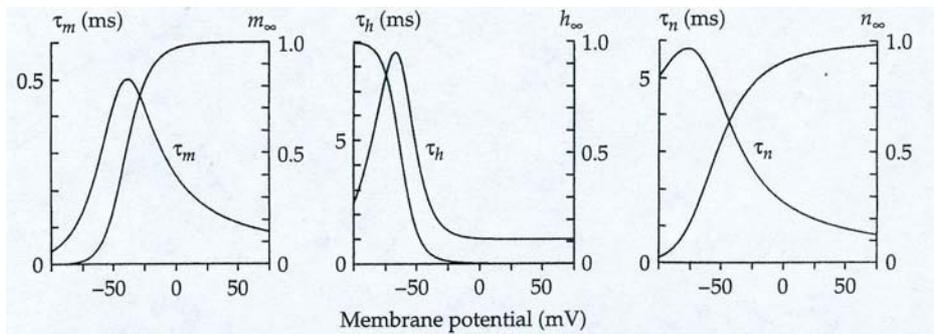


e la probabilità di apertura è data da

$$p_{Na}(t) = h_{\infty} m_{\infty}^3 (1 - e^{-t/\tau_m})^3 e^{-t/\tau_h}$$

se si parte da un potenziale negativo dove inizialmente $m=0$ e $h=1$.

Esistono vari protocolli di stimolazione per determinare i vari parametri τ_m , τ_h , ecc. che non trattiamo però qui.



Uno dei più grandi successi iniziali del modello di HH era che le equazioni descritte sopra insieme con la precisa determinazione dei parametri τ_n , n_{∞} , τ_m , m_{∞} , τ_h , h_{∞} , usando la tecnica del voltage-clamp (un'altra importantissima innovazione in questi tempi) permettono di prevedere con precisione il potenziale d'azione. Come si fa?

Prima di tutto bisogna rendersi conto della differenza fondamentale di approccio di una misura in "current-clamp" e una misura in voltage-clamp. Nel current clamp viene iniettata una corrente fissata dallo sperimentatore (I_c) attraverso un elettrodo e viene registrato il potenziale di membrana (V_m) attraverso un altro elettrodo (che può essere una micropipetta). Questo tipo di misura non richiede nessun tipo di feedback e è in un certo senso più fisiologico del voltage-clamp perché alla cellula viene permesso di reagire come "vuole".

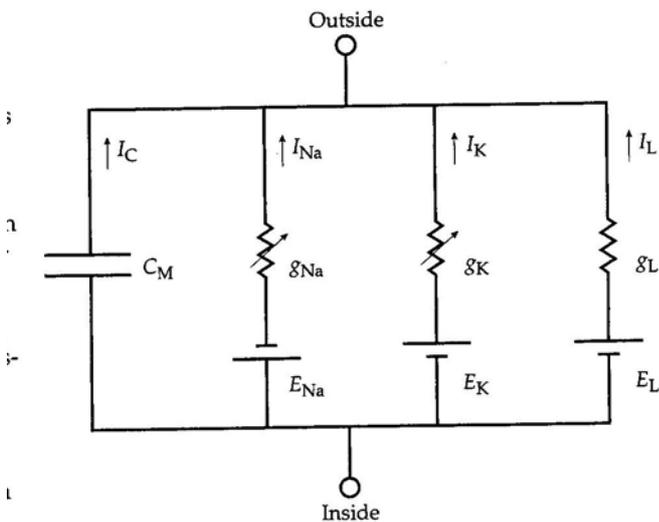
Invece nel voltage-clamp viene misurato anche il potenziale di membrana, V_m . Però mentre nel current clamp V_m fluttua in modo fisiologico (p.e. si misura un potenziale d'azione) si cerca di

tenere V_m più costante possibile ad un valore determinato esternamente attraverso un sistema elettronico di feedback iniettando la quantità sufficiente di corrente attraverso un altro elettrodo (o lo stesso nel caso del patch-clamp).

Solo con questo tipo di misura è possibile determinare i vari parametri voltaggio-dipendenti, come τ_n , τ_m , ecc. E' veramente importante rendersi conto del passo intellettuale in avanti notevolissimo del concetto del voltage-clamp paragonato con quello del current-clamp (vedi Hille).

Esercizio 16. Disegna in modo schematico il metodo del voltage-clamp come un sistema di feedback.

