

Detektion schneller Übergangsraten in Markov-Prozessen durch kombinierte Auswertung von Amplitudenhistogramm und Zeitreihe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Philipp Harlfinger

Kiel, September 2003

Referent:

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Biologische Grundlagen.....	4
2.1.	Membranen.....	4
2.2.	Membrantransport	5
2.3.	Ionenkanäle	6
2.3.1.	Aufbau des KcsA-Kanals	6
2.3.2.	Selektionsmechanismus	7
2.3.3.	Maxi-K-Kanal	7
3.	Patch-Clamp-Messungen	9
3.1.	Verfahren.....	9
3.2.	Versuchsaufbau.....	11
3.3.	Aufnahmeelektronik	12
4.	Auswertung von Patch-Clamp-Messungen.....	13
4.1.	Markov-Modell	13
4.2.	Die gemessene Zeitreihe	14
4.3.	Das Amplitudenhistogramm	15
4.4.	Rekonstruktion der originalen unverrauschten Zeitreihe	16
4.5.	Die Dwell-Time-Analyse	17
4.6.	Der Direkte Zeitreihenfit	18
4.7.	Betafit für Filter erster Ordnung.....	20
5.	Testmethoden.....	22
5.1.	Simulation von Patch-Clamp-Zeitreihen.....	22
5.2.	Reichweitentest	23
5.3.	Rauschabhängigkeitstest	23
5.4.	Leistungsfähigkeit beim Fünf-Zustands-Modell.....	24
5.5.	Startwerte bei den Tests der Fitverfahren	25
6.	Leistungsfähigkeit bisheriger Verfahren.....	27
6.1.	Leistungsfähigkeit bei Ein-Kanal-Zeitreihen.....	28
6.1.1.	Reichweitentest	28
6.1.2.	Rauschabhängigkeitstest	29
6.1.3.	Fünf-Zustands-Modelle	32
6.2.	Leistungsfähigkeit bei Zwei-Kanal-Zeitreihen	36
6.2.1.	Reichweitentest	36
6.2.2.	Rauschabhängigkeitstest	37
6.2.3.	Fünf-Zustands-Modelle	38
7.	Direkter Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion.....	40
7.1.	Ansatzpunkt.....	40
7.2.	Reichweitentest	42
7.3.	Rauschabhängigkeitstest	44
8.	Betafit für Filter höherer Ordnung	46
8.1.	Ansatzpunkt.....	46

8.2.	Simulation des Amplitudenhistogramms	47
8.2.1.	Einzelkanal.....	47
8.2.2.	Mehrere Kanäle	48
8.2.3.	Rauschen	48
8.3.	Leistungsfähigkeit bei Ein-Kanal-Zeitreihen.....	49
8.3.1.	Reichweitentest	49
8.3.2.	Rauschabhängigkeitstest	51
8.3.3.	Fünf-Zustands-Modell.....	53
8.4.	Leistungsfähigkeit bei Zwei-Kanal-Zeitreihen	54
9.	Joint-Fit-Strategie	55
9.1.	Ansatzpunkt.....	55
9.2.	Gewichtungsfaktor	56
9.3.	Leistungsfähigkeit bei Ein-Kanal-Zeitreihen.....	57
9.3.1.	Reichweitentest	57
9.3.2.	Rauschabhängigkeitstest	58
9.3.3.	Fünf-Zustands-Modell.....	60
9.4.	Leistungsfähigkeit bei Zwei-Kanal-Zeitreihen	61
9.4.1.	Reichweitentest	61
9.4.2.	Rauschabhängigkeitstest	62
9.4.3.	Fünf-Zustands-Modell.....	63
10.	Analyse von Gating-Effekten.....	65
11.	Modell-Verifikation	70
11.1.	A-O-G-C-Z-Modell.....	70
11.2.	Z-A-C-O-G-Modell.....	74
12.	Fazit und Ausblick	77
13.	Zusammenfassung.....	79
	Literaturverzeichnis.....	81

1. Einleitung

Ein zentrales Anliegen biophysikalischer Arbeiten ist die Erforschung von Transportvorgängen in biologischen Membranen. Dieser Transport basiert auf membranüberspannenden Proteinen. Die bisher am intensivsten untersuchte Klasse von Transportproteinen ist die der Ionenkanäle. Die Transportaktivität der Ionenkanäle und damit auch ihre Funktion im Organismus wird durch zwei Größen eingestellt: Einzelkanalstrom und Schalten zwischen aktiven und inaktiven Zuständen. Wenn die Kanäle im aktiven Zustand sind, vermitteln sie den Durchtritt von Ionen durch die Membran und ermöglichen so einen sehr kleinen Strom, der sich im Pico-Ampere-Bereich bewegt.

Bis heute das Hauptstandbein bei der Erforschung der biophysikalischen Mechanismen der Ionenkanäle ist die im Jahre 1976 von Sakman und Neher (1983) eingeführte und im Jahre 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnete Patch-Clamp-Technik. Mit dieser Technik kann der Strom durch einzelne Kanäle gemessen und damit das Schalten zwischen verschiedenen Leitfähigkeitsstufen direkt beobachtet werden.

Ein weiterer Durchbruch gelang Ende der neunziger Jahre mit der Darstellung der Kristallstruktur eines K^+ -Kanals mittels der Röntgenkristallstrukturanalyse (Doyle et al., 1998). Diese ermöglichte eine Erklärung des Selektionsmechanismus des Kanals. Bis dahin war es unklar gewesen, wie der Kanal es anstellte, trotz Transportraten von 10^7 bis 10^8 Ionen/s nur ganz bestimmten Arten von Ionen den Durchtritt zu gewähren.

Die Kenntnis der kristallinen Struktur des Kanals könnte es nahe legen, sich dem Schaltverhalten mit molekular-dynamischen Berechnungen anzunähern. Dem stehen jedoch noch erhebliche praktische Probleme im Wege. Allein um Aussagen über den Weg der Ionen machen zu können, müssten mindestens zehn Durchgänge durch den Kanal berechnet werden. Bei einem Strom von 4,5 pA erfordern diese zehn Durchgänge einen Zeitraum von 0,3 μ s. Beim Porin beispielsweise müsste man dann 1020 Aminosäurereste, 300 Phosphatidylmoleküle, 12992 Wassermoleküle und 27 Natriumionen betrachten. Die für 1 ps Realzeit benötigte Rechenzeit beträgt zwei Stunden, die Hochrechnung auf 0,3 μ s führt zu einer Rechenzeit von etwa 70 Jahren (Levitt, 1999).

Es ist mithin weiterhin erforderlich, das Schaltverhalten von Kanälen mit Hilfe von Modellen zu betrachten. Stand der Forschung ist es, dass sich die Verhaltensweise der Ionenkanäle mit Hilfe von diskreten Markov-Modellen beschreiben lässt (Neher und Stevens, 1977; Ball und Rice, 1992; Colquhoun und Hawkes, 1995). Da bei diesen Modellen nur relativ wenige Voraussetzungen gemacht werden, lassen sie sich gut mathematisch behandeln (Colquhoun und Hawkes, 1977). Insbesondere hängt die Wahrscheinlichkeit, dass sich das System in einem bestimmten Zustand befindet, nur vom unmittelbar vorhergehenden Wert ab, während die weitere Vorgeschichte keine Rolle spielt. Diese Eigenschaft ist der Grund dafür, dass bei den meisten Fitalgorithmen der Rechenaufwand nur linear mit der Anzahl der Messpunkte ansteigt. Es hat Versuche gegeben, die Kanäle anders zu beschreiben, z.B. durch fraktale Modelle (Liebovitch et al., 1987). Bisher sind aber keine experimentellen Ergebnisse bekannt, die den höheren mathematischen Aufwand rechtfertigen (Korn und Horn, 1988).

Geht man also davon aus, dass die Markov-Modelle der richtige Ansatz sind, die Funktion der Kanäle zu beschreiben, ist es ein wesentliches Problem, die Übergangsraten

zwischen den verschiedenen Zuständen des Modells aus der gemessenen Zeitreihe des Stroms zu ermitteln.

Das klassische Verfahren zur Bestimmung der Übergangsraten ist die Auswertung der Verweildauerhistogramme (Sakman und Neher, 1983). Durch die Anpassung von Exponentialfunktionen an die Verweildauerhistogramme lassen sich die Zeitkonstanten und daraus die Übergangsraten bestimmen (Blunck et al., 1998). Entscheidender Nachteil dieser Methode ist es, dass erst der rauschfreie Stromverlauf rekonstruiert werden muss, bevor die Verweildauerhistogramme erzeugt werden können. Es gibt verschiedene Detektionsalgorithmen, die aus der verrauschten Zeitreihe feststellen, in welchem Stromzustand das System ist und wie lange es darin verweilt (Schultze und Draber, 1993; Hansen et al., 1995). Das Problem aller dieser Algorithmen ist es, dass sie schnelle Schaltereignisse, die über dem Auflösungsvermögen des Detektors liegen, nicht erkennen.

Die Nachteile des Sprungdetektors vermeidet der Direkte Zeitreihenfit (Fredkin und Rice, 1992; Klein et al., 1997). Dieser vergleicht mit einer Ein-Schritt-Prädiktion die Wahrscheinlichkeiten der im nachfolgenden Schritt möglichen Zustände mit der Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Stromwert zum jeweiligen Zustand gehört. Albertsen (1994, Albertsen und Hansen, 1994) erweiterte diese Methode auf Systeme mit mehreren Zuständen und Kanälen. Farokhi et al. (2000) stellten dar, dass bei schnellem Schalten, das an der Grenze des zeitlichen Auflösungsvermögens liegt, der Direkte Zeitreihenfit dem Dwell-Time-Fit überlegen ist. So konnte mit dem Dwell-Time-Fit das schnelle Schalten des K^+ -Kanals von *Chara*, das beim anomalen Molfraktionseffekt (AMFE) in der Mischung aus K^+ und Tl^+ scheinbar eine Reduktion des Einzelkanalstroms erzeugt, nicht entdeckt werden. Mit Hilfe des Direkten Zeitreihenfits konnte diese scheinbare Stromreduzierung auf die Mittelung über schnelle Schaltprozesse zurückgeführt werden.

Auch der Direkte Zeitreihenfit findet aber Übergangsraten in der Größenordnung von 100 kHz nicht zuverlässig. Er gibt zu niedrige Werte an, die mit Korrekturfaktoren aus Simulationen berichtigt werden müssen. Die Untersuchungen am AMFE (Farokhi et al., 2000), aber auch das Auftreten von Sublevels in der Zeitreihe (Schröder et al., 2003; diese Arbeit Kapitel 10) deuten darauf hin, dass verschiedene Prozesse in den Transportproteinen an der Grenze des derzeitigen Auflösungsvermögens ablaufen. Die Erforschung dieser Prozesse könnte weichenstellend für weitere Hypothesen über die Transportmechanismen im Kanalprotein sein. Es ist deswegen erstrebenswert, die zeitliche Auflösung der Auswerteverfahren zu verbessern.

Ein Verfahren, das speziell zum Erkennen schneller Schaltereignisse geeignet ist, hat FitzHugh (1983) eingeführt. Er wendete die einstmals für Telegrafensignale entwickelte Theorie der Betaverteilungen auf die Amplitudenverteilungen von Kanalströmen an. Das Verfahren nutzt die Tatsache, dass das Tiefpassfilter auf Änderungen des Stromwerts immer mit einer gewissen Trägheit reagiert und so Informationen über das schnelle Schalten in die Verteilung der Stromwerte überträgt. Rießner (1998) hat die Theorie der Betaverteilungen auf Mehrkanal- und Mehrzustandsmodelle erweitert. Sein Verfahren des Betafits ist bisher jedoch nur von theoretischem Interesse, weil es auf Filter erster Ordnung beschränkt ist (Harlfinger, 2000), während in Aufzeichnungsanlagen Filter höherer Ordnung eingesetzt werden.

In einem ersten Schritt wird in dieser Arbeit versucht, das Zeitauflösungsvermögen des Direkten Zeitreihenfits direkt zu verbessern, indem der Schätzalgorithmus von einer Einschritt- auf eine Mehrschritt-Prädiktion umgestellt wird. Es zeigt sich jedoch, dass man nur bei Zeitreihen mit einem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis eine Verbesserung gegenüber dem bisherigen Verfahren erzielt. Da erhöhte Anforderungen an das Signal-Rausch-Verhältnis eine nicht hinnehmbare Einschränkung darstellen, wird dieser Ansatz verworfen.

Der nächste Ansatz knüpft an den Betafit von Rießner an. Das Ziel ist es, den Anwendungsbereich des Verfahrens auf Filter höherer Ordnung zu erweitern. Dazu werden

die Amplitudenhistogramme nicht mehr wie im bisherigen Verfahren aus den Differentialgleichungen für Beta-Verteilungen berechnet, sondern simuliert.

Mit dem Erweiterten Betafit und dem Direkten Zeitreihenfit stehen nunmehr zwei Verfahren mit sehr unterschiedlichen Stärken und Schwächen zur Verfügung. Der Direkte Zeitreihenfit erkennt mit großer Sicherheit langsame Übergangsraten, während der Betafit konstruktionsbedingt bei schnellen Übergangsraten überlegen ist.

Mittels einer Joint-Fit-Strategie werden der Erweiterte Betafit und der Direkte Zeitreihenfit im dritten Schritt zu einem Verfahren verschmolzen. Vorteilhaft ist die im Vergleich zu den Einzelverfahren verbreiterte Informationsgrundlage für die Auswertung, weil nun in einem Verfahren sowohl die Zeitreihe als auch das Amplitudenhistogramm berücksichtigt werden.

An umfangreiche Untersuchungen der Leistungsfähigkeit aller Verfahren bei simulierten Zeitreihen schließen sich einige Beispiele der praktischen Anwendung an.

2. Biologische Grundlagen

2.1. Membranen

Membranen sind Bestandteil jeder biologischen Zelle. Sie grenzen die Zellen und die in ihnen enthaltenen Funktionseinheiten gegen die Umgebung ab und schützen sie vor dem Eindringen schädlicher Substanzen.

Membranen erfüllen vielfältige Kommunikationsaufgaben. Sie besitzen spezifische Rezeptoren für äußere Reize, sind aber auch in der Lage, selbst elektrische oder chemische Signale auszusenden. Ferner laufen die beiden wichtigsten Energieumwandlungsprozesse, die Photosynthese und die Atmung (oxidative Phosphorylierung), am Membransystem ab. Nicht zuletzt ist die Membran auch für die in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden Transportprozesse zuständig. Sie sorgt dafür, dass Reaktionspartnern der Eintritt in die Zelle ermöglicht wird und dass Reaktionsprodukte wieder entlassen werden (Larsson et al., 1990; Nultsch, 1982).

Eine schematische Darstellung des Aufbaus einer biologischen Membran zeigt die folgende Abbildung.

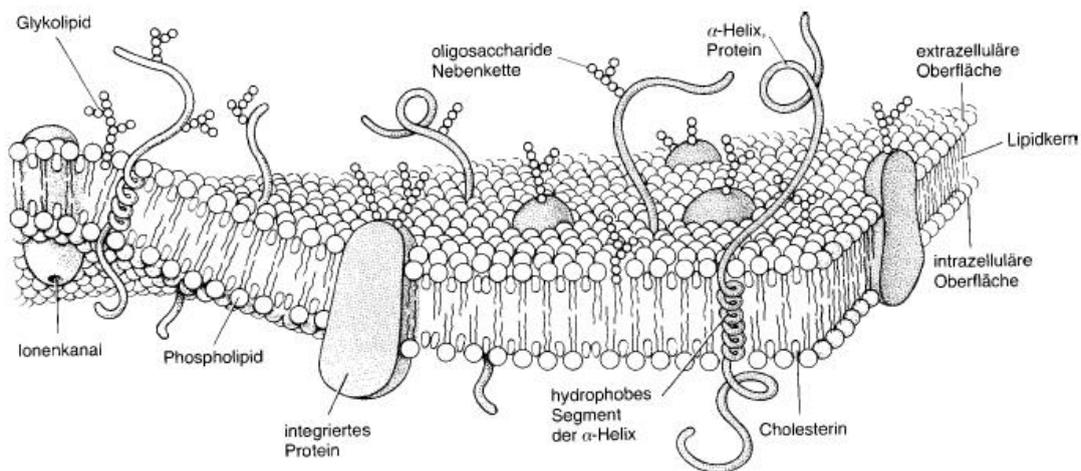


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer biologischen Membran (Singer und Nicolson, 1972).

Das Grundgerüst der Membran ist eine Lipiddoppelschicht. Die Lipide bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe mit einem lipophilen Schwanzteil aus zwei langen Kohlenwasserstoffketten. Die Lipidketten stellen sich zueinander parallel und bilden eine Lipidschicht. Zwei dieser Lipidschichten setzen sich zur 4-5 nm dicken Lipiddoppelschicht der Membran zusammen.

Eingebettet in diese Lipiddoppelschicht sind die verschiedenen Proteine, mittels derer die Membran ihre vielfältigen Aufgaben erfüllt.

2.2. Membrantransport

Eine Aufgabe der in der Membran enthaltenen Proteine ist es, den für die Zelle lebensnotwendigen Stoffaustausch sicherzustellen.

Nach der Art der Energiezufuhr wird unterschieden zwischen aktiven und passiven Transportprozessen. Der Transport gegen einen elektrochemischen Gradienten heißt aktiver Transport. Als Energielieferant für den aktiven Transport kommt durch die Spaltung von ATP entstehende chemische Energie in Betracht (Alberts et al., 1990), es kann aber auch ein bestehender elektrochemischer Gradient (z.B. für H^+ oder Na^+) an den Transport gekoppelt werden (Kotransport, Sanders et al., 1984).

Der hier interessierende passive Transport verläuft dagegen entlang eines elektrochemischen Gradienten, eine Zufuhr zusätzlicher Energie erfolgt nicht. Es gibt zwei verschiedene Mechanismen des passiven Transports: Kanal und Carrier (siehe Abbildung 2.2).

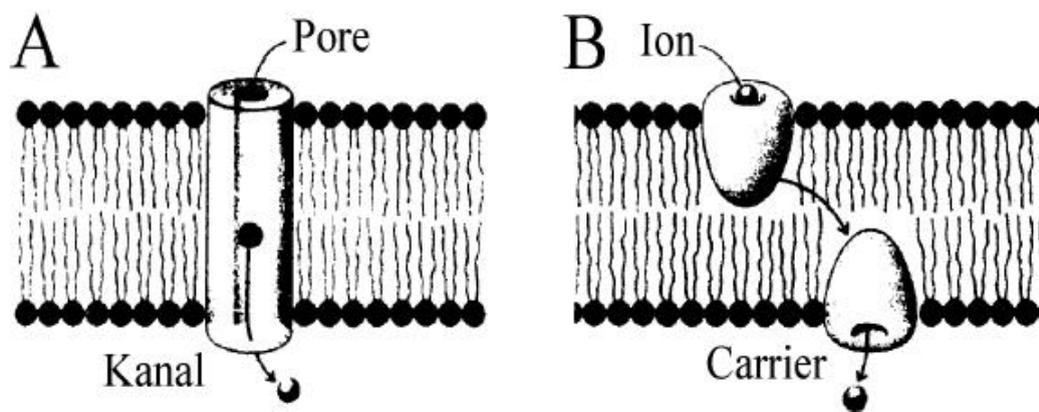


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines (A) Kanal- und eines (B) Carrier-Transportproteins (Stryer, 1996).

Als Kanäle werden Transportproteine bezeichnet, die eine die gesamte Membran überbrückende Pore ausbilden und die selektiv das Passieren der Membran ermöglichen. Am bekanntesten und besten untersucht sind Ionenkanäle (Läuger, 1980; Pongs, 1992). Die Kanäle werden aber auch von anderen Stoffen durchquert, wie beispielsweise Wasser (Murata et al., 2000) oder Peptiden (Bezanilla, 2000; Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999; Lankat-Buttgereit und Tampé, 2002). Kanäle haben sehr hohe Transportraten von bis zu 10^9 Ionen/s (beim Wasserkanal), weisen aber dennoch eine hohe Spezifität für das zu transportierende Substrat auf.

Carrier sind lipidlösliche Moleküle, die sich innerhalb der Membran frei bewegen können. Ein Carrier nimmt das zu transportierende Substrat auf der einen Seite der Membran auf, durchquert die Membran zusammen mit ihm und setzt es auf der anderen Seite wieder frei. Auf diese Weise werden Transportraten von 10^2 bis 10^4 Ionen/s erreicht (Läuger, 1980).

Es wird zunehmend davon ausgegangen, dass es sich bei den meisten Transportproteinen um Kanäle handelt. Viele Transporter, die man früher für Carrier gehalten hat, werden heute als Kanäle angesehen (Galli et al., 1995; Conejero, 1997). Tatsächlich als Carrier identifiziert werden konnten bisher nur wenige Transportproteine. Dabei handelt es sich um einige Kampfstoffe von Bakterien (z.B. Valinomycin; Benz und Läuger, 1976; Benz et al., 1980). In Pflanzen gibt es H^+ -Carrier in der Thylakoidmembran (Plastoquinon) und in den Mitochondrien. Keine Carrier sind bisher in der äußeren Zellmembran nachgewiesen worden (Kleinig und Maier, 1999).