Ritornando al potenziale di azione:



Per una cellula in current clamp la somma delle correnti ioniche e capacitive deve essere uguale alla corrente iniettata, I_i (nel caso di una cellula senza elettrodo naturalmente $I_i=0$):

corrente capacitiva: $I_C = C_m * dV_m / dt$

corrente al sodio : $I_{Na} = g_{Na} * (V_m - V_{Na}) * m^3 * h$

dove g_{Na} è la conduttanza massima dei canali al sodio e V_{Na} è il potenziale di Nernst per il sodio. Ci sono due semplificazioni qui: (i) si suppone una IV del canale aperto lineare invece di usare p.e. la GHK-current. (ii) si suppone che V_{Na} è costante e che quindi la concentrazione del Na^+ non cambia durante l'attività elettrica. In generale è giustificato ma può anche succedere che un'attività elettrica elevata può cambiare in modo significativo la conc. del Na^+ intracellulare.

in modo simile:

corrente al potassio : $I_K = g_K * (V_m - V_K) * n^4$

Le funzioni m , h , e n soddisfanno sempre le solite equazioni differenziali (vedi sopra) solo che nel caso del current clamp i valori di α e β non sono costanti ma dipendono dal potenziale di membrana (in fondo è qui l'avanzamento intellettuale di HH di liberarsi da questa dipendenza da V_m tenendo V_m fisso nel voltage clamp).

Quindi valgono l'equazioni

$$dn(t)/dt = -\beta_n(V_m)*n(t) + \alpha_n(V_m)*(1-n(t))$$

$$dm(t)/dt = -\beta_m(V_m)*m(t) + \alpha_m(V_m)*(1-m(t)) \quad (HH1)$$

$$dh(t)/dt = -\beta_h(V_m)*h(t) + \alpha_h(V_m)*(1-h(t))$$

e V_m stesso è una funzione del tempo. Equazioni completamente analoghi valgono per $m(t)$ e $h(t)$.

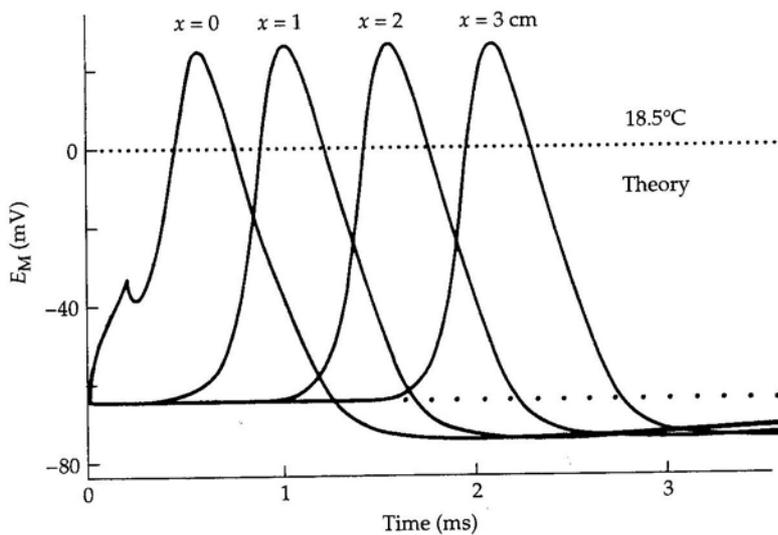
Infine HH hanno proposto una corrente di leakage, tempo-indipendente

$$I_L = g_L*(V_m-V_L)$$

Tutto sommato, la dipendenza di V_m dal tempo viene descritto da un insieme di equazioni differenziali abbastanza complicato:

$$I_i = I_C + I_K + I_{Na} + I_L$$

$$I_i = C_m*dV_m/dt + g_K*(V_m-V_K)*n^4 + g_{Na}*(V_m-V_{Na})*m^3*h + g_L*(V_m-V_L) \quad (HH2)$$



2.18 Calculated Propagating Action Potential Computer-calculated responses of a simulated axon of 476- μ m diameter and 35.4 $\Omega \cdot$ cm axoplasmic resistivity assumed to have a membrane described by the HH model adjusted to 18.5°C. In this simulation, a stimulus current is applied at $x = 0$ for 200 μ s. It depolarizes the membrane locally but not as far away as $x = 1$ cm. However, the stimulus is above threshold for excitation of an action potential, which appears successively at $x = 0, 1, 2,$ and 3 cm, propagating at a calculated steady velocity of 18.7 m/s. [From Coley and Dodge 1966.]

(HH) descrive il potenziale d'azione di una piccola cellula. Per descrivere il potenziale d'azione che viaggia lungo un assone bisogna considerare anche l'aspetto spaziale, cioè come il potenziale si trasmette lungo una fibra cilindrica ecc. Non lo facciamo qui però ma consideremo altri modelli di gating.

9. Il gating in equilibrio

Se un canale può esistere negli stati, A, B, C, D, ... il sistema si trova in equilibrio termodinamico se

1. l'occupazione dei stati A, B, C, ... è stazionaria, cioè non cambia col tempo la probabilità di stare in A o B, o C,
2. le transizioni tra gli stati non dipendendo da nessun "input" di energia, come p.e. l'idrolisi di ATP, oppure dissipazione di un gradiente ionico. Questo non vuol dire che non può essere dissipato un gradiente (quando il canale è aperto viene SEMPRE dissipato un gradiente ionico) ma solo che una eventuale dissipazione non influenza nessuna delle transizioni.

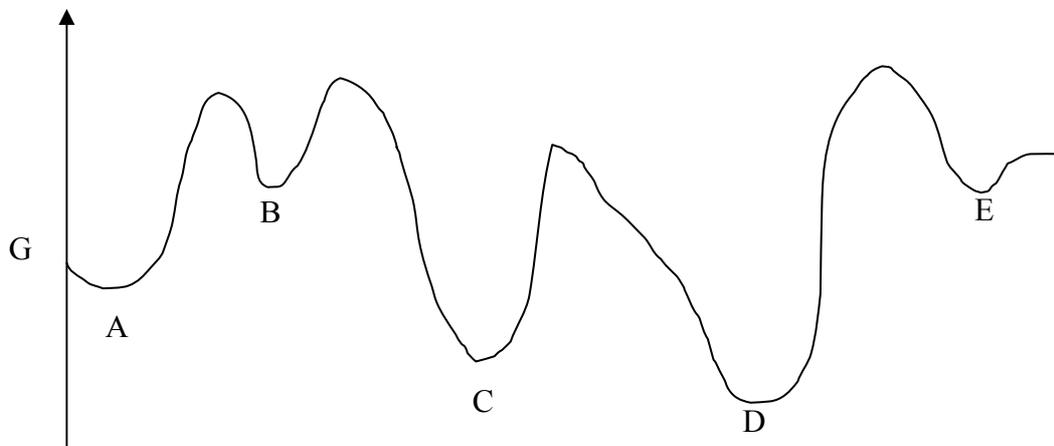
Se è soddisfatta la condizione (1) ma non la (2) si dice che il sistema è in uno stato stazionario. P.e. una pompa che sta pompando Na^+ fuori dalla cellula può benissimo essere in uno stato stazionario ma non è in equilibrio.

Se il sistema si trova in equilibrio termodinamico, e solo in questo caso, vale la distribuzione di Boltzmann che dice

$$p_A/p_B = \exp(-\Delta G_{AB}/RT) \quad (\text{Boltz})$$

dove p_A è la probabilità di trovare il sistema nello stato A e ΔG_{AB} è la differenza di energia libera degli stati A e B.

Uno può immaginare un "energy landscape"



L'occupazione dei vari stati si può calcolare dalle equazioni del tipo (Boltz) per i vari stati e la condizione che la somma delle probabilità deve essere uguale a 1.

Esercizio 17. Supponiamo di avere 4 stati A, B, C, D con $G(A)=G_a$, $G(B)=G_b$, ecc.

Per calcolare le 4 probabilità di occupazione p_A , p_B , p_C , p_D ci servono 4 equazioni indipendenti.

Un'equazione essenziale è che la somma deve fare 1. Esistono 6 possibili equazioni di tipo (Boltz) per il sistema (a parte il relativo inverso) che danno: (i) p_A/p_B , (ii) p_A/p_C , (iii) p_A/p_D , (iv) p_B/p_C , (v) p_B/p_D , (vi) p_C/p_D .