2.3. Ionenkanäle

Sollen Aufbau und Funktion der Ionenkanäle erforscht werden, existieren unterschiedliche Herangehensweisen. So ist es möglich, mit Hilfe biochemischer Methoden die Sequenz von Makromolekülen wie beispielsweise Transportproteinen zu bestimmen. Die Kenntnis der Sequenz ist jedoch nur ein erster Schritt, wenn es um die räumliche Anordnung der Kette oder die Funktion einzelner Aminosäuren geht. Das Ziel, eines Tages bereits aus der Sequenz das komplette Verhalten berechnen zu können (Berneche und Roux, 2001; Durell and Guy, 1998), ist derzeit noch in einiger Ferne.

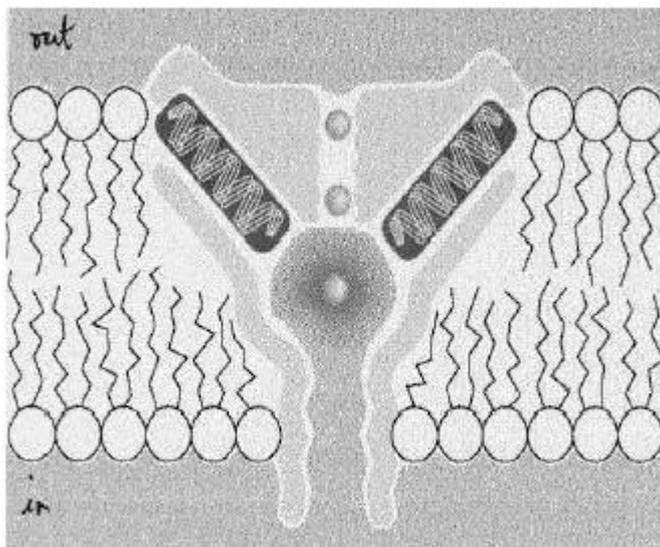
Zur Funktionsbestimmung bedient man sich der Mutagenese. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren der Kette wird eine funktionelle Zuordnung ermöglicht.

Den dreidimensionalen Aufbau des Kanals untersucht man mittels Röntgenkristallstrukturanalyse. Dies setzt jedoch ein Vorliegen des Kanals in Kristallstruktur voraus. Die erstmalige Kristallisierung eines K^+ -Kanals stellte einen großen Durchbruch dar. Sie gelang der Arbeitsgruppe McKinnon von der Rockefeller Universität in New York beim KcsA-Kanal des Bakteriums *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998). Inzwischen sind von derselben Gruppe zwei weitere Kanäle kristallisiert worden, nämlich der KirBac (Kuo et al., 2003) und ein bakterieller 6-Helix-Kanal (Jiang et al., 2003).

2.3.1. Aufbau des KcsA-Kanals

Die Aufnahmen erreichten zunächst ein Auflösungsvermögen von 3,2 Å (Doyle et al., 1998) und später von 2 Å (Zhou et al., 2001). Damit wurden sogar einzelne Ionen im Kanal und das Wasser sichtbar. Abbildung 2.3 zeigt den aus der Röntgenanalyse gewonnenen Aufbau des KcsA-Kanals.

A)



B)



Abbildung 2.3: Dreidimensionaler Aufbau des KcsA-Kanals aus *Streptomyces lividans*, A) Seitenansicht, B) Aufsicht, (Doyle et al., 1998).

Der Kanal besteht aus drei funktionellen Bereichen. An der Außenseite liegt der 1,2 nm lange Selektivitätsfilter. Dieser bestimmt die in den Kanal eintretenden Ionen bei Transportraten von 10^7 bis 10^8 Ionen/s hochselektiv. In der Mitte liegt ein Hohlraum von 1 nm Durchmesser. Die Verbindung zur Innenseite vermittelt die innere Pore. Der Hohlraum und die innere Pore sind mit hydrophoben Molekülen ausgekleidet, um Wechselwirkungen der Ionen mit der Wand zu vermeiden. Die beiden schräg stehenden Helizes stützen die Struktur ab.

Der KcsA-Kanals setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (Abbildung 2.3.B). Anders als bei den meisten K^+ -Kanälen besteht jede dieser Untereinheiten nicht aus sechs, sondern nur aus zwei Segmenten. Dies erleichterte die Kristallisation sowie die Interpretation der Röntgenstrahlbeugungsbilder. Diese Segmente durchziehen die Membran als alpha-Helizes. Lineare Aminosäuresequenzen (loops), die in der wässrigen Umgebung des Kanals oder in der Pore selbst liegen, verbinden die Helizes.

2.3.2. Selektionsmechanismus

Die Strukturuntersuchungen am KcsA-Kanal ermöglichten das Verständnis des Selektionsmechanismus. Von entscheidender Bedeutung sind die in das Kanalinnere hineinragenden Poren(P)-loops (Heginbotham et al., 1994). Diese enthalten eine hochkonservierte Aminosäuresequenz G-Y-G (Glycin-Tyrosin-Glycin). Die Carbonylgruppen dieser Aminosäuren sind sämtlich zum Kanalinneren gerichtet, so dass die Wand des Kanals mit doppelt gebundenen O-Gruppen ausgekleidet ist. Dies simuliert für das eintretende Ion die gleiche Umgebung, die im Wasser die Hydrathülle bildet. Mit dem Eintritt in den Kanal tauscht das Ion seine Hydrathülle gegen die Carbonylgruppenumgebung aus. Der energetische Unterschied ist so gering, dass das Ion nahezu ungehindert in den Kanal gelangt. Durch die hydrophobe Auskleidung des weiteren Kanals werden Wechselwirkungen des Ions mit dem Kanal vermieden. Das Ion kann den Kanal zügig durchqueren.

Da der Kanal wegen der schrägstehenden Helizes starr ist, funktioniert der Austausch der Hydrathülle gegen Carbonylgruppen nur dann, wenn der Ionenradius mit dem Radius des Kanals übereinstimmt. Andere Ionen werden mit großer Sicherheit abgewiesen. Dies erklärt die hohe Selektivität.

2.3.3. Maxi-K-Kanal

Die Messungen dieser Arbeit werden an Vesikeln der Grünalge *Chara corallina* durchgeführt. Da diese bisher noch nicht kloniert wurden, fehlt es an gesicherten Erkenntnissen der molekularen Struktur des Kanals. Aufgrund des ähnlichen Schaltverhaltens und vergleichbarer Einzelkanalströme geht man jedoch davon aus, dass es sich bei den K^+ -Kanälen von *Chara Corallina* um Maxi-K-Kanäle handelt (Tester, 1988; Moss und Magleby, 2001).

Da der P-loop für alle Kaliumkanäle nahezu identisch ist (Durell et al., 1998), lässt sich die Erklärung des Selektionsmechanismus vom KcsA-Kanal auf den Maxi-K-Kanal übertragen. In anderer Hinsicht unterscheiden sich KcsA- und Maxi-K-Kanal hingegen deutlich. Dies zeigt sich bereits darin, dass der Maxi-K-Kanal sechs anstatt nur zwei alpha-Helizes (Helizes S1-S6) je Untereinheit aufweist.

Im Gegensatz zum KcsA zeigt der Maxi-K-Kanal eine Spannungsabhängigkeit. Die S4-Helix enthält positiv geladene Arginin- und Lysinreste und wirkt als Spannungssensor. Während ältere Modelle davon ausgingen, dass sich die S4-Helix im elektrischen Feld innerhalb der Membran verschieben kann (Miller, 1991; Jan und Jan, 1992; Durell und Guy, 1992; Larsson et al., 1996; Yang et al., 1996), zeigen neuere Untersuchungen, dass auf diese Weise die Membranspannung energetisch nicht ausreichend genutzt wird. Durch Punktmutationen der vier Ladungen auf den S4-Helizes, durch die sie pH-empfindlich gemacht oder mit Farbstoff markiert wurden, konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine Drehbewegung zwischen zwei in das Protein reichenden Wasserspalten vorliegt (Bezanilla, 2000). Glauner et al. (1999) verfeinerten das Bild, indem sie auch eine axiale Komponente nachwiesen. Durch die spiralartige Bewegung der S4-Helix werden positive Ladungen auf die extrazelluläre Seite verlagert, wo sie mit fixen negativen Ladungen in anderen Segmenten wechselwirken. Dies führt zu Konformationsänderungen, die ein Öffnen und Schließen des Kanals bewirken.

Dieses bislang allgemein akzeptierte Bild wurde jüngst dadurch erschüttert, dass Jiang et al. (2003) aufgrund von Röntgenkristallstrukturanalysen zu dem Schluss kamen, die S4-Helizes bildeten „Paddel“, die sich außen am Kanalprotein drehen. Das „Paddel“-Modell stößt jedoch noch auf Skepsis.

Neben der Membranspannung (vgl. Catterall, 1992; Durrell und Guy, 1998; Hedrich et al., 1995; Keller et al., 1989; Pongs, 1992) beeinflussen auch Kooperativität (Öffnung benachbarter Kanäle, Draber et al., 1993), Aktivierung durch Botenstoffe (Assmann und Romano, 1998; Esser et al., 1997), Ionenkonzentration eines aktivierenden Ions (Blatt und Gradmann, 1997) oder stimulierende äußere Reize (z.B. Licht, Vanselow und Hansen, 1989) das Schaltverhalten der Kanäle.

3. Patch-Clamp-Messungen

Die Patch-Clamp-Technik ist ein Messverfahren, mit dem der Ionenstrom durch einzelne Kanäle direkt gemessen werden kann (Neher und Sakman, 1976; Numberger und Draguhn, 1996).

3.1. Verfahren

Bei Patch-Clamp-Messungen befindet sich die zu untersuchende Zelle in einer mit Salzlösung gefüllten Messkammer. Eine ebenfalls mit Salzlösung gefüllte Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von 1-5 μm wird unter dem Mikroskop an die Membran herangeführt. Ein leichter Unterdruck bewirkt, dass die Membran etwas in die Pipette hineingezogen wird (Abbildung 3.1).

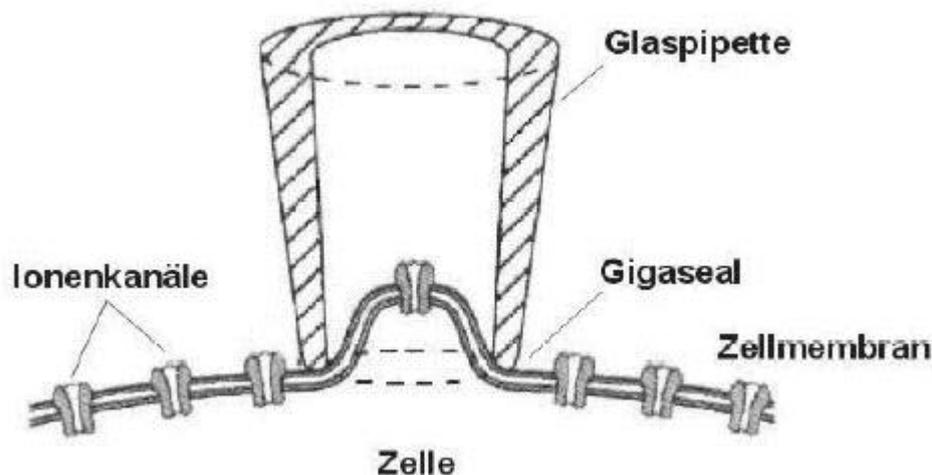


Abbildung 3.1: Prinzip der Patch-Clamp-Messungen.

Der von der Pipettenspitze eingeschlossene Teil der Membran wird Patch genannt. Entscheidend für die Qualität der Messung ist es, dass der Patch durch die Pipette elektrisch von der restlichen Membran isoliert wird. Durch einen bisher nicht in allen Einzelheiten geklärten Prozess, an dem jedoch Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Ca^+ -Brücken und Van-der-Waals-Kräfte beteiligt sind (Corey und Stevens, 1983; Ophasi und Webb, 1994), stellt sich zwischen Membran und Pipette eine sehr feste Verbindung ein. Der Abstand zwischen beiden beträgt weniger als 1 nm (Corey und Stevens, 1983) und der elektrische Widerstand mehrere Gigaohm. Kriechströme werden dadurch weitgehend verhindert. Man spricht von einem Gigaseal zwischen Pipette und Membran.

Die Verbindung zwischen Membran und Pipette ist so stabil, dass verschiedene Manipulationen des Patches möglich sind, ohne dass sich die Verbindung löst. Je nachdem, ob der Patch aus der übrigen Membran herausgerissen wird und ob der Patch innerhalb der

Pipettenspitze zerstört wird, ergeben sich vier verschiedene Konfigurationen von Patch-Clamp-Messungen (Abbildung 3.2).

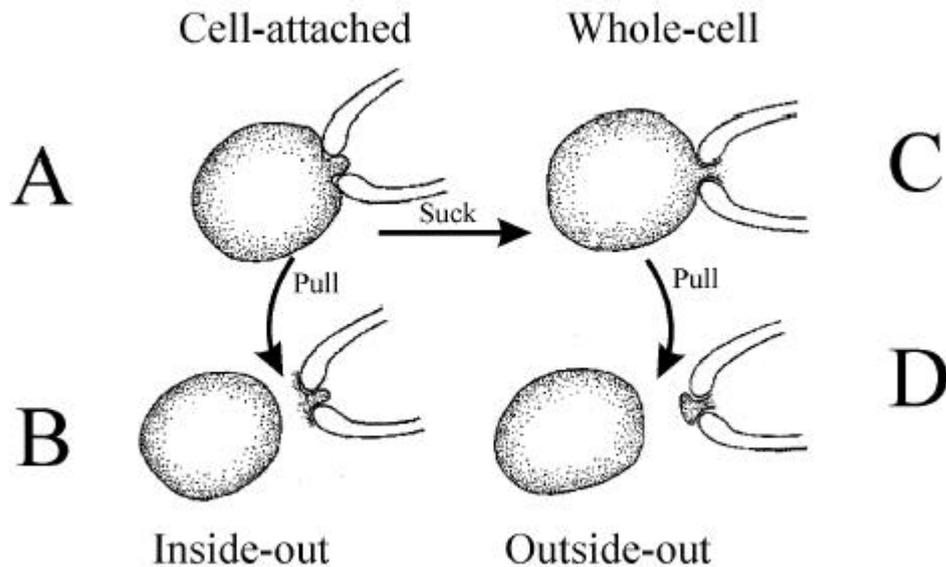


Abbildung 3.2: Vier Konfigurationen bei Patch-Clamp-Messungen (Hamill et al., 1981; Hille, 1992).

Nach der Bildung eines Giga-seals befindet man sich in der Cell-attached-Konfiguration (Abbildung 3.2.A). Der Vorteil besteht darin, dass innerhalb der Zelle physiologische Bedingungen herrschen. Allerdings hat man keine Möglichkeit, auf die Parameter der cytosolischen Membranseite Einfluss zu nehmen. So ist die Zusammensetzung der Lösung im Zellinneren genauso wie das Membranpotential unbekannt. Zudem kann die Eintauchtiefe nicht nachträglich verringert werden, wodurch es zu einem relativ hohen Rauschen kommt (Keunecke, 1995).

Durch Zerstören der Membran innerhalb des Patches gelangt man von der Cell-attached-Konfiguration in die Whole-Cell-Konfiguration (Abbildung 3.2.C). Dazu wird entweder ein starker Unterdruck in der Pipette erzeugt, oder es wird eine hochfrequente Wechsellspannung an die Membran angelegt. Durch den entstandenen Membrandurchgang breitet sich die Pipettenlösung in die Zelle aus und schafft dort einen definierten Zustand. In dieser Konfiguration misst man den Strom über die gesamte Zellmembran außerhalb des Patches.

Zieht man im Cell-attached-Zustand die Pipette ruckartig von der Zelle weg, reißt die Membran rund um die Pipettenspitze, und es bleibt nur noch der Patch dort haften. Da die ehemalige Innenseite der Membran nun die Außenseite der Messanordnung bildet, spricht man von einer Inside-Out-Konfiguration (Abbildung 3.2.B). Vorteilhaft sind das Vorliegen fest definierter Lösungen auf beiden Seiten und die direkte Bestimmbarkeit des Potentials. Die Inside-Out-Konfiguration dient der Untersuchung des Einzelkanalverhaltens. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen sind Inside-Out-Messungen.

Zuletzt ist es auch noch möglich, in der Whole-Cell-Konfiguration einen kräftigen Unterdruck anzulegen, um die Membran um die Pipettenspitze herum zu zerreißen (Outside-Out-Konfiguration, Abbildung 3.2.D). Dies ermöglicht es, unmittelbar im Anschluss an eine Whole-Cell-Messung Einzelkanaluntersuchungen vorzunehmen, ohne Bad- und Pipettenmedium zu ändern.

3.2. Versuchsaufbau

Die Schwierigkeit bei Patch-Clamp-Messungen besteht darin, die sehr kleinen, im pA-Bereich liegenden Ströme möglichst unverfälscht aufzunehmen. Dies erfordert einen erheblichen experimentellen Aufwand. Um zunächst die grundsätzliche Funktionsweise zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 3.3 die vereinfachte Darstellung eines Patch-Clamp-Aufbaus.

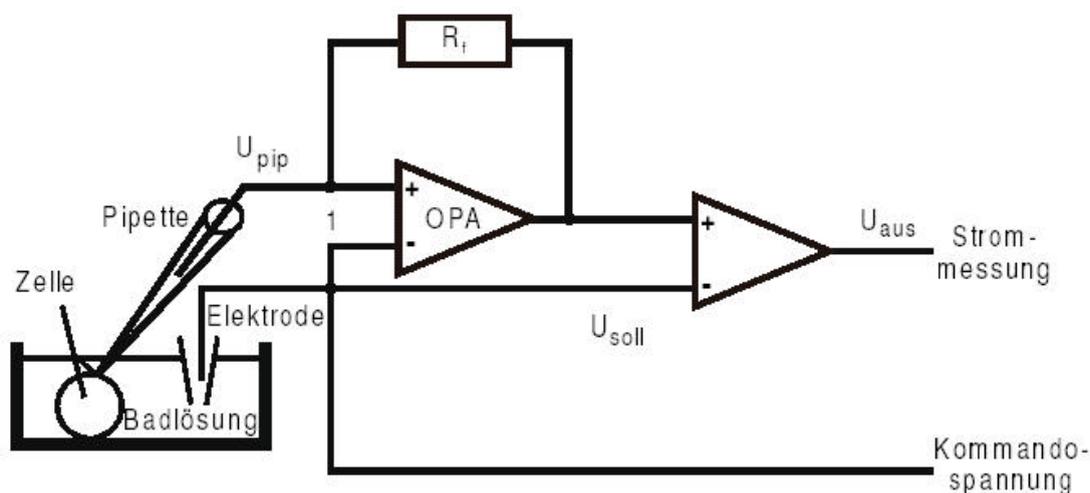


Abbildung 3.3: Vereinfachte Darstellung eines Patch-Clamp-Aufbaus.

Der Operationsverstärker (OPA) regelt über den Gegenkopplungswiderstand R_f den Spannungsunterschied zwischen U_{pip} und U_{soll} auf Null. Dazu wird die Abweichung von U_{pip} und U_{soll} extrem verstärkt, bis die Spannung U_f über R_f zu einem Strom von $I=U_f/R_f$ durch R_f führt. Da der Operationsverstärker einen sehr hochohmigen Eingang hat, ist dieser Strom I gleich dem Strom durch die Pipette. Damit liegt über der Membran die gewünschte Spannung U_{soll} an. Um die Spannung über R_f gegen Masse zu messen, wird U_{soll} mit Hilfe des zweiten Differenzverstärkers abgezogen.

Der für die Messungen dieser Arbeit verwendete Messaufbau (Abbildung 3.4) geht auf die Anlage von Albertsen (1992) zurück. Er wurde weiterentwickelt von Draber (1994), Blunck (1996), Sutter (1996) und Farokhi (2000).

Der Messaufbau ist so konzeptioniert, dass störende äußere Einflüsse so weit wie möglich eliminiert werden. Ein wesentlicher Störfaktor ist das öffentliche Stromnetz. Sein Einfluss wird dadurch reduziert, dass sich der gesamte mechanische Versuchsaufbau sowie Verstärker und Oszilloskop in einem Faradaykäfig befinden. Alle Geräte innerhalb des Käfigs werden mit Gleichstrom (± 15 V) betrieben. Die zugehörigen Netzgeräte stehen außerhalb des Käfigs. Alle Metallteile des Versuchsaufbaus sind sorgfältig geerdet. Alle stromführenden Leitungen, die von der Innen- zur Außenseite des Käfigs führen, sind abgeschirmt.

Weiterhin minimiert werden soll der Einfluss mechanischer Schwingungen in der Umgebung. Diese können beispielsweise durch Schritte oder durch Türeinschlagen entstehen. Dazu ist die gesamte Messeinrichtung mit Messkammer und Pipette auf einem luftgelagerten Tisch montiert. Niederfrequente Schwingungen werden zusätzlich dadurch gedämpft, dass eine sehr schwere Tischplatte aus Beton verwendet wird.

Die Messkammer mit den zu untersuchenden Zellen ist in den Objektstisch eines Mikroskops eingelassen. So kann von oben die Pipette herangeführt werden und gleichzeitig von unten mit dem Mikroskop die Position von Zelle und Pipette beobachtet werden. Der Objektstisch kann in der waagerechten Ebene bewegt werden, um die zu untersuchende Zelle genau über das fest installierte Mikroskop zu bringen. Mittels eines groben 3-D-Manipulators

und eines hydraulischen Mikromanipulators für die am Ende erforderliche Feineinstellung wird die Pipette an die Membran herangeführt.