Verifica che è irrilevante se si usano una o l'altra delle seguenti possibili combinazioni delle equazioni (i)-(vi) che hanno tutti i 4 stati come componenti:

1. (i), (ii), (iii)
2. (i), (ii), (v)
3. (i), (ii), (vi)
4. (i), (iii), (iv)
5. (i), (iii), (vi)
6. (i), (iv), (v)
7. (i), (iv), (vi)
8. (i), (v), (vi)
9. (ii), (iii), (iv)
10. (ii), (iii), (v)
11. (ii), (iv), (v)
12. (ii), (iv), (vi)
13. (ii), (v), (vi)
14. (iii), (iv), (v)
15. (iii), (iv), (vi)
16. (iii), (v), (vi)

(Facilitazione: Mi va bene se verificate per il caso più semplice di solo 3 stati!)

Esercizio 17. Sia $G(A)=-2RT$, $G(B)=-RT$, $G(C)=-5RT$, $G(D)=-3RT$. Calcola le probabilità p_A , p_B , p_C , p_D .

10. Il gating voltaggio-dipendente

Supponiamo (per semplicità del discorso) di avere 2 stati, A e B.

La differenza dell'energia libera G_A-G_B dipende da vari fattori esterni come p.e. temperatura, pressione, concentrazione di un eventuale ligande e potenziale elettrico, V . Un modello molto usato per descrivere una dipendenza dal potenziale è il seguente. Si suppone che l'unico influsso che il potenziale ha è su una certa carica elettrica, q_g ('gating charge') della proteina canale che si trova in due posizioni diversi nello stato A rispetto lo stato B. Se l'unico parametro che varia è il potenziale si può quindi scrivere:

$$\Delta G_{AB} = \Delta G_0 + V * \delta * q_g \quad (GC)$$

dove ΔG_0 è la differenza di energia libera che non dipende dal potenziale (p.e. energie di Van der Waals ecc.), V è la differenza di potenziale, e δ è la frazione del campo che trascorre la carica. Spesso si scrive $\delta * q_g$ in termini della valenza effettiva, z_g .

$$\delta * q_g = z_g * F.$$

dall'equazione di Boltzmann segue quindi

$$p_A/p_B = \exp(-\Delta G_{AB}/RT) = \exp(-(\Delta G_0 - V * z_g F)/RT) \quad (B1)$$

immettendo (GC) e definendo in modo opportuno il parametro V_0 si può anche scrivere come

$$p_A/p_B = \exp(-(V - V_0) * z_g F/RT) \quad (B2)$$

Esercizio 18. Come bisogna definire V_0 ?

Definendo in modo opportuno il parametro k si può scrivere (B2) come

$$p_A/p_B = \exp(-(V - V_0)/k) \quad (B3)$$

Esercizio 19. Come bisogna definire k ?

Supponendo di avere solo in due stati A e B si può derivare

$$p_A(V) = 1 / (1 + \exp((V - V_0)/k)) \quad (B4)$$

Esercizio 20. Deriva (B4). Grafica (B4) per $V_0=0$ mV e $k=25$ mV, $k=12.5$ mV, $k=6.25$ mV.

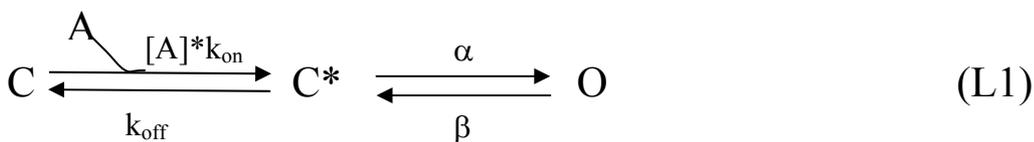
Esercizio 21. A quali valori di z_g corrispondono i valori di k del Esercizio 20?

11. Attivazione da ligandi

Il più semplice meccanismo di attivazione da un ligande sarebbe forse



dove il legame di un agonista, A, porta direttamente all'apertura del canale. Sarebbe come un "blocco al contrario". In realtà questo meccanismo è poco plausibile. Invece è più plausibile il meccanismo proposto da de Castillo e Katz (1957) per il recettore di acetilcolina:



dove prima si lega il ligande il che porta il canale in uno stato "attivato" ma ancora chiuso. Da qui il canale può o di nuovo perdere il ligande (k_{off}) o si può aprire con un tasso α . Si richiude con tasso β . α e β sono indipendenti dalla concentrazione del ligande.