Über einen Schlauchanschluss in der Pipettenhalterung wird der für die Sealbildung erforderliche Unterdruck angelegt.

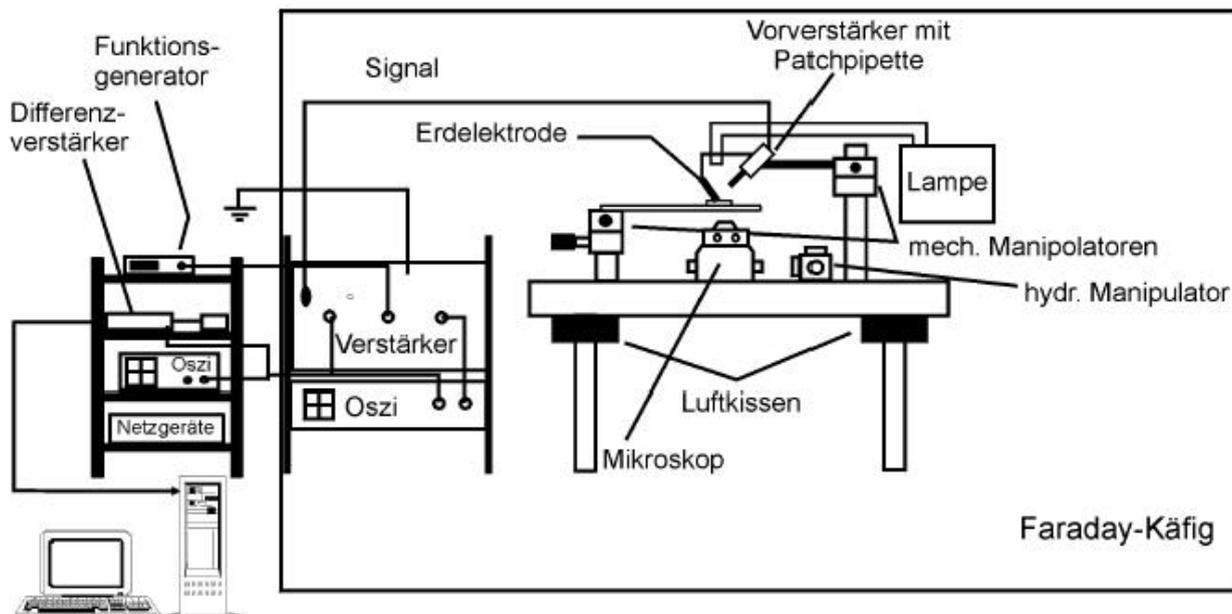


Abbildung 3.4: Aufbau des Messplatzes.

3.3. Aufnahmeelektronik

Um das Originalsignal möglichst unverfälscht zu erhalten, ist es erforderlich, Kontaktspannungen beim Übergang vom einen in das andere Medium zu verhindern. Als Erdelektrode wird deswegen eine nicht polarisierbare Ag/AgCl-Elektrode in Form eines chlorierten Silberdrahtes mit einer Agar-KNO₃-Brücke (250 mM KNO₃) verwendet. Die in die Pipettenlösung eingetauchte Messelektrode ist ebenfalls ein nicht polarisierbarer chlorierter Silberdraht.

Die Vorverstärkerstufe ist direkt auf den Pipettenhalter montiert. Dadurch wird der Weg des Originalsignals bis zur ersten Verstärkungsstufe kurz gehalten. Das Herz der Anlage ist ein integrierter Patch-Clamp-Verstärker (Dagan 3900A, Dagan Corporation, Minneapolis). Es handelt sich um einen als Strommesser geschalteten Operationsverstärker mit einer Bandbreite von 250 kHz. Anders als im in Abbildung 3.3 dargestellten Aufbau – dieser gilt für die EPC 7 (List, Darmstadt) – legt der Dagan die Sollspannung an die Badelektrode und hält die Pipettenspitze auf Null. Als Anti-Aliasing-Filter dient ein in den Verstärker integriertes Besselfilter vierter Ordnung.

Eine Besonderheit des Dagan-Verstärkers ist die Möglichkeit, anstelle des Rückkopplungswiderstandes einen Kondensator zu wählen. Der Kondensator verringert das Rauschen im Vergleich zum Widerstand. Nachteilhaft ist es, dass der Kondensator von Zeit zu Zeit entladen werden muss und dadurch Störsignale erzeugt.

Über einen Differenzverstärker, der Erdschleifen verhindert (Albertsen, 1992), gelangt das Signal in den A/D-Wandler. Dort wird es mit einer maximalen Abtastfrequenz von 250 kHz digitalisiert und anschließend gespeichert.

4. Auswertung von Patch-Clamp-Messungen

4.1. Markov-Modell

Die gesamte Arbeit basiert auf der allgemein anerkannten Annahme, dass sich das Schaltverhalten der Ionenkanäle als diskreter Markov-Prozess beschreiben lässt (Colquhoun und Hawkes, 1977, 1981, 1982, 1987, 1990; Korn und Horn, 1988; Ball und Sansom, 1988; Ball und Rice, 1992). Im diskreten Markov-Modell geht man davon aus, dass der Kanal sich in einer endlichen Zahl diskreter Offen- und Geschlossen-Zustände aufhalten kann.

Eine weitere Eigenschaft des Markov-Prozesses besteht darin, dass die Übergangswahrscheinlichkeiten k_{ij} zwischen den unterschiedlichen Zuständen i und j konstant sind. So ist die Übergangswahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt t_n unabhängig davon, in welchem Zustand sich der Kanal zum Zeitpunkt t_{n-1} befand. Ebenso ist die Übergangswahrscheinlichkeit nicht abhängig von der Besetzungswahrscheinlichkeit der verschiedenen Zustände.

Diese einschränkenden Voraussetzungen führen zu einer einfachen mathematischen Behandlung von Markov-Modellen. Das Zeitverhalten des Markov-Prozesses wird vollständig durch ein System von Differentialgleichungen erster Ordnung beschrieben:

$$\frac{dq(t)}{dt} = K * q(t) \quad (4.1)$$

Der Vektor $q(t)$ enthält die Besetzungswahrscheinlichkeiten $q_i(t)$ der verschiedenen Zustände i , die Matrix K setzt sich zusammen aus den Übergangsraten k_{ij} vom Zustand i in den Zustand j . Diese Differentialgleichung wird gelöst durch:

$$q(t) = q(0) * \exp(K * t) \quad (4.2)$$

Die Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Systems auf dem Offen- bzw. Geschlossen-Niveau kann durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben werden (Colquhoun und Hawkes, 1977; Blunck et al., 1998). Wird für die Beschreibung eines einzelnen Niveaus mehr als eine Zeitkonstante benötigt, existieren dort mehrere voneinander unabhängige Zustände. Man spricht dann von einem Hidden-Markov-Modell (oder auch Aggregated Markov-Modell; Chung et al., 1990, 1991, 1998; Klein et al., 1997; Yeo et al., 1988; Fredkin und Rice, 1992).

Ziel der Auswertung von Patch-Clamp-Messungen ist es, möglichst viele Informationen über das der Zeitreihe zu Grunde liegende Markov-Modell zu erhalten. Interessant sind z.B. Anzahl der Kanäle, Anzahl der Zustände pro Kanal, Stromniveaus der verschiedenen

Zustände, Art des Rauschens und Signal-Rausch-Verhältnis. Dieses Kapitel bietet einen Überblick über die bisher benutzten Auswerteverfahren. Insbesondere werden die Funktionsweisen des Direkten Zeitreihenfits und des Betafits für Filter erster Ordnung von Rießner (1998) erklärt, die die Basis für die vorliegende Arbeit darstellen.

4.2. Die gemessene Zeitreihe

Abbildung 4.1 zeigt den Ausschnitt einer Patch-Clamp-Messung am K^+ -Kanal des Plasmatotrofens von *Chara*.

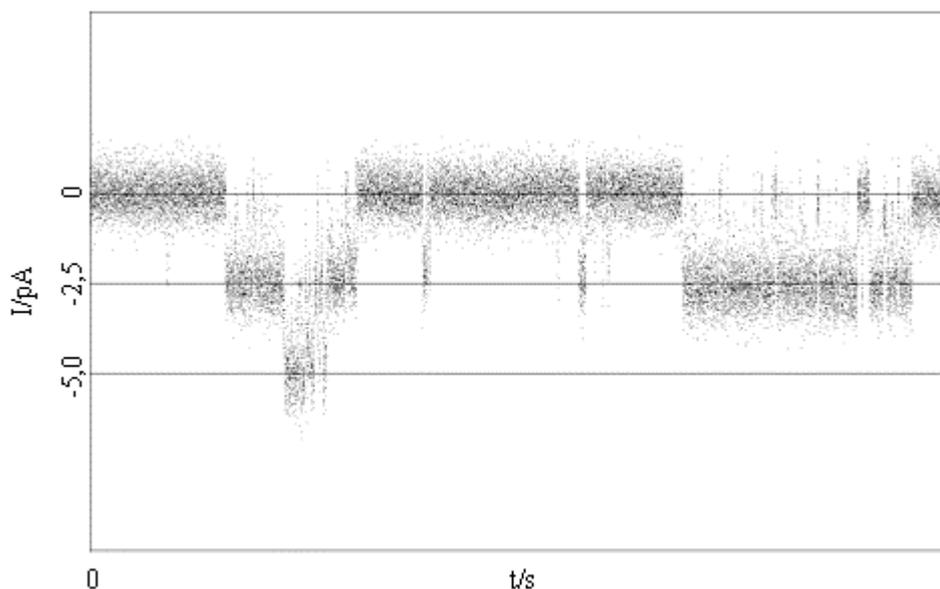


Abbildung 4.1: Ausschnitt aus der Zeitreihe des K^+ -Kanals von *Chara*, Abtastrate 100 kHz, Abknickfrequenz des Tiefpassfilters 20 kHz, Membranspannung -40 mV. Die Badlösung enthält 115 mM KNO_3 , 20 mM $TiNO_3$, 5 mM $Ca(NO_3)_2$, die Pipettenlösung 10 mM KNO_3 , 115 mM $TiNO_3$, 5 mM $Ca(NO_3)_2$.

Der Darstellung der Zeitreihe können die folgenden für die Analyse wichtigen Aussagen sofort entnommen werden:

1. Der Strom springt zwischen diskreten Niveaus hin und her.
2. Die Daten sind mit starkem Rauschen überlagert.
3. Die Schaltvorgänge sind zum Teil sehr schnell.

Nicht ohne weiteres kann hingegen festgestellt werden, ob zu jedem Stromniveau genau ein Zustand des Kanals gehört oder ob mehrere Zustände einem Niveau zuzuordnen sind (Hidden/ Aggregated Markov-Modell). Insbesondere ist auch nicht zu erkennen, mit welchen Übergangsraten zwischen den Zuständen gewechselt wird.

4.3. Das Amplitudenhistogramm

Die erste Information, die aus einer Messreihe wie in Abbildung 4.1 gewonnen wird, ist das Amplitudenhistogramm. Das Amplitudenhistogramm enthält die Information, welche Stromwerte wie oft auftreten. Dazu zählt ein Programm, wie viele Messwerte im Zeitintervall Δt im Bereich I bis $I+\Delta I$ liegen, und trägt diese Zahl N über I auf. Bei nicht allzu stark verrauschten Daten ergibt sich eine mehrgipflige Verteilung. Die Abszissenwerte der Maxima dieser Verteilungen werden als die Niveaus der unverrauschten Zeitreihe angesehen.

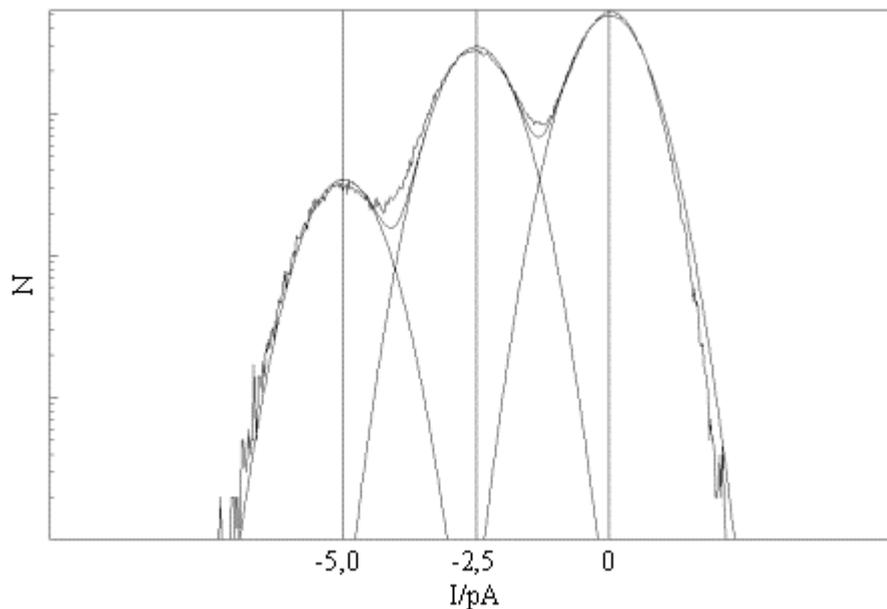


Abbildung 4.2: Amplitudenhistogramm der Zeitreihe aus Abbildung 4.1 durch Gaußverteilungen angenähert; Nominalniveaus: $I_c=0$ pA, $I_{o1}=-2,5$ pA, $I_{o2}=-5,0$ pA, $s_{\text{Rausch}}=1,8$ pA.

Die nominellen Ströme der Zustände des Markov-Prozesses sind durch die senkrechten Linien gekennzeichnet. Ist die Messreihe mit gaußverteilterm Rauschen überlagert, kann das Amplitudenhistogramm $f_{\text{ges}}(I)$ durch eine Summe von Gaußfunktionen angenähert werden, deren Maxima gleich den Nominalniveaus sind.

$$f_{\text{ges}}(I) = \sum_k N_k \exp\left(-\frac{(I - I_k)^2}{2s_k^2}\right) \quad (4.3)$$

Die I_k sind die nominellen Ströme, die σ_k die zugehörigen Standardabweichungen des Rauschens, die N_k Normierungsfaktoren.

4.4. Rekonstruktion der originalen unverrauschten Zeitreihe

Bevor man versucht, die unverrauschte Zeitreihe wiederzugewinnen, also das Rauschen der Messapparatur zu eliminieren, muss man sich darüber im Klaren sein, wie viel Rauschen im Kanal selbst erzeugt wird.

Als einzige Rauschquelle des Stroms durch das Transportmolekül wird Poisson-Rauschen angenommen (Schottky, 1918, 1922; Läuger, 1980). Ein Kanal von 3,2 pA Leitfähigkeit lässt bei 10 μ s Öffnungszeit 200 Ionen hindurch. Der Effektivwert des Rauschens bei Annahme einer Poisson-Verteilung berechnet sich dann als Quadratwurzel der durchgelassenen Ionen zu 14 Ionen und ist damit gegenüber dem Rauschen der Messapparatur vernachlässigbar. Der Strom durch das Transportprotein wird deswegen ab jetzt als unverrauscht vorausgesetzt.

Um aus der verrauschten Zeitreihe die Originalreihe zu gewinnen, muss ein Detektor eingesetzt werden, der erkennt, wann das Transportmolekül schaltet, also zu welchen Zeitpunkten Sprünge in der Zeitreihe vorkommen. Ein Ausschnitt der mit solch einem Sprungdetektor rekonstruierten Originalzeitreihe ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

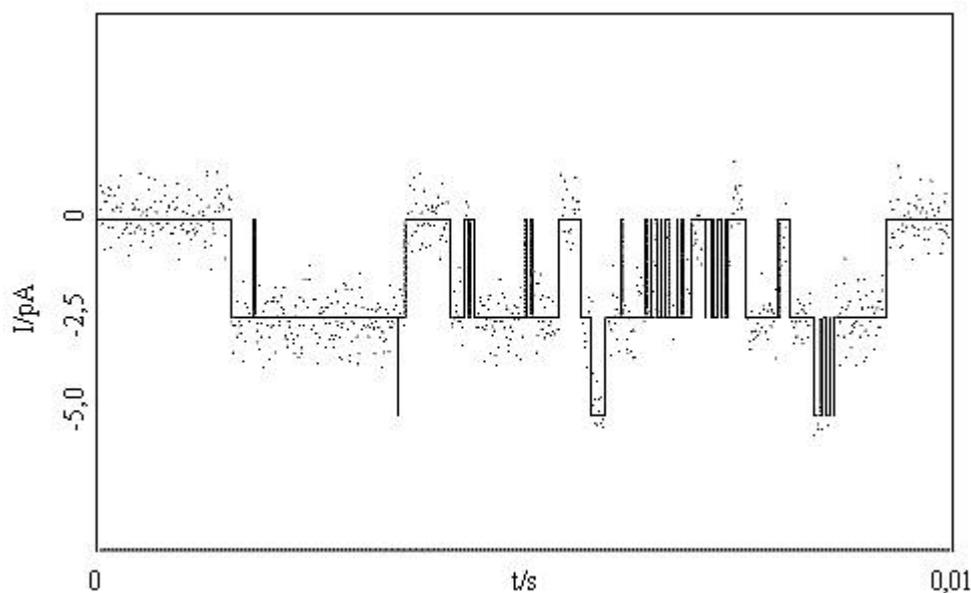


Abbildung 4.3: Ausschnitt des mit einem Hinkley-Detektor rekonstruierten Originalverlaufs der Zeitreihe aus Abbildung 4.1.

Derartige Sprungdetektoren haben immer einen eingebauten Integrator. Das kann ein Tiefpassfilter sein, das für den nachfolgenden Schwellenwertschalter das Rauschen glättet, oder ein Summationsprozess, wie in dem von Schultze und Draber (1993) eingeführten Hinkley-Detektor.

Dieser Integrator verhindert aber die Detektion schneller Prozesse. Er führt zu so genannten missed events, also zu Schaltereignissen, die nicht erkannt werden. Hierfür gibt es retrospektive Missed-Events-Korrekturen (Crouzy und Sigworth, 1990; Draber und Schultze, 1994) und auch solche, die direkt in den Fitalgorithmus eingebaut werden (Survivor-Funktionen: Ball und Sansom, 1989; Hawkes et al., 1990; Colquhoun et al., 1996).

Untersuchungen von Farokhi et al. (2000) ergeben allerdings geringe Erfolgsaussichten für diese mathematisch sehr aufwändigen Verfahren. Bei der unten beschriebenen Dwell-Time-Analyse, deren Zeitauflösung vom benutzten Detektor abhängt, hat sich nämlich eine horizontale Abhängigkeit der Fitergebnisse von den in der Simulation benutzten Übergangsraten ergeben. Aus einer horizontalen Linie lassen sich jedoch selbst mit kompliziertesten Korrekturverfahren keine Rückschlüsse auf die Abszissenwerte ziehen.

4.5. Die Dwell-Time-Analyse

In einem Dwell-Time-Histogramm (Verweildauerhistogramm) ist die Information enthalten, wie oft das System für bestimmte Zeitintervalle in einem Zustand bleibt, ohne dass ein Sprung stattfindet. Das Histogramm entsteht, indem in einer rekonstruierten Zeitreihe wie in Abbildung 4.3 abgezählt wird, wie häufig der Strom für eine Verweildauer zwischen τ und $\tau+\Delta\tau$ auf dem Stromniveau n verweilt. Diese Zahl N wird über τ aufgetragen.

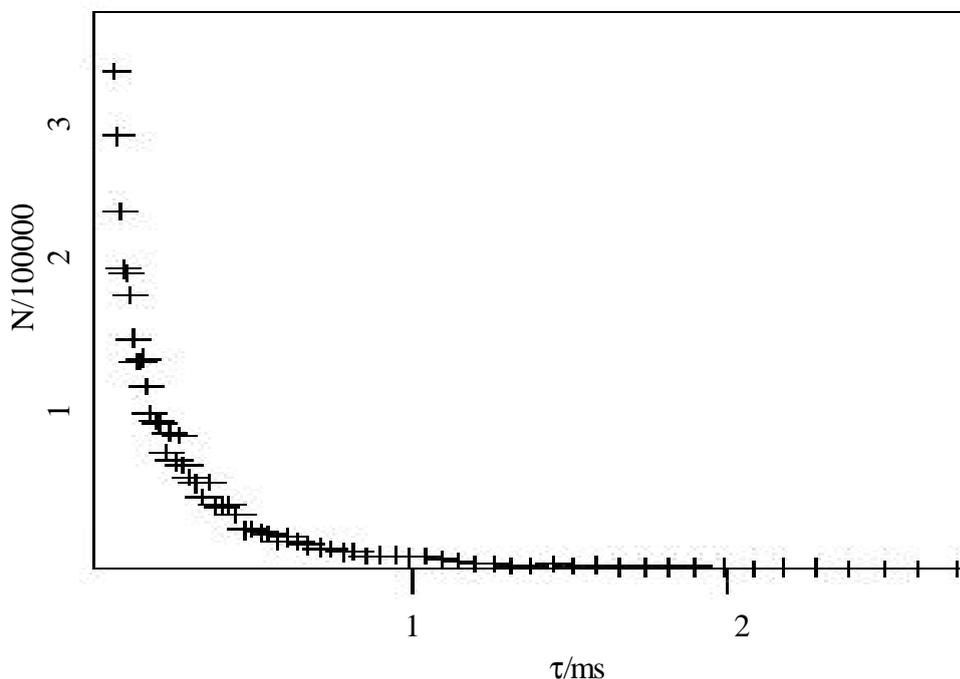


Abbildung 4.4: Dwell-Time-Histogramm des Offen-Niveaus der Zeitreihe aus Abbildung 4.1.