Esercizio 22. Usando le relazioni $p_C/p_{C^*} = k_{\text{off}}/([A]*k_{\text{on}})$ e $p_O/p_{C^*} = \alpha/\beta$ calcola le probabilità stazionarie di tutti i 3 stati.

Esercizio 23. Se la concentrazione di A è molto grande qual'è il valore di p_O ?

Se le cinetiche del binding/unbinding del ligande (date da k_{on} e k_{off}) sono molto più veloci del cambiamento di conformazione (caratterizzato da α e β) si può semplificare molto la descrizione: In questo caso i due stati C e C* sono sempre in equilibrio e quindi vale sempre

$$p_{C^*}/p_C = [A]/K_D \quad (L2)$$

dove $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ e si possono "lumpare" i due stati chiusi in uno stato C' cineticamente distinto

$$C' \begin{array}{c} \xrightarrow{\alpha'} \\ \xleftarrow{\beta} \end{array} O \quad (L3)$$

con un tasso "apparente" di attivazione α' .

(Definizione della probabilità condizionata con un esempio: supponiamo di avere un dado perfetto. La probabilità di fare un uno è $1/6$ ecc. La probabilità di fare o un uno o un due o un tre è $1/6+1/6+1/6 = 1/2$.

Si può anche scrivere

$p(1,2,3)=p(1)+p(2)+p(3)$ perché sono eventi indipendenti.

Supponiamo di considerare solo gli eventi 1, 2, e 3, cioè quando facciamo 4,5, o 6 lanciamo subito di nuovo senza contare. Tra questi eventi "buoni": qual è la probabilità di aver fatto un uno?

E' $1/3 = (1/6) / (1/2)$ e si chiama la probabilità condizionata. Si scrive

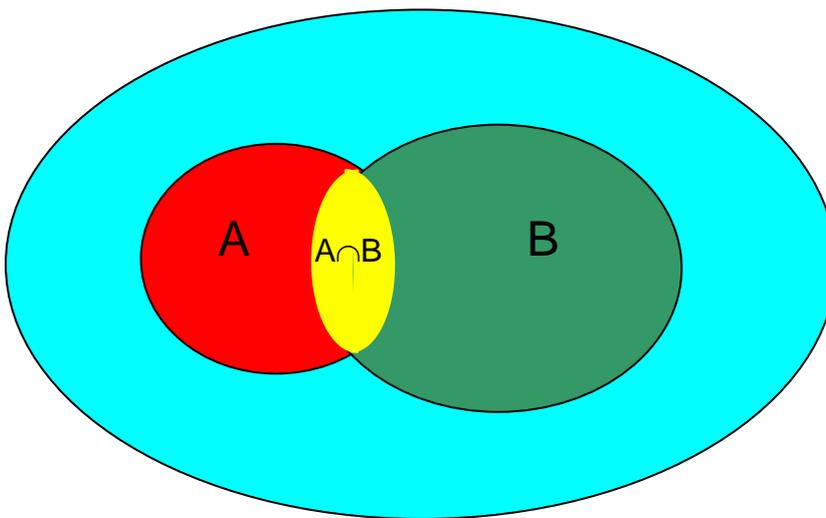
$$p(1 | (1,2,3)) = 1/3$$

"La probabilità di aver fatto un uno dato che è sicuramente o 1 o 2 o 3"

In generale per sottoinsiemi A, B

$$p(A|B) = p(A \cap B) / p(B)$$

(= la probabilità di avere un evento di A, sapendo che è comunque un evento di B)



FINITA LA DEF. DI PROB. CONDIZIONATA)

Esercizio 24. Usando (L1, L2, L3) e la considerazione che

$$\alpha' = \alpha * \text{Prob}(\text{essere nello stato } C^* \mid \text{essere nello stato } C \text{ o nello stato } C^*),$$

(cioè per calcolare questa probabilità sono da considerare solo i due stati C e C*)

calcola α' in funzione di α , [A] e K_D . Qual è il valore per α' se [A] è molto più grande di K_D ?
E per $[A] \rightarrow 0$?

Esercizio 25. Usando (L3) come è l'andamento temporale di p_O se partiamo di una situazione di assenza di agonista e aggiungiamo una concentrazione saturante (i.e. $\gg K_D$) a tempo 0?

Esercizio 26. Usando (L3) come è l'andamento temporale di p_O se partiamo di una situazione di [A] = saturante (i.e. $\gg K_D$) (per tanto tempo) e laviamo via l'agonista a tempo 0?

12. Analisi di rumore

Se non è possibile avere registrazioni di singolo canale è spesso comunque possibile ottenere delle informazioni sulle proprietà microscopiche di un canale come p.e. conduttanza del singolo canale oppure probabilità assoluta di apertura.

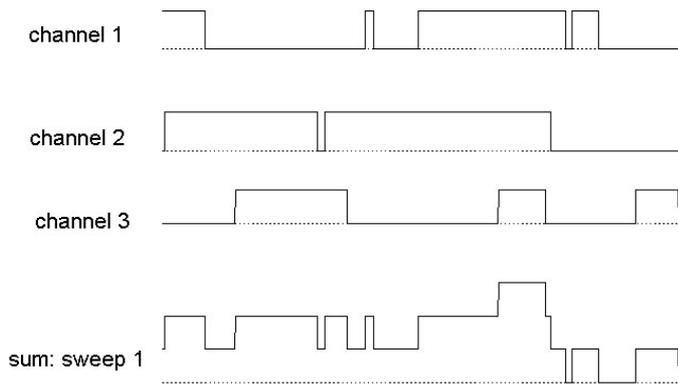
Le assunzioni che si fanno quasi sempre se si fa un'analisi di rumore di canali sono

- (i) Si suppone di avere una popolazione omogenea di canali, cioè un insieme di canali in cui tutti sono uguali tra di loro.
- (ii) Si suppone che i canali siano indipendenti uno dall'altro.
- (iii) Si suppone che i canali abbiano esattamente due livelli di conduttanza: completamente chiuso e completamente aperto.

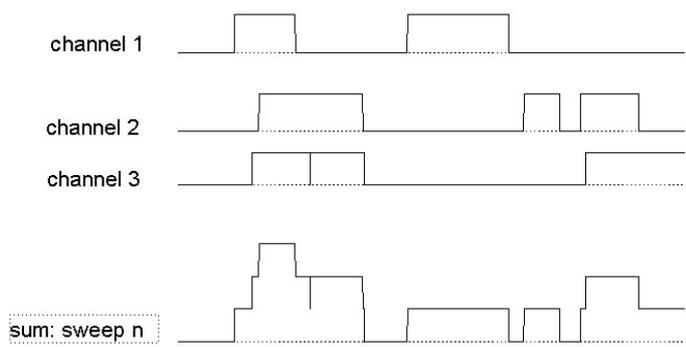
Mentre (i) e (ii) sono veramente fondamentali l'assunzione (iii) può anche essere non valida solo che la matematica diventa leggermente più complicata.

Poi, per adesso ci interessa solo il "noise" che deriva dalla stocasticità della probabilità di apertura e non consideriamo p.e. che i canali possano avere un "open channel noise" o altri sorgenti di rumore.

Facciamo un esempio con 3 canali nel patch:



....



Supponiamo di registrare n "sweep". Per ogni tempo, t, possiamo calcolare la media. Sarà I_i lo sweep con numero i. Quindi:

$$\langle I(t) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_i(t) \quad (M0)$$

Se n è molto grande, la media è molto "liscia", cioè non si vedono più le fluttuazioni come nelle singole tracce.

Se abbiamo N canali identici ognuno con la corrente del singolo canale i, e una probabilità di apertura (che può dipendere dal tempo) p(t) la media (per n molto grande) diventa:

$$\langle I(t) \rangle = Nip(t) \quad (M1)$$

Si potrebbe anche dire che questa equazione definisce la probabilità di apertura. Quindi se si conosce sia N che i si può ricavare la p_{open} da (M1).

L'altro parametro importante è la varianza che è definita come

$$\sigma^2(t) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (I_i(t) - \langle I(t) \rangle)^2 \quad (V)$$

La "standard deviation" che si usa sempre per rappresentare i dati non è nient'altro che la radice quadra di σ^2 :

$$S.D. = \sqrt{\sigma^2}$$

ma qui ci interessa solo la varianza.

Come dipende σ^2 dai parametri N , i , e p ? Da (V) segue

$$\sigma^2(t) = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_i(t)^2 \right) - \langle I(t) \rangle^2 = \langle I^2(t) \rangle - \langle I(t) \rangle^2 \quad (V2)$$

Esercizio 27. Deriva (V2) da (V).