Das Histogramm kann mit einer Summe von Exponentialfunktionen angenähert werden. Hat beispielsweise ein Kanal L Offen-Zustände, ist das zugehörige Dwell-Time-Histogramm der Offen-Zustände gegeben durch:

$$y_{\text{offen}} = \sum_{i=1}^L a_i e^{-i t} \quad (4.4)$$

Es gibt zwei Möglichkeiten, aus den Dwell-Time-Histogrammen Rückschlüsse auf die Übergangsraten des Markov-Modells zu ziehen. Der Zeitkonstantenfit nach Gleichung 4.4 nähert durch Variation der Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen das theoretische Dwell-Time-Histogramm an das gemessene an. Nachdem der Fit die beste Übereinstimmung zwischen gemessenem und theoretischem Histogramm gefunden hat, werden die Übergangsraten des Markov-Modells aus den Zeitkonstanten berechnet. Der Zusammenhang zwischen Zeitkonstanten und Übergangsraten ist aber teilweise sehr kompliziert (Jackson, 1997).

Der Target-Fit hingegen variiert direkt die Übergangsraten. Indem aus den Übergangsraten die Zeitkonstanten berechnet werden, kann auch hier die Abweichung zwischen gemessenem und theoretischem Dwell-Time-Histogramm minimiert werden. Im allgemeinen sind die Ergebnisse des Target-Fits (Blunck et al., 1998) besser als die des Zeitkonstantenfits (Albertsen, 1992).

Die Minimierung der Abweichung kann in beiden Fällen entweder nach der Methode der kleinsten Quadrate oder durch einen Maximum-Likelihood-Fit durchgeführt werden, wobei keine generelle Aussage möglich ist, welches Gütekriterium besser ist (Kukulenz, 1997).

4.6. Der Direkte Zeitreihenfit

Dieses Verfahren wurde zuerst von Fredkin und Rice (1992) in die Patch-Clamp-Analyse eingeführt. Albertsen und Hansen (1994) erweiterten es für die Mehrkanalanalyse.

Bevor der unten zu besprechende Direkte Zeitreihenfit angewendet werden kann, werden einige Eingangsinformationen benötigt, die mit den oben dargestellten Verfahren gewonnen werden müssen. Diese sind in der folgenden Abbildung links dargestellt.

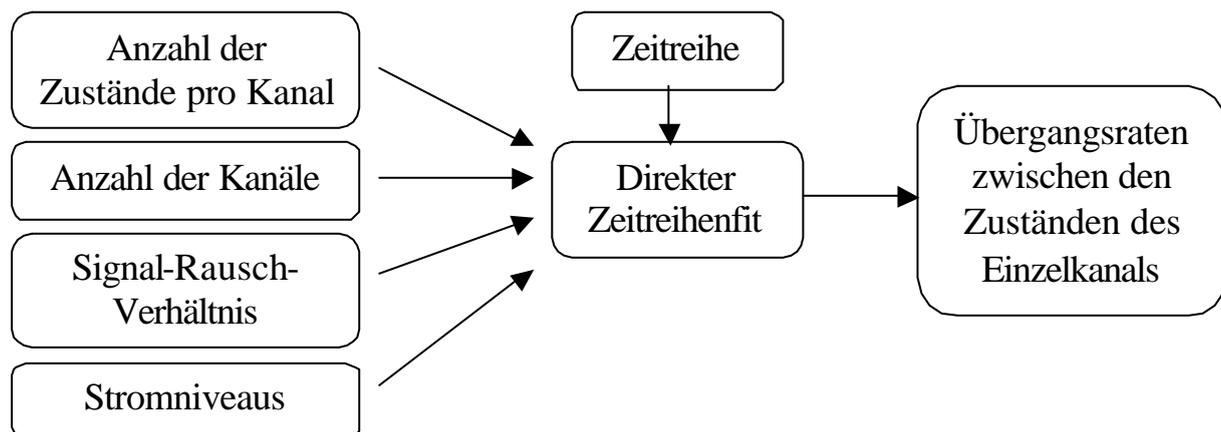


Abbildung 4.5: Für den Direkten Zeitreihenfit erforderliche A-priori-Informationen.

Anzahl der Kanäle, Stromniveau und Signal-Rausch-Verhältnis können dem in Kapitel 4.3 eingeführten Amplitudenhistogramm entnommen werden. Die Anzahl der Zustände gewinnt man mit Hilfe eines Dwell-Time-Fits aus dem in Kapitel 4.5 vorgestellten Dwell-Time-Histogramm.

Die grundsätzliche Idee, die hinter dem Algorithmus steckt, wird durch die folgende Ein-Schritt-Schätzgleichung (forward-probability; Huang et al., 1990) beschrieben.

$$a_k(i) = \sum_{j=1}^L a_{k-1}(j) p_{ji} f_i(y_k) \quad (4.5)$$

Die $a_{k-1}(j)$ geben die (rekursiv berechnete) Wahrscheinlichkeit an, das Modell zum Zeitpunkt $(k-1)\Delta t$ im Zustand j zu finden. Durch die Übergangswahrscheinlichkeiten p_{ji} wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, dass das System im Zeitintervall zwischen $(k-1)\Delta t$ und $k\Delta t$ vom Zustand j in den Zustand i wechselt. Die Wahrscheinlichkeit $a_k(i)$, das System zum Zeitpunkt k im Zustand i zu finden, ist gleich der Summe der Wahrscheinlichkeiten, dass von einem Zustand j in den Zustand i gewechselt wurde.

Der Vergleich zwischen gemessenem und vorhergesagtem Datenwert wird durch die Multiplikation mit $f_i(y_k)$ realisiert. Die $f_i(y_k)$ stehen für die Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Strom y_k zum Zustand i gehört. Um die Verteilungen $f_i(y)$ zu erhalten, wird das Amplitudenhistogramm $f(y)$ (Abbildung 4.2) in Einzelhistogramme aufgespalten:

$$f(y) = \sum_i f_i(y) \quad (4.6)$$

Für die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit muss jede der Verteilungen f_i auf 1 normiert werden. $f_i(y_k)$ ist dann die Ordinate des Stromwerts y_k im i -ten Histogramm.

Enthält das Markov-Modell mehrere Zustände gleicher Leitfähigkeit (Hidden- oder Aggregated-Markov-Modell), muss nicht jede einzelne Verteilung auf 1 normiert werden, sondern die Summe der Einzelverteilungen, die auf diesem Niveau liegen. Formal heißt das:

$$m_j \sum_{y=0}^{y_{\max}} f_j(y) = 1 \quad (j = 1 \dots N) \quad (4.7)$$

wobei die m_j jeweils die Anzahl der Zustände gleicher Leitfähigkeit und N die Anzahl der verschiedenen Niveaus angeben.

Das Produkt $a_{k-1}(j) p_{ji} f_i(y_k)$ nimmt maximale Werte an, wenn der vorhergesagte Zustand der ist, der zu dem Einzelhistogramm $f_i(y)$ gehört, das für das gemessene y_k den größten Wert annimmt. Das tritt ein, wenn der Strom des vorhergesagten Zustandes am besten mit dem gemessenen Strom übereinstimmt.

Diese Schätzung nach Gleichung 4.5 wird für jeden Zeitpunkt k der Zeitreihe durchgeführt. Aus allen Schätzungen wird die Likelihood L berechnet.

$$L = \prod_k \sum_i a_k(i) \quad (4.8)$$

Beim Fit eines neuen Datensatzes sind die Anfangsverteilung der Zustände, also die $a_0(i)$, sowie die Übergangswahrscheinlichkeiten p_{ji} unbekannt.

Die beste Schätzung für die $a_0(i)$ sind die Steady-State-Werte, die sich als Integral über die aus dem Amplitudenhistogramm gewonnen Einzelverteilungen $f_i(y_k)$ ergeben. Auf die Wahl der $a_0(i)$ wird hier kein besonderes Augenmerk gelegt, da ihr Einfluss auf die Likelihood bei langen Zeitreihen gering ist (Chung et al., 1991).

Die p_{ji} werden mit Hilfe eines Fitalgorithmus variiert, bis die Likelihood L in Gleichung 4.8 einen Maximalwert annimmt (Maximum-Likelihood-Verfahren). Diese Maximierung ist

sehr zeitaufwendig und führte bei den Analysen von Farokhi et al. (2000) zu Rechenzeiten von drei Tagen für eine Messreihe von 20 s.

Das Ziel der Kanalstrom-Analyse sind aber nicht die in Gleichung 4.5 angegebenen p_i , die sich auf endliche Abtastraten beziehen, sondern die k_{ji} , die die Übergangsraten in infinitesimal kurzer Zeit beschreiben. Nur die k_{ji} haben nämlich eine vom Messverfahren unabhängige Bedeutung und erlauben die Einführung physikalischer Nebenbedingungen.

Die Matrix P der p_{ji} erhält man aus der Matrix K der k_{ji} durch Lösen der Kolmogorov-Gleichung:

$$\frac{d}{dt}P(K, \Delta t) = K * P(K, \Delta t) \quad (4.9)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung ist gegeben durch (Albertsen, 1994):

$$P(K, \Delta t) = \exp(K \Delta t) \quad (4.10)$$

Durchgeführt wird diese mehrdimensionale Maximierungsaufgabe mit Hilfe des Downhill-Simplex-Algorithmus (Press et al., 1987). Da auch mit modernen PCs die Rechenzeit, die die Fitalgorithmen benötigen, nicht zu vernachlässigen ist, ist es ein wichtiger Vorteil des Direkten Zeitreihenfits, dass die Zahl der benötigten Rechenschritte nur linear mit der Anzahl der Datenpunkte steigt. Diese Eigenschaft wird dadurch erreicht, dass im Prädiktionsschritt (Gleichung 4.5) jeweils nur auf den unmittelbar vorhergehenden Zeitpunkt Bezug genommen wird.

Damit ist die Behandlung des Kanalschaltens als Markov-Prozess eine wesentliche Voraussetzung.

4.7. Betafit für Filter erster Ordnung

Für Zeitreihen, die mit Filtern erster Ordnung gefiltert wurden, existiert in der Arbeitsgruppe darüber hinaus ein Betafit. Dieser erfordert die gleichen Eingangsinformationen wie der Direkte Zeitreihenfit, anstatt der Zeitreihe wird jedoch das Amplitudenhistogramm angefitet.

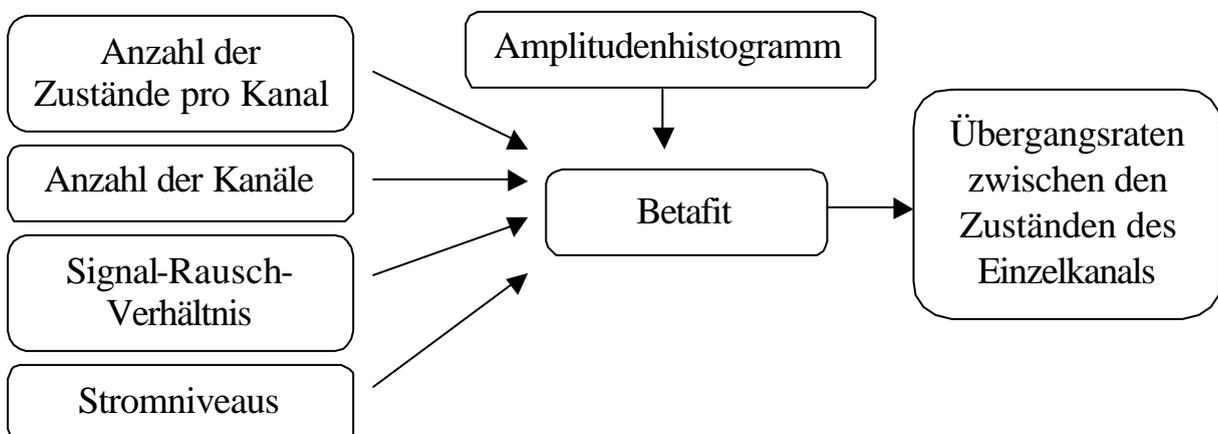


Abbildung 4.6: Für den Betafit erforderliche A-priori-Informationen.

Durch Variation der Übergangsraten wird die mittels eines χ^2 -Tests bestimmte Abweichung zwischen gemessenem und berechnetem Amplitudenhistogramm minimiert. Für die Minimierung wird auch hier der mehrdimensionale Downhill-Simplex-Algorithmus (Press et al., 1987) verwendet.

Zur Berechnung der Amplitudenhistogramme dient die Theorie der Betaverteilungen. Mit dieser ursprünglich für die Behandlung von Telegrafensignalen (Pawula, 1970) entwickelten Theorie berechnete FitzHugh (1983) die Auswirkungen schnellen Schaltens auf das Amplitudenhistogramm eines Ein-Kanal-C/O-Modells. Rießner (1994, 1998) entwickelte die Theorie der erweiterten Betaverteilungen, die die Berechnung des Amplitudenhistogramms allgemeiner Mehrzustands- und Mehrkanalmodelle ermöglicht. Die Rießnersche Theorie der Betaverteilungen ist allerdings beschränkt auf Signale, die mit einem Filter erster Ordnung gefiltert sind.

Zur Berechnung der Betaverteilung werden sowohl der Kanal als auch das Filter als Markov-Prozess betrachtet. Für jeden Übergang vom Zustand i in den Zustand j , der im Kanal möglich ist, wird dann eine eigene Dichtefunktion $f_{ij}(I)$ für den Stromwert I am Ausgang des Filters berechnet. Die Dichtefunktion des Zustands j ergibt sich als Summe der Dichtefunktionen der einzelnen Übergänge nach j über alle vorherigen Zustände.

$$f_j(I) = \sum_i f_{ij}(I) \quad (4.11)$$

Um die absolute Wahrscheinlichkeit zu finden, einen bestimmten Stromwert I am Filterausgang zu messen, muss die Dichtefunktion f_j mit der Besetzungswahrscheinlichkeit q_j des Zustandes j multipliziert werden. Berechnet wird die Dichtefunktion $q_j f_j(I)$ des Zustandes j nach folgender Differentialgleichung:

$$q_j f'_j(I) = \frac{(u_{jj} - 1) * q_j f_j(I) - \sum_{i \neq j} u_{ij} * q_i f_i(I)}{I - I_j} \quad (4.12)$$

I_j ist das Stromniveau des Zustandes j . Die u_{ij} sind das Produkt der Übergangsraten k_{ij} vom Zustand i in den Zustand j mit der Zeitkonstante τ des Filters.

$$u_{ij} = k_{ij} * \tau \quad (4.13)$$

Das Lösen der Differentialgleichung 4.12 für alle Zustände j liefert alle Einzelverteilungen des Amplitudenhistogramms. Eine Erweiterung dieser Theorie auf Filter höherer Ordnung ist nicht ohne weiteres möglich, weil sich nur Filter erster Ordnung einfach als Markov-Prozess darstellen lassen.

In der vorliegenden Arbeit wird aus diesem Grund davon Abstand genommen, die Amplitudenhistogramme zu berechnen und stattdessen zu einer Bestimmung durch Simulation übergegangen.

5. Testmethoden

Ein Großteil der weiteren Arbeit beschäftigt sich damit, die Leistungsfähigkeit vorhandener und neu eingeführter Fitverfahren zu untersuchen. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wird die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Verfahren in einer einheitlichen Prozedur untersucht. Im folgenden werden die verschiedenen Tests vorgestellt, denen die Verfahren unterzogen werden.

Von besonderem Interesse sind die Fragen nach dem Zeitauflösungsvermögen (Reichweite) der Verfahren sowie nach der Abhängigkeit von der Stärke des Rauschens. Um mit einem vertretbaren Zeitaufwand zu Ergebnissen zu gelangen, werden die ersten Tests eines neuen Verfahrens am Ein-Kanal-C/O-Modell durchgeführt. Liefert das Verfahren bei diesem einfachen Modell zufriedenstellende Ergebnisse, wird in einem nächsten Schritt die Leistungsfähigkeit beim Fünf-Zustands-Modell überprüft. Diese ist für die Arbeitsgruppe von besonderem Interesse, weil dem K^+ -Kanal von *Chara*, einem zentralen Objekt der hier vorgenommenen Patch-Clamp-Messungen, ein Fünf-Zustands-Modell zu Grunde liegt (Farokhi et al., 2000).

5.1. Simulation von Patch-Clamp-Zeitreihen

Um Zeitreihen fitten zu können, ist zunächst ein Programm erforderlich, das die Zeitreihen erstellt. In der Arbeitsgruppe ist ein Simulationsprogramm vorhanden, das auch Zeitreihen eines Kanals mit schnellen Übergangsraten zeitkontinuierlich erzeugen kann (Rießner, 1994; Blunck et al., 1998). Es erlaubt nicht nur Sprünge zu den Abtastzeitpunkten, sondern auch beliebig häufige Zustandswechsel zwischen zwei Messpunkten. Es wird also ein abgetasteter, aber kontinuierlicher Markov-Prozess simuliert.

Die simulierten Zeitreihen werden folgendermaßen erzeugt. Per Zufallsgenerator wird ein Zustand bestimmt, in dem das System startet. Dann werden zwei weitere zwischen 0 und 1 gleichverteilte Zufallszahlen n_1 und n_2 benötigt. Aus der ersten wird die Länge des Aufenthalts t in dem Anfangszustand bestimmt. Die Verteilung $y_r(t)$ der Aufenthaltslängen (dwell-time distribution) eines Zustandes R_r ist gegeben durch:

$$y_r(t) = e^{-k_{rr}t} \quad \text{mit} \quad -k_{rr} = \sum_{s \neq r} k_{rs} \quad (5.1)$$

Die k_{rs} stehen für die Übergangsraten vom Zustand R_r in alle möglichen Zustände R_s .

Für die Bestimmung der Aufenthaltslänge t wird in Gleichung 5.1 $y_r(t)$ gleich der Zufallszahl n_1 gesetzt und die Gleichung nach t aufgelöst.

Aus der zweiten Zufallszahl wird der Zielzustand des nächsten Sprungs bestimmt. Dazu wird das Intervall $[0;1]$ in Abschnitte der Länge k_{rs}/k_{rr} unterteilt. Als Zielzustand R_s wird derjenige ausgewählt, in dessen Abschnitt die Zufallszahl n_2 fällt. Nach dem Sprung startet der Algorithmus von neuem mit der Erzeugung zweier Zufallszahlen.

Die Antwort des Filters, die separat gespeichert ist, folgt auf jeden Sprung. Die Abfolge von Sprüngen, die mit dem Zufallsgenerator erzeugt wurde, führt also zu einer Summe von zeitlich verzögerten Sprungantworten des Filters. Die Antworten der einzelnen Sprünge werden so lange in der Summe berücksichtigt, bis sie auf einen Wert abgeklungen sind, der kleiner ist als 1 Bit des D/A-Wandlers.

Gegenüber einem alternativen Algorithmus, der zu jedem Zeitpunkt entscheidet, ob und wohin ein Sprung stattfindet, wird so eine deutliche Verminderung der benötigten Rechenzeit erreicht.

Im Programm besteht die Möglichkeit, das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, signal-to-noise-ratio) frei zu wählen. Definiert ist das SNR als Quadrat des Verhältnisses der Stromstärke eines Kanals im Offen-Zustand I_o zum Effektivwert des Rauschens σ .

$$SNR = \left(\frac{I_o}{\sigma} \right)^2 \quad (5.2)$$

Das Rauschen wird einmal von einem zusätzlichen Programm, mit dem es auch beliebig gefiltert werden kann, erzeugt und in einer separaten Datei gespeichert. Es wird dann vom Simulationsprogramm eingelesen und der frisch erzeugten Zeitreihe mit dem gewählten SNR überlagert.

Ist die gewünschte Anzahl von Datenpunkten berechnet, wird die gesamte Zeitreihe in einem binären File abgelegt, dessen Format genau demjenigen entspricht, das in der Arbeitsgruppe zur Speicherung gemessener Daten verwendet wird.

5.2. Reichweitentest

Im Mittelpunkt steht zunächst die Frage, wie gut das Zeitaufklärungsvermögen eines Fitverfahrens ist, wie groß also die Übergangsraten zwischen den verschiedenen Zuständen des Markov-Modells sein dürfen, damit sie vom Fitverfahren noch richtig erkannt werden. Um das festzustellen, wird der Reichweitentest durchgeführt. Bei ihm werden nur die Übergangsraten verändert und alle übrigen Parameter konstant gehalten. Gefittet werden die in Abbildung 5.1 dargestellten Ein-Kanal-C/O-Modelle.

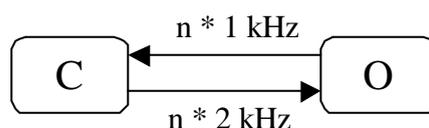


Abbildung 5.1: Ein-Kanal-C/O-Modelle des Reichweitentests ($n=1\dots 250$).