Supponiamo per semplicità di avere un solo canale. Quindi

$$\langle I(t) \rangle = pi$$

e

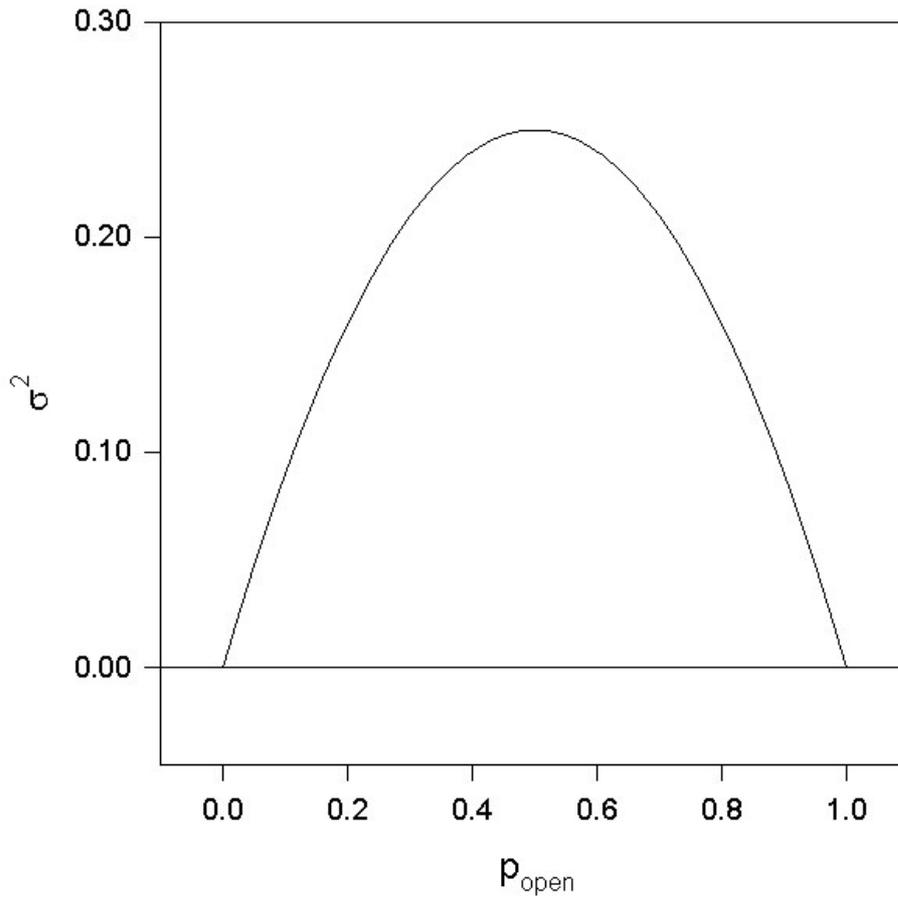
$$\langle I^2(t) \rangle = pi^2$$

e quindi

$$\sigma^2(t) = \langle I^2(t) \rangle - \langle I(t) \rangle^2 = pi^2 - p^2i^2 = i^2 p(1 - p)$$

Una proprietà bellissima della varianza è che è additiva cioè se ci sono più sorgenti di rumore indipendenti le varianze si sommano. Quindi se abbiamo N canali:

$$\sigma^2(t) = Ni^2 p(1 - p) \quad (V3)$$



Esercizio 28. Dimostra matematicamente che la funzione $f(p)=p*(1-p)$ ha un massimo per $p=0.5$ e calcola $f(0.5)$. Se hai N canali nel patch quant'è la massima varianza che puoi misurare?

Se inseriamo in (V3) l'equazione (M1) otteniamo

$$\sigma^2(t) = i \langle I(t) \rangle - \frac{\langle I(t) \rangle^2}{N} \quad (V4)$$

Esercizio 29. Deriva (V4).

Se la probabilità di apertura è molto piccola, il secondo termine in (V4) è molto piccolo e si può calcolare i dall'equazione

$$i = \sigma^2 / \langle I \rangle \quad (V5)$$

Se invece p è più grande, soprattutto se è vicino a 1 (V5) da una cattiva stima di i .

(V4) viene usato per l'analisi di rumore non stazionaria. Quello che si fa è plottare la varianza in funzione della media e di fittare la curva con i due parametri i e N .