Die Übergangsraten werden in 250 Schritten von 1 kHz/ 2 kHz auf 250 kHz/ 500 kHz erhöht. Bei jedem Durchlauf des Reichweitentests werden also 250 Zeitreihen ausgewertet. Die Zeitreihen bestehen aus 1 Million Punkten, die Abtastrate liegt bei 200 kHz, die Abknickfrequenz des Besselfilters bei 50 kHz.

Um die Reichweite unabhängig von den teilweise bei schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis auftretenden Schwierigkeiten bestimmen zu können, wird bei allen Zeitreihen ein SNR von 10 gewählt.

5.3. Rauschabhängigkeitstest

Es ist bei Patch-Clamp-Messungen ein wesentliches Bestreben, das Hintergrundrauschen so weit zu reduzieren, dass nicht die kleinen Änderungen im Kanalstrom völlig von ihm

überlagert werden (Keunecke, 1995). Dennoch bleibt immer ein unvermeidbares Restrauschen. Vor diesem Hintergrund ist es von Interesse, dass die Auswerteprogramme trotz schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses die richtigen Ergebnisse liefern. Deswegen wird mit allen Verfahren der im folgenden beschriebene Rauschabhängigkeitstest durchgeführt, der Aussagen darüber liefern soll, wie schlecht das Signal-Rausch-Verhältnis werden darf, bevor die Konvergenz des Fitalgorithmus sich verschlechtert.

Für diesen Test werden die beiden in der folgenden Abbildung dargestellten Ein-Kanal-C/O-Modelle verwendet, die eine Besetzungswahrscheinlichkeit der beiden Zustände von 1:2 haben.

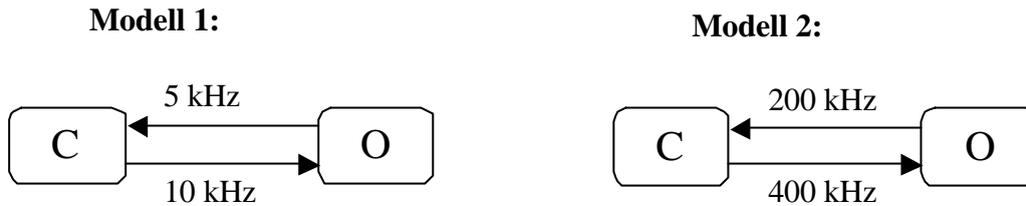


Abbildung 5.2: Ein-Kanal-C/O-Modelle des Rauschabhängigkeitstests.

Von jedem der Modelle werden 170 Zeitreihen gefittet, wobei jede dieser Zeitreihen mit einem anderen Signal-Rausch-Verhältnis erzeugt wird. Dazu wird bei einem konstanten Abstand zwischen den beiden Nominalniveaus von 100 Bins der Effektivwert des Rauschens in 170 Schritten von 30 auf 200 Bins erhöht. Das SNR wird damit über einen Bereich von 0,25 bis 11 variiert.

Zu sicheren Aussagen über die Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis könnte man schon mit weniger als 170 Zeitreihen kommen. Dennoch ist diese große Zahl von Vorteil, weil so ein statistisches Ensemble erzeugt wird, das eine Abschätzung der Fitstreuung ermöglicht.

Auch hier werden Zeitreihen von jeweils 1 Million Datenpunkten erzeugt. Bei einer Abtastrate von 200 kHz liegt die Abknickfrequenz des Filters bei 50 kHz.

5.4. Leistungsfähigkeit beim Fünf-Zustands-Modell

Farokhi et al. (2000) haben dargestellt, dass der K^+ -Kanal von *Chara* mit dem in der folgenden Abbildung dargestellten Fünf-Zustands-Modell beschrieben werden kann.

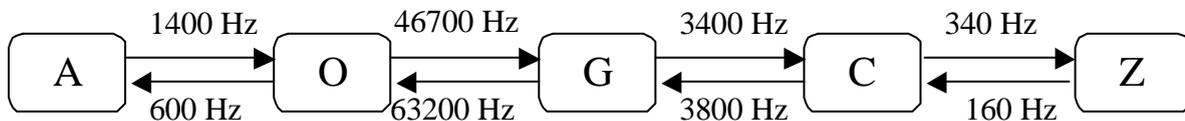


Abbildung 5.3: Markov-Modell des K^+ -Kanals von *Chara* (Farokhi et al., 2000).

Dabei sind A und O Offen-Zustände, G, C und Z Geschlossen-Zustände. Untersuchungen an diesem Markov-Modell haben ergeben, dass viele interessante Prozesse an der Grenze des Zeitauflösungsvermögens der bisherigen Fitverfahren stattfinden.

Die Leistungsfähigkeit der Fitverfahren bei komplizierteren Markov-Modellen wird deswegen anhand der in Abbildung 5.4 dargestellten Modelle überprüft. Ein Übergang zwischen verschiedenen Stromniveaus findet nur zwischen den Zuständen O und G statt. Alle anderen Übergänge sind solche zwischen verschiedenen Zuständen der gleichen Leitfähigkeit.

Zu einer Sprungantwort des Filters und damit zu einem Einfluss der Übergangsraten auf das Amplitudenhistogramm kommt es nur, wenn beim Wechsel von einem Zustand in einen

anderen auch ein anderes Stromniveau angenommen wird. Besonderes Augenmerk wird deswegen bei den folgenden Untersuchungen auf die Übergangsrate k_{og} gelegt, die in 250 Schritten von 2 kHz auf 500 kHz erhöht wird. Alle anderen Raten werden bei den in Abbildung 5.4 angegebenen Werten konstant gehalten. Im einzelnen werden also Zeitreihen der folgenden 250 Markov-Modelle gefittet.



Abbildung 5.4: Fünf-Zustands-Modelle für die Überprüfung der Fitverfahren, ($n=1\dots 250$).

Der Übersichtlichkeit halber wird die grafische Darstellung der Ergebnisse teilweise auf zwei der acht Übergangsraten beschränkt. Anstatt aller acht Übergangsraten sind in diesen Fällen jeweils nur die Ergebnisse für die variable Rate k_{og} sowie für die Rate k_{eg} als Beispiel der konstanten Raten dargestellt. Dies ist ausreichend für die wesentlichen Erkenntnisse, den übrigen Raten können keine weitergehenden Informationen entnommen werden.

5.5. Startwerte bei den Tests der Fitverfahren

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Auswertungen simulierter Zeitreihen werden den Fitverfahren als Startwerte die tatsächlichen Übergangsraten vorgegeben. Die Fitverfahren haben ihre Aufgabe mithin bereits dann erfüllt, wenn sie als Endergebnis die Werte wieder ausgeben, die man ihnen als Startwerte vorgegeben hat. Es wird damit von Voraussetzungen ausgegangen, die nicht denen bei der Auswertung echter Messreihen entsprechen. Die Aussagekraft der Ergebnisse wird dadurch nicht so stark vermindert, wie es auf den ersten Blick scheinen mag. Dies zeigen die folgenden Ausführungen.

Die Funktionsweise des in den Fitverfahren verwendeten Downhill-Simplex-Algorithmus (Press et al., 1987) für die n -dimensionale Minimierung kann man sich gut geometrisch veranschaulichen. Ein Simplex ist eine geometrische Figur, die im n -dimensionalen Raum aus $n+1$ (Eck-) Punkten besteht, die untereinander verbunden sind. Für jeden dieser $n+1$ Punkte wird der Funktionswert der zu minimierenden Funktion bestimmt. Der Punkt mit dem höchsten Funktionswert wird an der gegenüber liegenden Fläche gespiegelt. Ist der Funktionswert des gespiegelten Punktes kleiner, wird dieser als Eckpunkt eines neuen Simplex verwendet. Ist der Funktionswert des gespiegelten Punktes größer als der des originalen Punktes, bleibt dieser Punkt erhalten und der Punkt mit dem zweithöchsten Funktionswert wird an der gegenüberliegenden Fläche gespiegelt. Auf diese Weise bewegt sich der Simplex durch den Raum und nähert sich dem Minimum an.

Ist auf diese Weise keine weitere Minimierung mehr zu erreichen, zieht sich der Simplex zusammen, indem die Abstände zwischen den Eckpunkten halbiert werden. Am Ende dieser Prozedur befinden sich alle Eckpunkte des Simplex an der Stelle im n -dimensionalen Raum, an der die Funktion minimal wird.

Werden bei diesem Verfahren die tatsächlichen Übergangsraten als Startwerte verwendet, liegt damit erst einer der $n+1$ Eckpunkte des Simplex fest. Die übrigen n Eckpunkte des Start-Simplex werden so erzeugt, dass die Übergangsraten dieses vorgegebenen n -dimensionalen Vektors mit Zufallszahlen n mit $0,5 < n < 2$ multipliziert werden.

Konvergiert nun der Simplex bei dem vorgegebenen Eckpunkt, der den wahren Übergangsraten entspricht, so ist damit zumindest sichergestellt, dass in dem Bereich, den man abdecken kann, indem die Übergangsraten um einen Faktor 2 verändert werden, kein weiteres Minimum existiert.

Bei Ein-Kanal-C/O-Modellen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden (Harlfinger, 2000), dass auch ein Variieren der Startwerte über einen weitaus größeren Bereich nicht zu einer Veränderung der Fitergebnisse führt. Die dort für das Ein-Kanal-C/O-Modell getroffenen Aussagen können jedoch nicht unbesehen auf kompliziertere Markov-Modelle übertragen werden. In höherdimensionalen Lösungsräumen ist es nämlich wesentlich wahrscheinlicher, dass der Algorithmus in einem lokalen Minimum stecken bleibt. Bei der Auswertung echter Messreihen ist es deswegen immer sinnvoll, sich durch Plausibilitätsabwägungen um dem tatsächlichen Modell möglichst nahe kommende Startwerte zu bemühen.

6. Leistungsfähigkeit bisheriger Verfahren

Das Ziel dieser Arbeit ist die Einführung verbesserter Fitverfahren für die Übergangsraten zwischen den Zuständen des Markov-Modells. Um einen Vergleichsmaßstab zu haben, wird zunächst die Leistungsfähigkeit der schon bestehenden Verfahren getestet. Bedeutsam sind in diesem Zusammenhang der Betafit für Filter erster Ordnung und der Direkte Zeitreihenfit, weil nur diese auf Informationen beruhen, die sich direkt und ohne informationsmindernde Vorbehandlung (wie z.B. Sprungdetektion) aus der Zeitreihe gewinnen lassen. Im einzelnen ist die Funktionsweise der Verfahren in Kapitel 4 erläutert.

Die übrigen Verfahren erfordern eine vorherige Rekonstruktion der unverrauschten Zeitreihe. Bereits diese Rekonstruktion ist jedoch mit zahlreichen Fehlerquellen behaftet. So werden schnelle Schaltereignisse nur ungenügend detektiert und damit einhergehend wird die Zahl langsamer Schaltvorgänge überschätzt (Ball und Sansom, 1989). Die daraus resultierenden Fehler lassen sich auch mit den mathematisch aufwändigen Missed-Events-Korrekturen (Crouzy und Sigworth, 1990; Draber und Schultze, 1994) nur in geringem Umfang korrigieren (Farokhi et al., 2000). Folglich ist die rekonstruierte Zeitreihe grundsätzlich ein ungeeigneter Ausgangspunkt, wenn das Zeitauflösungsvermögen weiter verbessert werden soll. Die Fitverfahren, die auf der rekonstruierten Zeitreihe aufbauen, sind deswegen hier nicht von weiterem Interesse.

Getestet wird die Leistungsfähigkeit von Direktem Zeitreihenfit und Betafit für Filter erster Ordnung auf die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Weise zunächst bei Ein-Kanal-Zeitreihen. Das Zeitauflösungsvermögen beim C-O-Modell wird mit Hilfe des Reichweitentests festgestellt. Ebenfalls auf das C-O-Modell beschränkt sich der Rauschabhängigkeitstest, der Aussagen darüber liefert, wie schlecht das Signal-Rausch-Verhältnis werden darf, bevor sich die Ergebnisse der Verfahren verschlechtern. Anhand einiger Fünf-Zustands-Modelle wird überprüft, ob die Aussagen auch bei komplizierteren Modellen Bestand haben.

Schließlich werden die gleichen Tests erneut durchgeführt, nun aber mit Zeitreihen von zwei Kanälen.

Der bislang existierende Betafit ist darauf beschränkt, Zeitreihen zu fitten, die mit Filtern erster Ordnung gefiltert wurden. Folglich müssen die Tests des Verfahrens mit dem Besselfilter erster Ordnung durchgeführt werden.

Der Direkte Zeitreihenfit unterliegt in dieser Hinsicht keiner Einschränkung, er kann mit Filtern aller Art umgehen. Man könnte daran denken, auch den Direkten Zeitreihenfit hier an Zeitreihen zu testen, die mit Filtern erster Ordnung gefiltert wurden. Dies würde dazu führen, dass die Leistungsfähigkeit von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit unmittelbar verglichen werden könnte.

Dennoch wird der Direkte Zeitreihenfit hier mit Besselfiltern vierter Ordnung getestet, weil nur diese von praktischem Interesse sind. Letztlich ist es nämlich nicht das Ziel, die Leistungsfähigkeit verschiedener Verfahren zu vergleichen, sondern Verfahren zu entwickeln, die echte Messreihen auswerten können. Echte Messreihen sind aber immer mit Filtern höherer Ordnung gefiltert.

Es wird sich zeigen, dass Betafit für Filter erster Ordnung und Direkter Zeitreihenfit sehr unterschiedliche Stärken und Schwächen haben, dass ein Betafit mithin eine sinnvolle Ergänzung zum Direkten Zeitreihenfit darstellt. Dies wird in einem späteren Schritt dieser Arbeit zum Anlass genommen, den Betafit auf Filter höherer Ordnung zu erweitern. Dort zeigt sich, dass der Erweiterte Betafit bei Filtern vierter Ordnung die gleiche Leistungsfähigkeit aufweist wie der bisherige Betafit bei Filtern erster Ordnung.

Über diesen Umweg ergibt sich eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Direktem Zeitreihenfit und bisherigem Betafit, obwohl die Tests hier zunächst mit Filtern vierter Ordnung auf der einen Seite und mit Filtern erster Ordnung auf der anderen Seite durchgeführt werden. Trotz der unterschiedlichen Filterung werden die Ergebnisse von Direktem Zeitreihenfit und Amplitudenhistogramm für Filter erster Ordnung deswegen in gemeinsamen Diagrammen dargestellt.

6.1. Leistungsfähigkeit bei Ein-Kanal-Zeitreihen

6.1.1. Reichweitentest

Abbildung 6.1 zeigt die Ergebnisse von Direktem Zeitreihenfit und Betafit für Filter erster Ordnung beim Reichweitentest. Der Reichweitentest ist ausführlich in Kapitel 5.2 erläutert. Als Startwerte für den Fit werden hier wie auch bei allen folgenden Untersuchungen die tatsächlichen Übergangsraten verwendet. Der Einfluss dieser Tatsache auf die Aussagekraft der Ergebnisse ist in Kapitel 5.5 diskutiert.

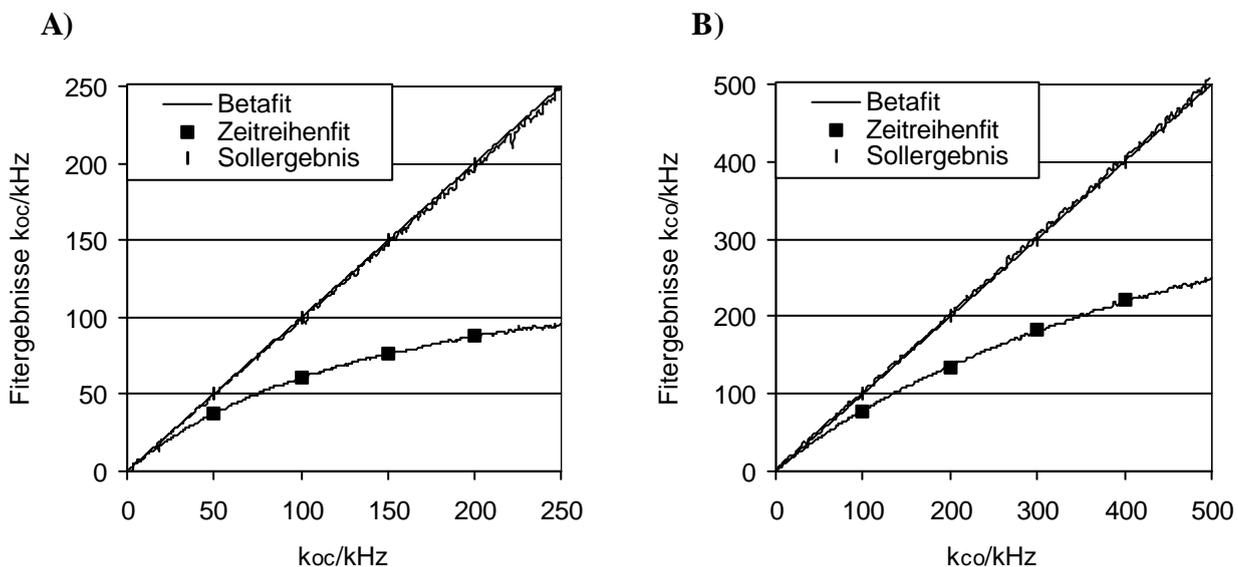


Abbildung 6.1: Ergebnisse von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit beim Reichweitentest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster bzw. vierter Ordnung 50 kHz, SNR 10, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=n*1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=n*2$ kHz, ($n=1...250$). Es wurden jeweils 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Der Betafit liefert für beide Raten sehr gute Ergebnisse. Über den gesamten Bereich existieren nur marginale Abweichungen von den Sollergebnissen. Die Ergebnisse des Direkten Zeitreihenfits hingegen sind nur für kleine Übergangsraten korrekt, schnelle Übergangsraten werden zu niedrig geschätzt.

Zu berücksichtigen ist bei der Bewertung dieser Ergebnisse, dass das Signal-Rausch-Verhältnis aller gefitteten Zeitreihen mit einem Wert von 10 sehr gut war. Dass bei schlechterem Signal-Rausch-Verhältnis auch der Betafit falsche Ergebnisse liefert, zeigt der folgende Rauschabhängigkeitstest.

6.1.2. Rauschabhängigkeitstest

Anhand des in Kapitel 5.3 beschriebenen Rauschabhängigkeitstests wird nun geprüft, wie stark die Qualität der Fitergebnisse vom Signal-Rausch-Verhältnis abhängt. In der folgenden Abbildung sind die von Direktem Zeitreihenfit und Betafit gefundenen Ergebnisse dargestellt.

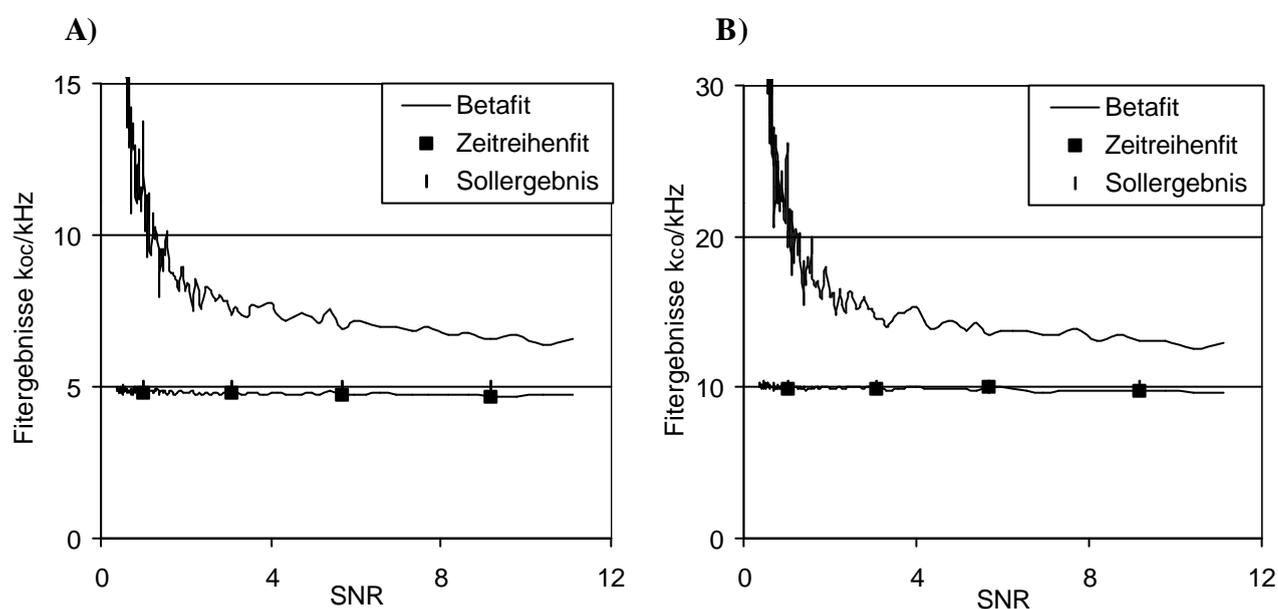


Abbildung 6.2: Ergebnisse von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter bzw. erster Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{0c} = 5 \text{ kHz}$, B) Sollergebnis Rate $k_{0c} = 10 \text{ kHz}$. Es wurden jeweils 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

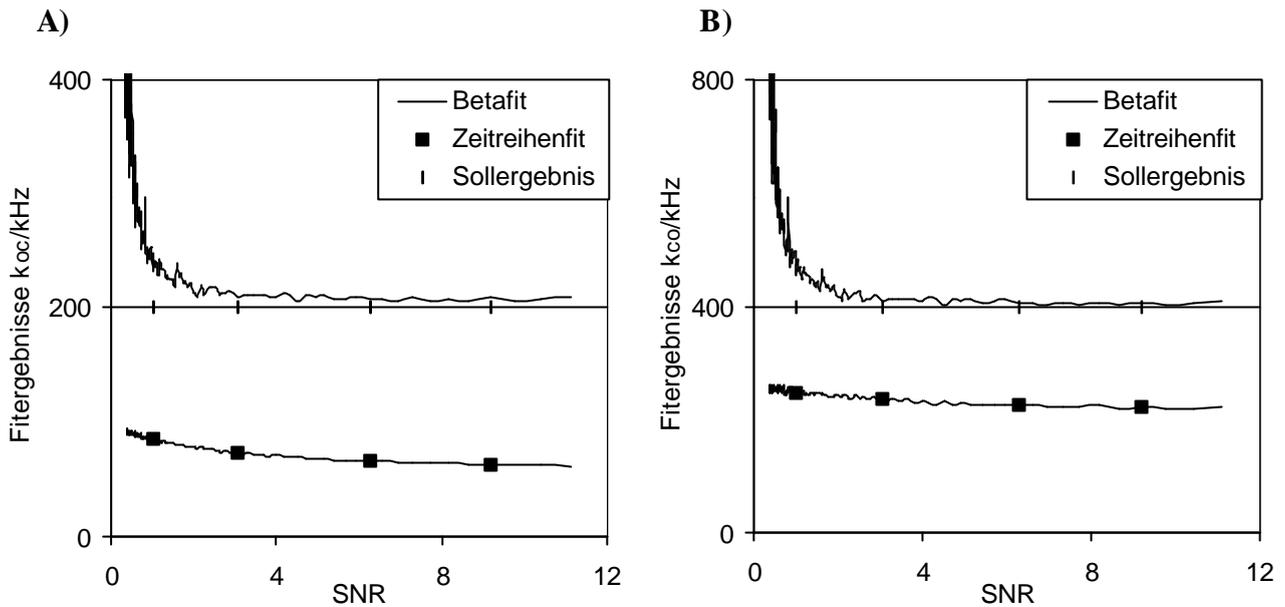


Abbildung 6.3: Ergebnisse von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=200$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=400$ kHz. Es wurden jeweils 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Der Direkte Zeitreihenfit zeigt nur eine geringe Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis. Bei beiden Modellen erhält man von einem SNR von über 10 bis deutlich unter 1 praktisch konstante Ergebnisse. Diese Eigenschaft ist die große Stärke des Direkten Zeitreihenfits.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen aus Abbildung 6.1 findet der Direkte Zeitreihenfit die kleinen Übergangsraten von $k_{oc}=5$ kHz und $k_{co}=10$ kHz (Abbildung 6.2) exakt heraus, während die schnellen Übergangsraten von 200 kHz und 400 kHz (Abbildung 6.3) erheblich unterschätzt werden.

Der Betafit indessen erkennt die Übergangsraten von $k_{oc}=200$ kHz und $k_{co}=400$ kHz sehr gut, solange das Signal-Rausch-Verhältnis nicht unter 4 absinkt. Darunter entfernen sich die Resultate von den Sollergebnissen. Bei den langsamen Raten von 5 kHz und 10 kHz liegt diese Grenze bei einem SNR von 6. Darunter liegen die Ergebnisse völlig falsch, aber auch darüber weichen sie noch um mehr als 10% von den tatsächlichen Raten ab.

Dass der Betafit bei schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis Schwächen zeigt, wird durch die folgende Abbildung plausibel, die den Einfluss des Rauschens auf die Form des Amplitudenhistogramms darstellt.

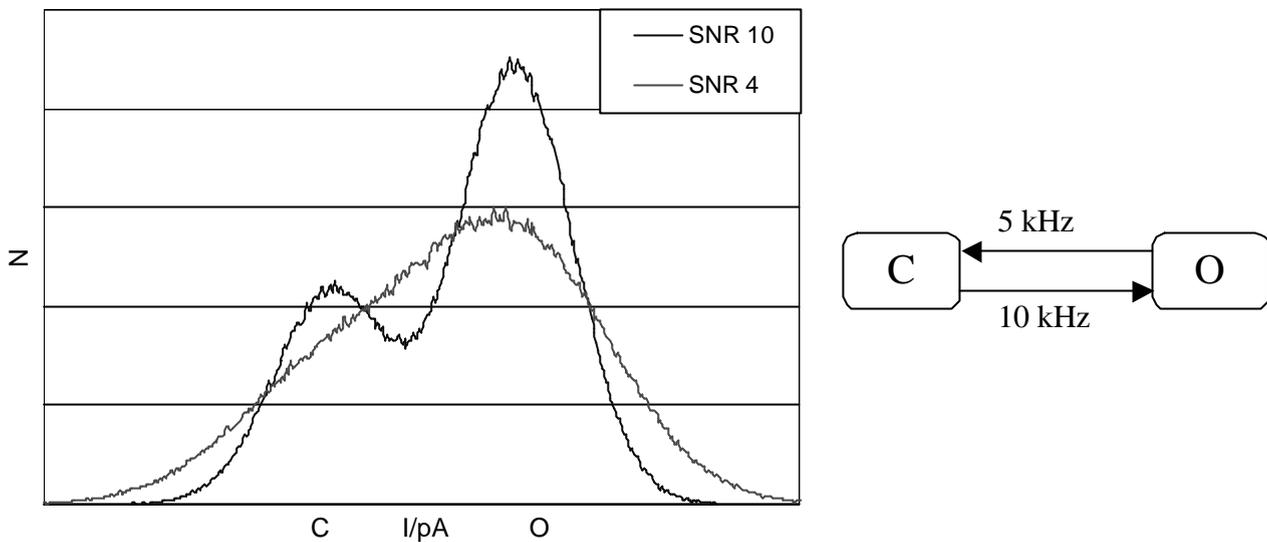


Abbildung 6.4: Amplitudenhistogramme des rechts dargestellten Markov-Modells bei unterschiedlichen Signal-Rausch-Verhältnissen.

Die langsamen Übergangsraten von 5 kHz und 10 kHz erkennt der Betafit nur bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis, weil das Amplitudenhistogramm dann eine spezifische Form hat. Mit schlechterem Signal-Rausch-Verhältnis verschwinden die Peaks im Rauschen und die charakteristische Form löst sich auf.

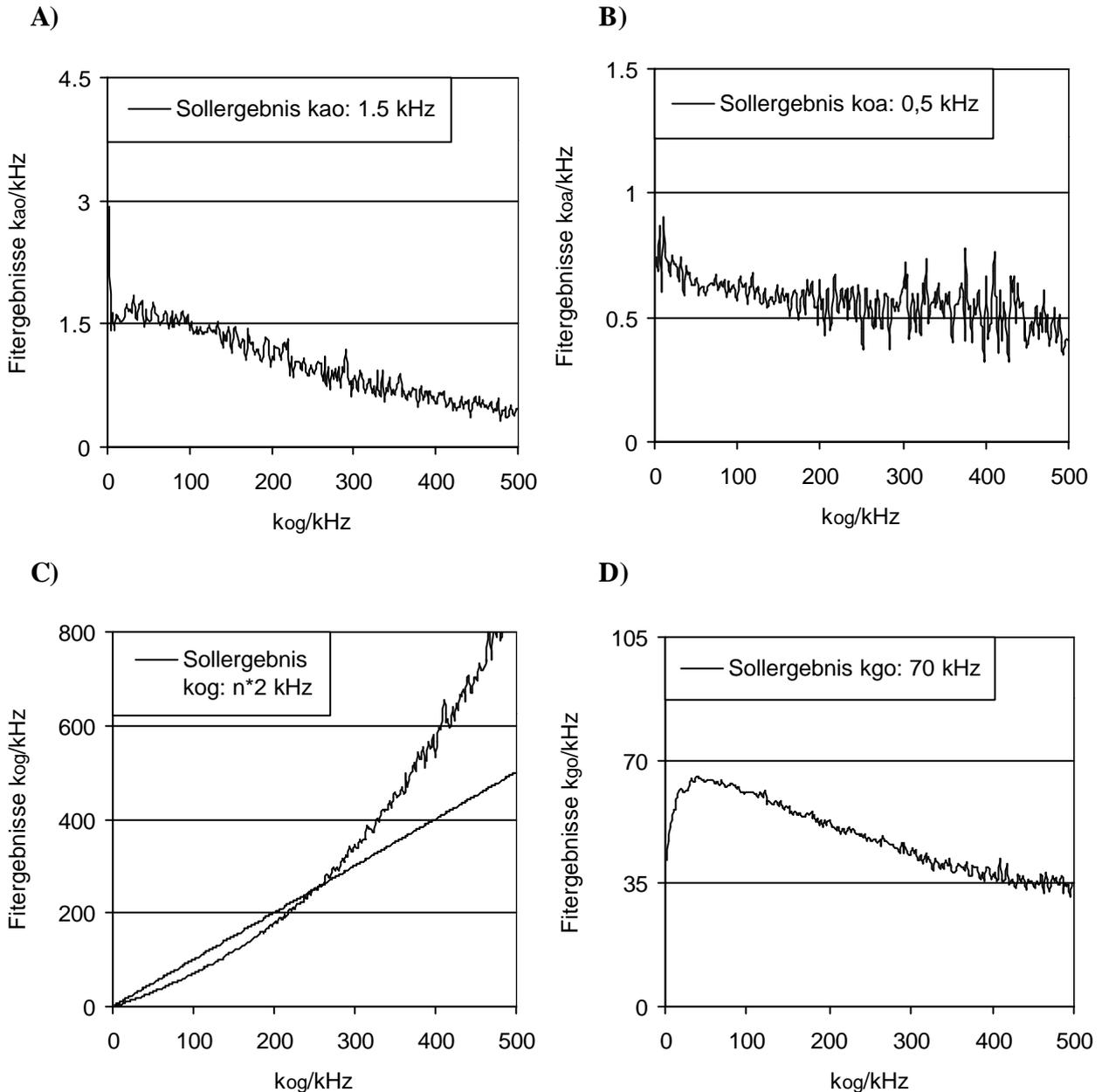
Dieser Informationsverlust durch das Rauschen macht sich bei langsamen Übergangsraten besonders deutlich bemerkbar. Ein Einfluss des Tiefpassfilters auf das Amplitudenhistogramm zeigt sich nämlich nur dann, wenn sich die Leitfähigkeit des Ionenkanals ändert und damit eine Änderung des Kanalstroms eintritt. Wenn sich aber bei kleinen Übergangsraten der Kanalstrom nur selten ändert, weicht schon das unverrauschte Amplitudenhistogramm nur unwesentlich von der Idealform, bei der alle Messwerte auf den Nominalniveaus liegen, ab.

Die Kombination aus langsamen Übergangsraten und schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis führt den Betafit deswegen an die Grenzen seiner Leistungsfähigkeit.

6.1.3. Fünf-Zustands-Modelle

Für die Praxis von größerer Bedeutung als einfache C-O-Modelle sind Markov-Modelle mit mehr Zuständen. Um zu überprüfen, ob die für das Zwei-Zustands-Modell gefundenen Aussagen auf Modelle mit einer größeren Zahl von Parametern übertragbar sind, werden die Fünf-Zustands-Modelle aus Kapitel 5.4 gefittet. Startwerte der Fits sind wiederum die tatsächlichen Übergangsraten.

Zunächst sind in der folgenden Abbildung die Ergebnisse dargestellt, die der Direkte Zeitreihenfit beim Fünf-Zustands-Modell liefert.



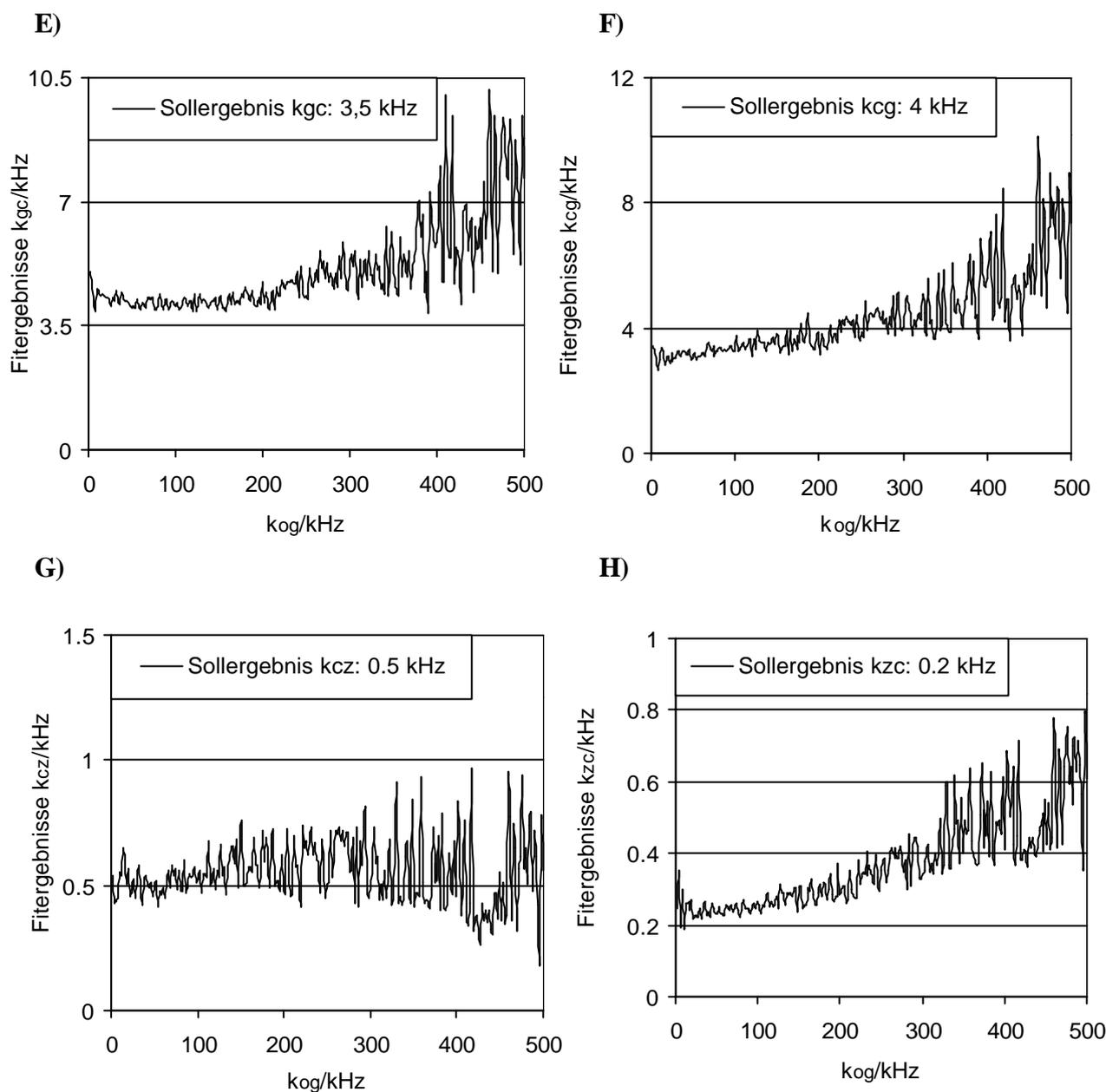
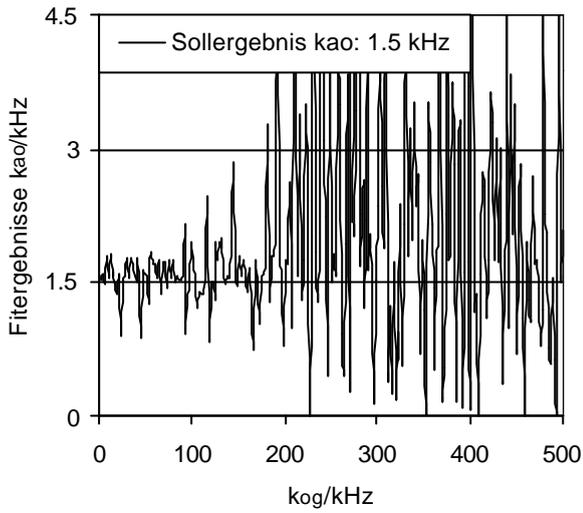


Abbildung 6.5: Ergebnisse des Direkten Zeitreihenfits beim Fünf-Zustands-Modell, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 4, A) Sollergebnis Rate $k_{ao}=1,5 \text{ kHz}$, B) Sollergebnis Rate $k_{oa}=0,5 \text{ kHz}$, C) Sollergebnis Rate $k_{og}=n*2 \text{ kHz}$, $n=1\dots250$, D) Sollergebnis Rate $k_{go}=70 \text{ kHz}$, E) Sollergebnis Rate $k_{gc}=3,5 \text{ kHz}$, F) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4 \text{ kHz}$, H) Sollergebnis Rate $k_{cz}=0,5 \text{ kHz}$, I) Sollergebnis Rate $k_{zc}=0,2 \text{ kHz}$. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für alle Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

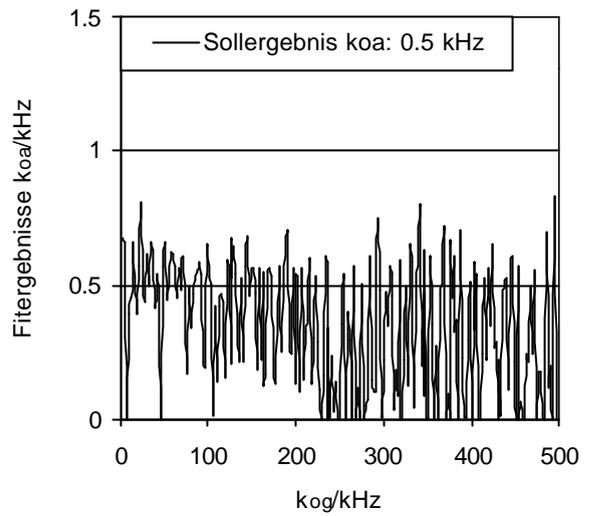
Solange Rate k_{og} 200 kHz nicht überschreitet, liegen die Ergebnisse des Direkten Zeitreihenfits für alle Raten nur unerheblich neben den Sollergebnissen. Im Bereich darüber wird k_{og} deutlich überschätzt. Auch die Ergebnisse für die übrigen Raten entfernen sich dann von der Sollergebnissen, vor allem streuen sie stärker.

Abbildung 6.6 zeigt die Ergebnisse, die der Betafit bei Fünf-Zustands-Modellen erzielt.

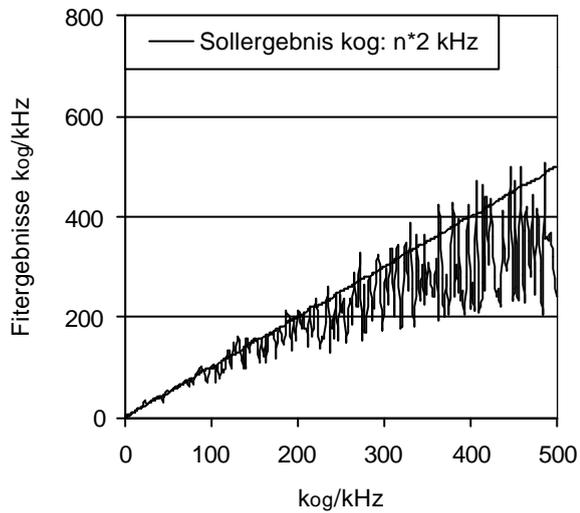
A)



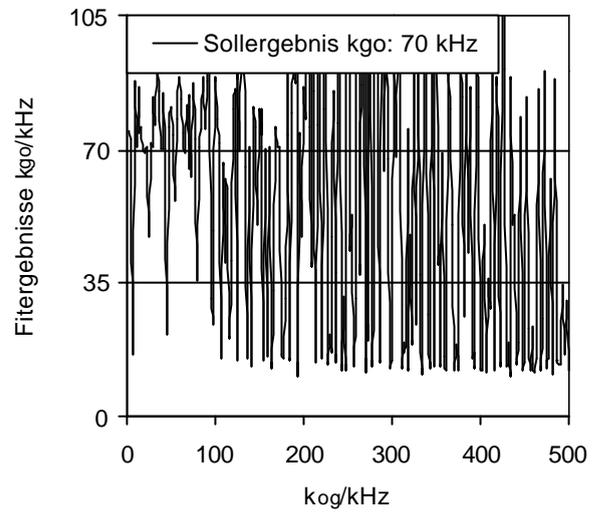
B)



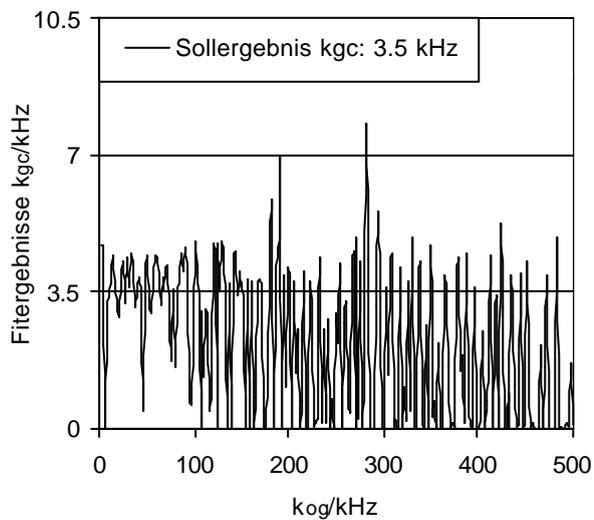
C)



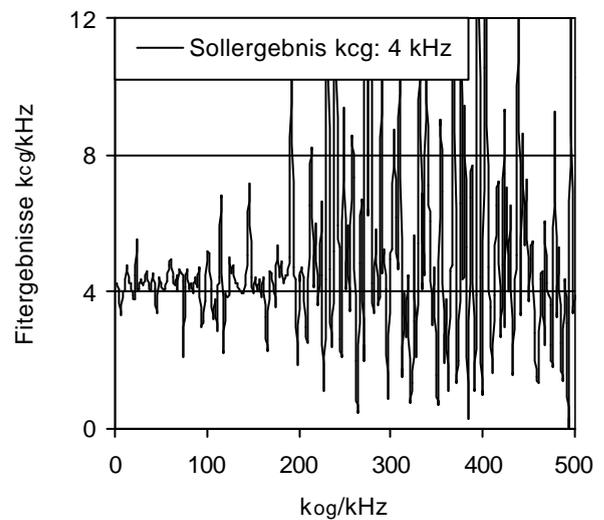
D)



E)



F)



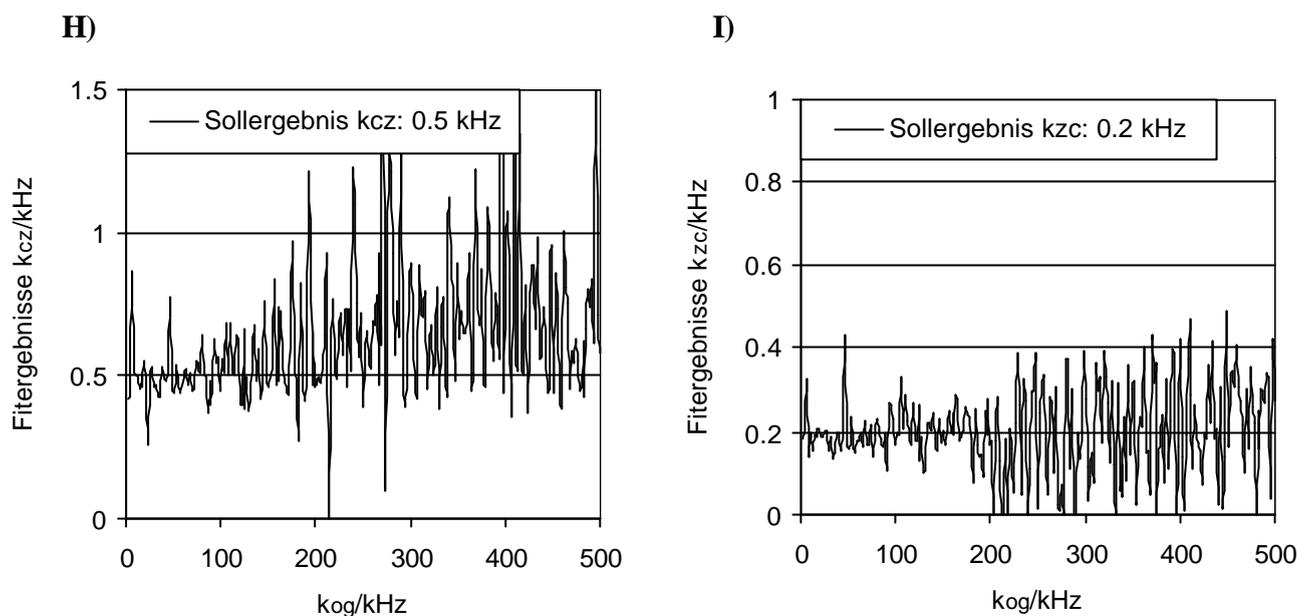


Abbildung 6.6: Ergebnisse des Betafits für Filter erster Ordnung beim Fünf-Zustands-Modell, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster Ordnung 50 kHz, SNR 4, A) Sollergebnis Rate $k_{bo}=1,5$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{oa}=0,5$ kHz, C) Sollergebnis Rate $k_{og}=n \cdot 2$ kHz, $n=1 \dots 250$, D) Sollergebnis Rate $k_{go}=70$ kHz, E) Sollergebnis Rate $k_{gc}=3,5$ kHz, F) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4$ kHz, H) Sollergebnis Rate $k_{cz}=0,5$ kHz, I) Sollergebnis Rate $k_{zc}=0,2$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für alle Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

Für alle Raten liegen die Ergebnisse im Mittel näher bei den Sollergebnissen als die Ergebnisse des Direkten Zeitreihenfits. Die Streuung der Ergebnisse um diesen Mittelwert ist aber jeweils erheblich.

Hier wie auch in allen übrigen grafischen Darstellungen der Fitergebnisse stellt die Streuung der Ergebnisse ein Maß für die Sicherheit der Ergebnisse dar. Auf Fehlerbalken kann aus diesem Grund verzichtet werden. Wenn die Ergebnisse stark streuen, empfiehlt es sich, die Streuung durch Auswertung mehrerer verschiedener Zeitreihen zu minimieren.

Die starke Streuung der Ergebnisse deutet darauf hin, dass der Betafit im Vergleich zum Direkten Zeitreihenfit eine verminderte Eindeutigkeit besitzt. So gibt es offenbar für das Fünf-Zustands-Modell jeweils verschiedene Sätze von Übergangsraten, die zu fast gleichen Amplitudenhistogrammen führen. Zu welchem dieser Sätze hin der Betafit konvergiert, ist eine Frage des Zufalls. Besonders bei niedrigen Übergangsraten macht sich auch das Fehlen der Informationen aus dem Zeitverhalten bemerkbar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Der Direkte Zeitreihenfit erkennt langsame Übergangsraten, die deutlich unter der Abknickfrequenz des Tiefpassfilters liegen mit großer Sicherheit. Daran ändert sich auch nichts, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis schlecht ist oder wenn das Markov-Modell eine größere Anzahl von Parametern hat. Schwierigkeiten bereiten ihm hingegen schnelle Übergangsraten.

Die Stärken des Betafits liegen bei schnellen Übergangsraten. Die Trägheit des Tiefpassfilters bewirkt dann eine charakteristische Form des Amplitudenhistogramms, die gut angefitet werden kann. Wesentlich weniger aussagekräftig ist das Amplitudenhistogramm bei langsamen Übergangsraten, diese werden folglich weniger gut erkannt. Ebenfalls negativ auf die Leistungsfähigkeit des Betafits wirken sich ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis und eine höhere Zahl von Parametern im Markov-Modell aus. Bei einer wachsenden Zahl von Parametern steigt die Dimension des Lösungsraums und damit auch die Schwierigkeit, ein eindeutiges Minimum zu finden.

6.2. Leistungsfähigkeit bei Zwei-Kanal-Zeitreihen

Von Bedeutung ist es in der Praxis, dass die Fitverfahren in der Lage sind, auch Messungen mit mehreren Kanälen auszuwerten. Die Ionenkanäle sind auf der Zellmembran so unregelmäßig verteilt, dass man beim Heranführen der Pipette an die Membran unter dem Mikroskop keinen Einfluss darauf hat, wie viele Kanäle sich im Bereich der Pipettenspitze befinden. Die Zahl schwankt von Messung zu Messung, jedoch sind Einzelkanalmessungen in geringerer Zahl vertreten als solche von zwei oder drei Kanälen.

Vorausgesetzt, es handelt sich um gleichartige Kanäle, sind sowohl Direkter Zeitreihenfit als auch Betafit in der Lage, Zeitreihen mit mehreren Kanälen auszuwerten. Obwohl die Verfahren grundsätzlich nicht darauf beschränkt sind, wird hier nur eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit bei Zeitreihen mit zwei Kanälen durchgeführt. Für Zeitreihen mit einer größeren Anzahl von Kanälen können mit der zur Verfügung stehenden Rechenzeit keine fundierten Aussagen getroffen werden.

6.2.1. Reichweitentest

Erneut steht am Beginn das einfache C-O-Modell. Mit Hilfe des Reichweitentests aus Kapitel 5.2 wird das Zeitaufklärungsvermögen bei Zeitreihen von zwei gleichartigen Kanälen überprüft.

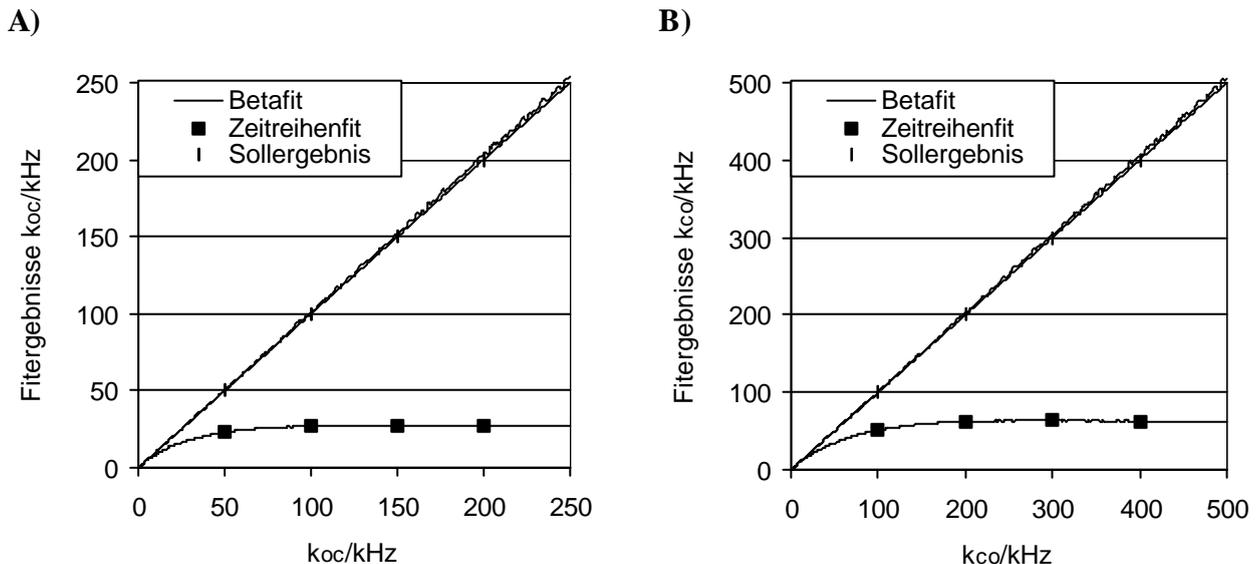


Abbildung 6.7: Ergebnisse von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit beim Reichweitentest mit zwei gleichartigen Kanälen, Abtastrate 200 kHz, Abnickfrequenz des Besselfilters vierter bzw. erster Ordnung 50 kHz, SNR 10, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=n*1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=n*2$ kHz ($n=1...250$). Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Genau wie bei Ein-Kanal-Zeitreihen findet der Betafit die Übergangsraten exakt. Der Direkte Zeitreihenfit hingegen hat bei Zwei-Kanal-Zeitreihen größere Schwierigkeiten. Die schnellen Übergangsraten werden noch deutlich stärker unterschätzt als bei den Ein-Kanal-Modellen. Schon ab Raten von $k_{oc}=50$ kHz bzw. $k_{co}=100$ kHz verläuft die Kurve waagrecht, schnellere Übergangsraten erkennt der Direkte Zeitreihenfit also nicht einmal ansatzweise. Es ist unmöglich zu unterscheiden, ob die Raten bei 100 kHz oder 400 kHz liegen.

6.2.2. Rauschabhängigkeitstest

Anhand des Rauschabhängigkeitstest (siehe Kapitel 5.3) wird geprüft, welchen Einfluss das Signal-Rausch-Verhältnis auf die Ergebnisse bei Zwei-Kanal-Zeitreihen hat.

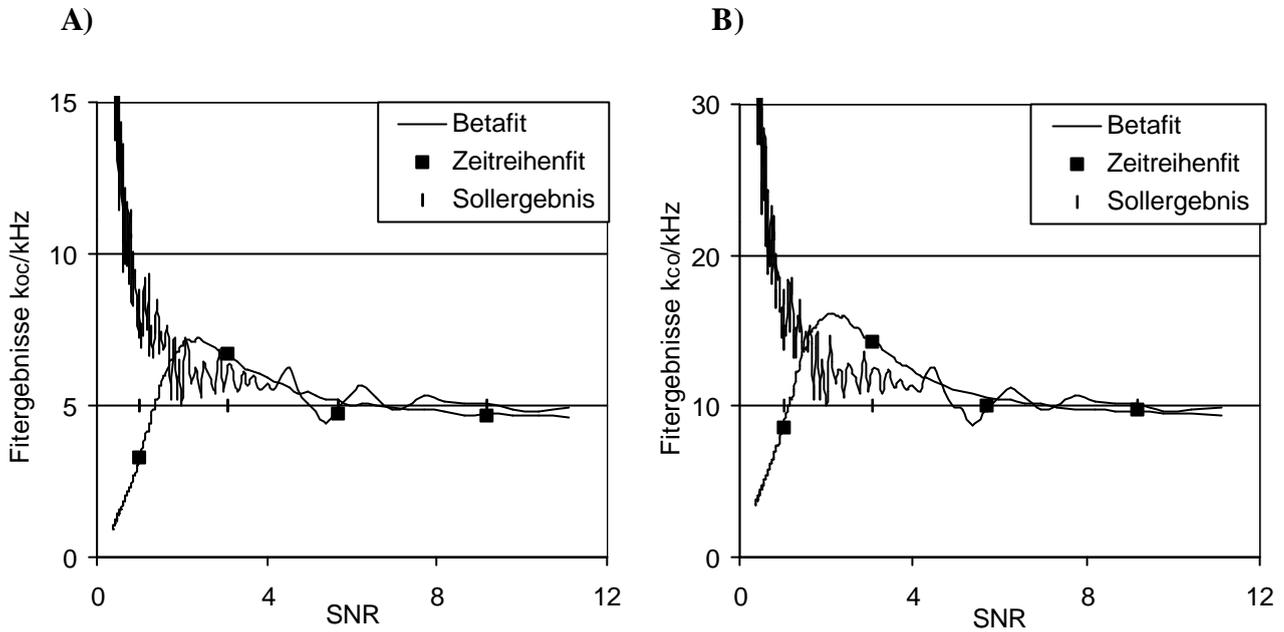


Abbildung 6.8: Ergebnisse von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest mit zwei gleichartigen Kanälen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter bzw. erster Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=5$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{oc}=10$ kHz. Es wurden jeweils 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

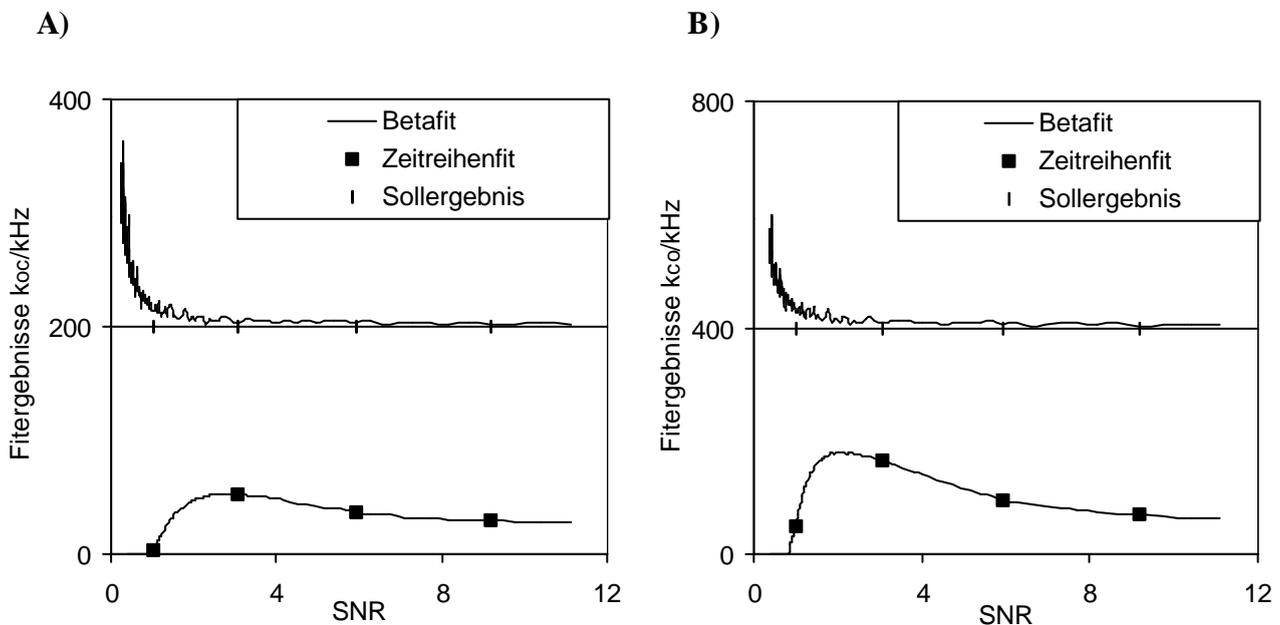


Abbildung 6.9: Ergebnisse von Betafit für Filter erster Ordnung und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest mit zwei gleichartigen Kanälen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter bzw. erster Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=200$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{oc}=400$ kHz. Es wurden jeweils 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Auch der Rauschabhängigkeitstest zeigt, dass sich mit dem Wechsel von Ein-Kanal- zu Zwei-Kanal-Zeitreihen die Leistungsfähigkeit des Betafits verbessert, während sich die des Direkten Zeitreihenfits verschlechtert. So benötigt der Betafit beispielsweise für die Detektion der schnellen Übergangsraten von 200 kHz und 400 kHz nur noch ein Signal-Rausch-Verhältnis von 2, anstatt von 4 wie beim Ein-Kanal-Modell.

Der Direkte Zeitreihenfit entdeckte beim Ein-Kanal-Modell die Übergangsraten noch unabhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis, beim Zwei-Kanal-Modell benötigt er ein SNR von 4. Zusätzlich zu der Tatsache, dass die absoluten Werte der Übergangsraten erheblich schlechter herausgefunden werden als beim Ein-Kanal-Modell, ist also ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erforderlich.

6.2.3. Fünf-Zustands-Modelle

Um die Leistungsfähigkeit bei zwei Kanälen mit je fünf Zuständen zu testen, werden Zeitreihen mit zwei gleichartigen Kanälen des bekannten Fünf-Zustands-Modells aus Kapitel 5.4 ausgewertet.

Die Betrachtung von Abbildung 6.5 und Abbildung 6.6, in denen jeweils die Ergebnisse für alle acht Übergangsraten grafisch dargestellt sind, zeigt, dass die Aussagen der einzelnen Grafiken in ihren wesentlichen Zügen übereinstimmen. Folglich ist es ohne größeren Informationsverlust möglich, sich in der Zahl der Grafiken zu beschränken. Hier und auch bei den folgenden Auswertungen von Fünf-Zustands-Modellen ist die grafische Darstellung der Übersichtlichkeit halber auf zwei Übergangsraten beschränkt.

Dargestellt sind in der folgenden Abbildung die Ergebnisse für die Raten k_{og} und k_{cg} .

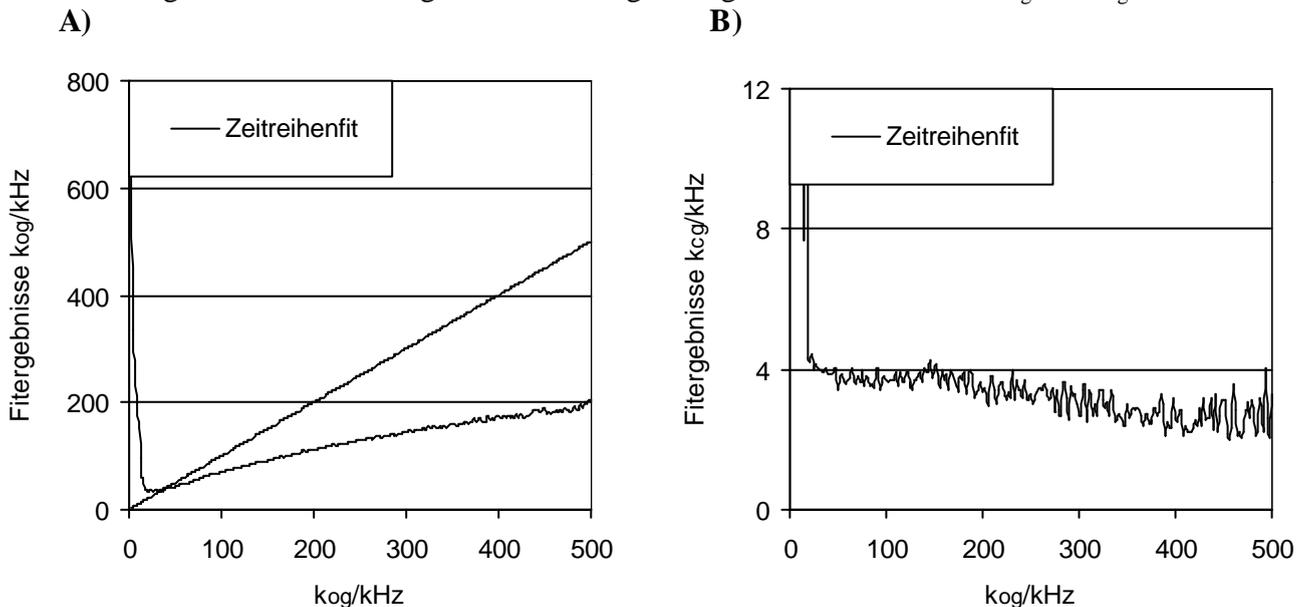


Abbildung 6.10: Ergebnisse des Direkten Zeitreihenfits bei zwei gleichartigen Kanälen mit je fünf Zuständen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 4, A) Sollergebnis Rate $k_{og}=n \cdot 2$ kHz, $n=1 \dots 250$, B) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

Ebenso wie es schon der Reichweitentest ergeben hat, zeigt sich auch bei den Fünf-Zustands-Modellen, dass der Direkte Zeitreihenfit schnelle Übergangsraten erheblich unterschätzt. Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich, wenn die Rate k_{og} sehr klein ist, wenn also die Besetzungswahrscheinlichkeit der beiden Zustände sich stark voneinander unterscheidet.

Eine Stärke des Direkten Zeitreihenfits bleibt aber unverändert: Die Streuung der Ergebnisse ist gering.

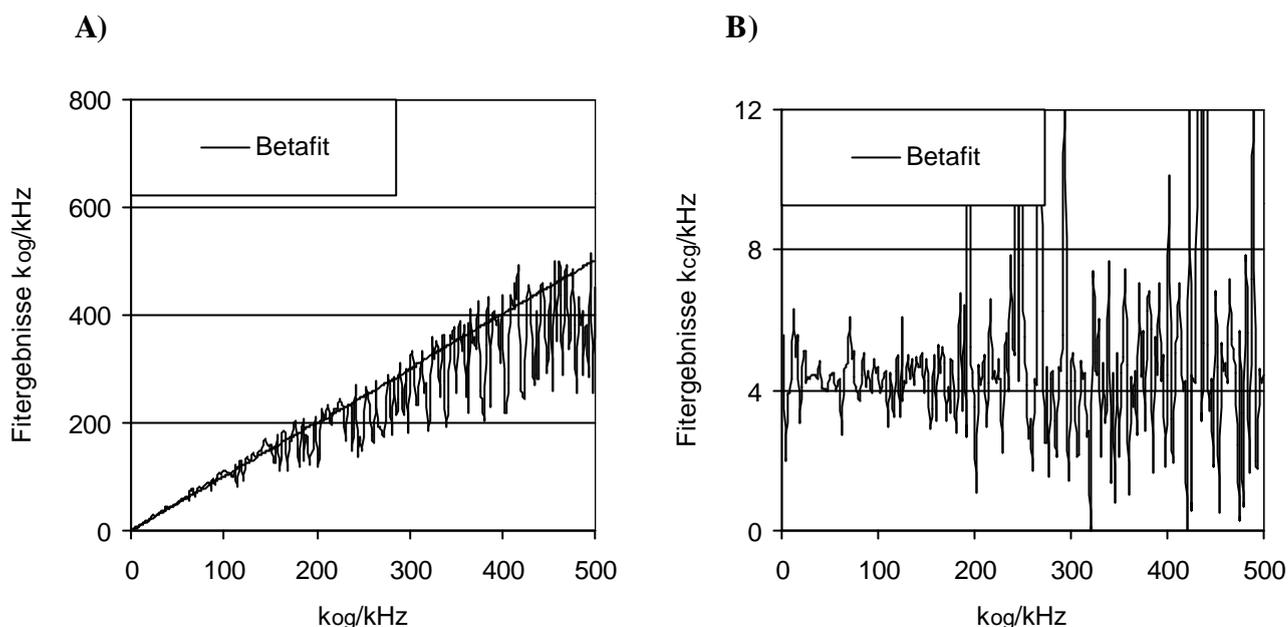


Abbildung 6.11: Ergebnisse des Betafits für Filter erster Ordnung bei zwei gleichartigen Kanälen mit je fünf Zuständen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster Ordnung 50 kHz, SNR 4, A) Sollergebnis Rate $k_{cg}=n*2$ kHz, $n=1...250$, B) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{cg} .

Die Resultate des Betafits bei Zeitreihen mit zwei Kanälen und je fünf Zuständen entsprechen denen, die der Betafit auch bei Ein-Kanal-Zeitserien des Fünf-Zustands-Modells geliefert hat. (siehe Abbildung 6.6). Im Mittel liegen die Ergebnisse in der Nähe der Sollergebnisse, allerdings streuen sie stark.

Insgesamt stellt man fest, dass sich die Leistungsfähigkeit des Betafits bei zwei Kanälen eher erhöht, während die des Direkten Zeitserienfits absinkt. Es fragt sich, wie diese Beobachtung zu erklären ist.

Zunächst ist festzuhalten, dass wegen der Gleichartigkeit der beiden Kanäle die Zahl der zu fittenden Parameter die gleiche ist wie beim Ein-Kanal-Modell. In dieser Hinsicht bieten Zeitserien von zwei Kanälen also keine größeren Schwierigkeiten als solche von einem Kanal.

Der Unterschied zwischen Direktem Zeitserienfit und Betafit liegt in der Art der Informationsgewinnung. Der entscheidende Schritt beim Direkten Zeitserienfit ist die Zuordnung der einzelnen Messwerte zu den verschiedenen Zuständen des Markov-Modells. Die Zahl möglicher Zustände steigt exponentiell mit der Zahl der Kanäle an. Damit erhöhen sich die Schwierigkeiten einer korrekten Zuordnung besonders bei schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis beträchtlich.

Der Betafit hingegen verzichtet auf eine Betrachtung des einzelnen Zeitpunktes und bezieht sich stattdessen nur auf die Verteilung der Stromwerte über die gesamte Länge der Zeitreihe. Diese Verteilung hat jedoch einen größeren Informationsgehalt, wenn nicht zwischen nur zwei Niveaus gewechselt werden kann, sondern zusätzlich noch Sprünge auf ein drittes Stromniveau möglich sind. Diese zusätzlichen Informationen sind es vermutlich, die dazu führen, dass der Betafit Zeitserien mit zwei Kanälen besser fittet als solche mit einem Kanal.

7. Direkter Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion

7.1. Ansatzpunkt

In einem ersten Ansatz soll versucht werden, im Direkten Zeitreihenfit das Verfahren der Zuordnung der einzelnen Messwerte zu den Zuständen des Markov-Modells zu verbessern. Dazu soll in der Prädiktionsgleichung 4.5 die Tatsache berücksichtigt werden, dass das in digitalen Datenaufzeichnungsanlagen unvermeidbare Tiefpassfilter einer Änderung des Kanalstroms immer mit einer gewissen Trägheit folgt. Auf einen Sprung des Kanalstroms reagiert das in der Arbeitsgruppe verwendete Besselfilter vierter Ordnung bei einer Abknickfrequenz von 50 kHz mit der in Abbildung 7.1 dargestellten Sprungantwort.

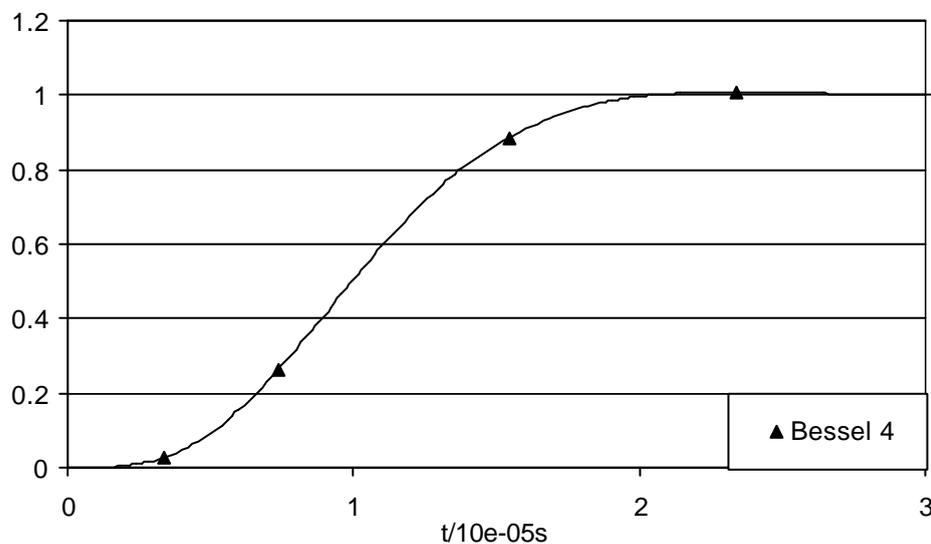


Abbildung 7.1: Sprungantwort des Besselfilters vierter Ordnung mit einer Abknickfrequenz von 50 kHz.

Den Strom, der tatsächlich durch den Kanal fließt, misst man am Filterausgang erst, wenn die Sprungantwort abgeklungen ist, also mit einer Verspätung von ungefähr $2 \cdot 10^{-5}$ s. Bei einer Abtastrate von 200 kHz werden in dieser Zeit 4 Werte abgespeichert. Bei jedem Sprung des Kanalstroms hat man also einige Messwerte am Filterausgang, die zwischen den Nominalniveaus liegen.

In Gleichung 7.1 ist die Prädiktionsgleichung 4.5 in der Form angegeben, die sie für die Wahrscheinlichkeit $a_k(O)$ des Ein-Kanal-Modells mit dem Geschlossen-Zustand C und dem Offen-Zustand O annimmt.

$$a_k(O) = a_{k-1}(j)p_{oo}f_o(y_k) + a_{k-1}(C)p_{co}f_o(y_k) \quad (7.1)$$

In dieser Gleichung wird die Filterantwort überhaupt nicht berücksichtigt. Vielmehr wird von einer durchgehenden Übereinstimmung von tatsächlichem Kanalstrom und Stromwert am Filterausgang ausgegangen. Tatsächlich stimmen die beiden nach einem Zustandswechsel aber erst dann wieder überein, wenn die Filterantwort vollständig abgeklungen ist.

Soll die Filterantwort in der Prädiktionsgleichung berücksichtigt werden, sind einige vereinfachende Annahmen unumgänglich, wenn der Rechenaufwand nicht zu sehr ansteigen soll. Als erste Näherung erscheint es sinnvoll, zwei Annahmen zu treffen: 1) Der Kanal wechselt nur zu den Abtastzeitpunkten zwischen verschiedenen Zuständen. 2) Die Filterantwort ist ein Abtastintervall nach dem Zustandswechsel zur Hälfte und zwei Abtastintervalle später vollständig abgeklungen. Damit zeichnet man zwar ein stark vereinfachtes Bild, man ist jedoch näher an der Wahrheit, als wenn man die Filterantwort gar nicht berücksichtigt.

Unter diesen Annahmen gibt es im Zwei-Zustands-Modell zwischen den Zeitpunkte $k-2$ und k nur vier verschiedene Wege, die tatsächlicher Kanalstrom und Stromwert am Filterausgang genommen haben können, wenn der Kanal zum Zeitpunkt k im Zustand O ist. Die folgende Abbildung zeigt diese Wege.

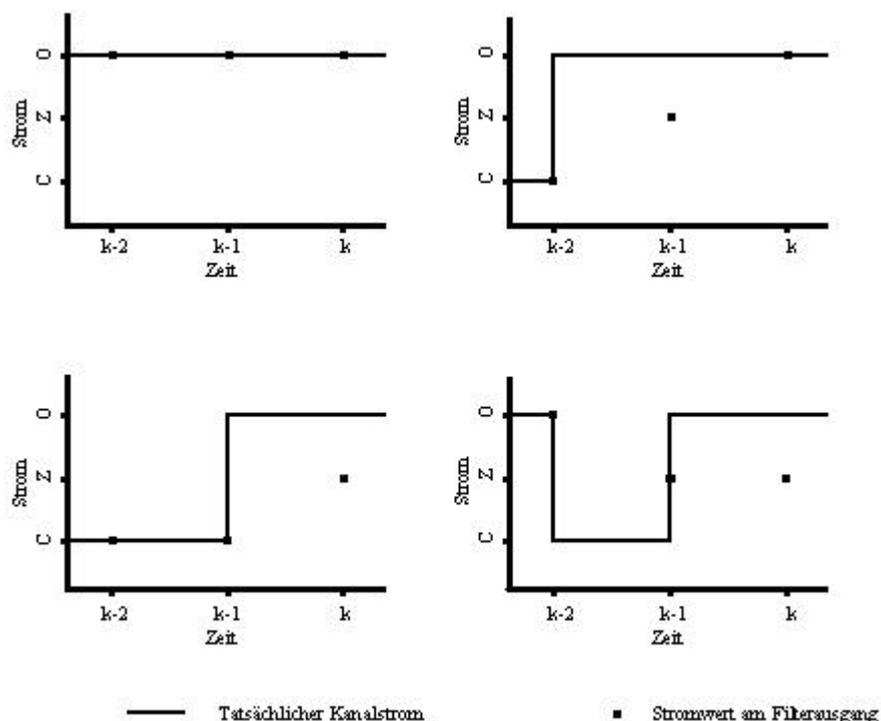


Abbildung 7.2: Vier verschiedene Möglichkeiten des Verlaufs von tatsächlichem Kanalstrom und Stromwert am Filterausgang zwischen den Zeitpunkten $k-2$ bis k , wenn der Kanal zum Zeitpunkt k im O-Zustand ist. Es sind zwei vereinfachende Annahmen getroffen: 1) Zustandswechsel finden nur zu den Abtastzeitpunkten statt. 2) Die Filterantwort klingt innerhalb von zwei Abtastzeitpunkten vollständig ab und befindet sich nach einem Abtastpunkt genau auf der Mitte Z zwischen altem und neuem Niveau.

Formaler ausgedrückt geht man also bei einem Sprung von C nach O zwischen $(k-1)\Delta t$ und $k\Delta t$ wird zum Zeitpunkt $k\Delta t$ von einem Messwert zwischen dem Nominalniveau $Y(C)$

des Zustandes C und dem Nominalniveau $Y(O)$ des Zustandes O aus, und erst zum Zeitpunkt $(k+1)\Delta t$ wird der Stromwert $Y(O)$ am Filterausgang angenommen.

Berücksichtigt man alle vier Wege, die der Strom zu den vorangegangenen zwei Zeitpunkten genommen haben, kommt man zu folgender Form der Prädiktionsgleichung 7.1:

$$a_k(O) = a_{k-1}(O)p_{oo} * (f_o(y_{k-1})f_o(y_k) + f_z(y_{k-1})f_o(y_k)) + a_{k-1}(C)p_{co} * (f_c(y_{k-1})f_z(y_k) + f_z(y_{k-1})f_z(y_k)) \quad (7.2)$$

Für die Wahrscheinlichkeit $a_k(O)$, dass sich der Kanal zum Zeitpunkt $k\Delta t$ im Zustand O befindet, werden also die Zeitpunkte $(k-1)\Delta t$ und $(k-2)\Delta t$ betrachtet, und es wird über die vier verschiedenen Wege aufaddiert, die der Strom seitdem genommen haben kann. Der Zustand zum Zeitpunkt $(k-2)\Delta t$ geht in der Form ein, dass mit der Verteilung f_z ein Zwischenwert zum Zeitpunkt $(k-1)\Delta t$ angenommen wird, wenn zwischen $(k-2)\Delta t$ und $(k-1)\Delta t$ ein Zustandswechsel stattgefunden hat, bzw. schon vom Nominalniveau des Zustandes zum Zeitpunkt $(k-1)\Delta t$ ausgegangen wird, wenn es keinen Wechsel gegeben hat.

Die Verteilung f_z , mit der die Zwischenwerte gewichtet werden, ist – genau wie die in Gleichung 4.3 angegebenen Verteilungen zur Gewichtung der Messwerte – eine Gaußverteilung. Ihr Maximum liegt allerdings nicht wie dort auf den Nominalniveaus der Zustände, sondern genau in der Mitte zwischen dem Nominalniveau Y_A des Ausgangszustandes und dem Nominalniveau Y_Z des Zielzustandes des Sprungs. Mit einem Effektivwert des Rauschens von σ_i nimmt f_z damit die folgende Form an:

$$f_z(y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} \exp\left(-\frac{(y - Y_A + \frac{1}{2}(Y_Z - Y_A))^2}{2\sigma_i^2}\right) \quad (7.3)$$

Für eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Direkten Zeitreihenfits mit Mehrschrittprädiktion wird er dem Reichweiten- und dem Rauschabhängigkeitstest unterzogen.

7.2. Reichweitentest

Um das Zeitaufklärungsvermögen des Direkten Zeitreihenfits mit Mehrschrittprädiktion beim Ein-Kanal-C/O-Modell festzustellen, wird der Reichweitentest aus Kapitel 5.2 durchgeführt. Die Ergebnisse für die Übergangsraten k_{oc} und k_{co} zeigt Abbildung 7.3. Zum Vergleich sind auch die Ergebnisse dargestellt, die der ursprüngliche Direkte Zeitreihenfit für die gleichen Modelle liefert.

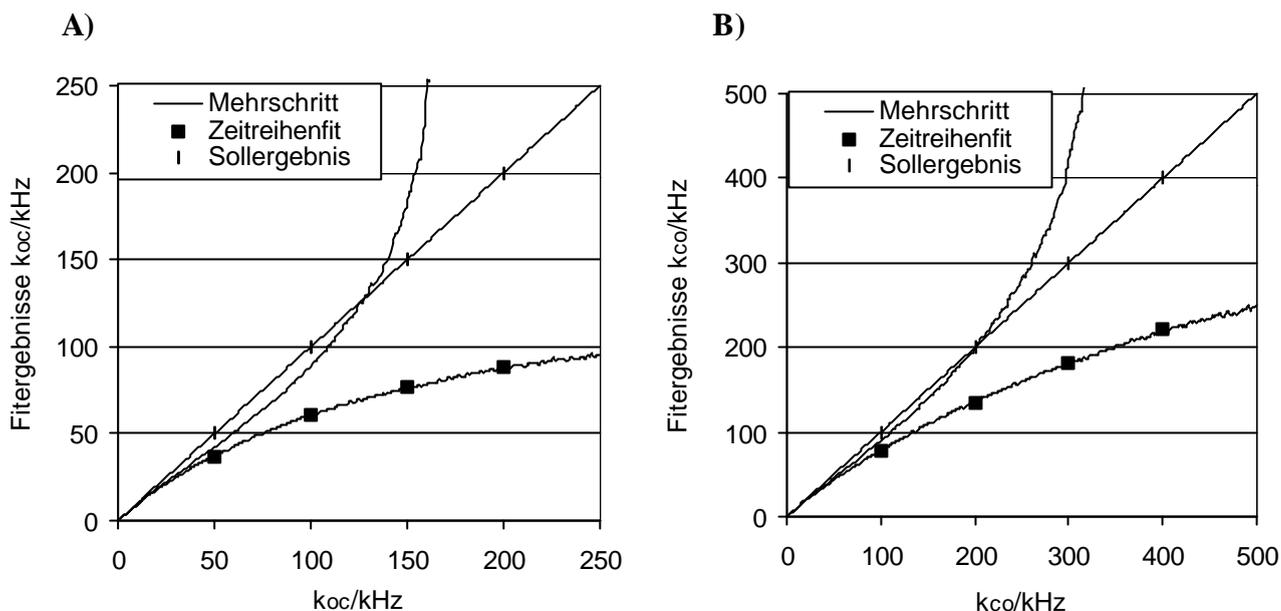


Abbildung 7.3: Ergebnisse von Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion und ursprünglichem Direktem Zeitreihenfit beim Reichweitentest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 10, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=n \cdot 1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=n \cdot 2$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Solange die schnellere Übergangsrate k_{co} 200 kHz nicht überschreitet, liegen die Ergebnisse mit Mehrschrittprädiktion deutlich näher bei den Sollergebnissen als die Ergebnisse des ursprünglichen Verfahrens, mit dem man durchgehend zu niedrige Ergebnisse erhält. Bei schnelleren Übergangsraten entfernen sich auch die Ergebnisse mit Mehrschrittprädiktion von den Sollergebnissen und liegen dann wesentlich zu hoch.

Eine deutlichere Verbesserung erzielt man mit dem neuen Verfahren, wenn die beiden Zustände des Ein-Kanal-C/O-Modells sehr unterschiedliche Besetzungswahrscheinlichkeiten haben. Um dieses zu zeigen, werden die in Abbildung 7.4 dargestellten Modelle gefittet.

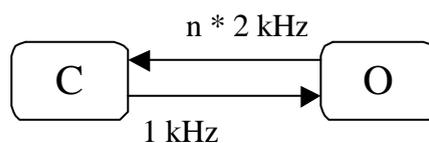


Abbildung 7.4: Ein-Kanal-C/O-Modelle des Reichweitentests ($n=1 \dots 250$).

Abgesehen davon, dass die Rate k_{oc} nun immer den Wert 1 kHz hat, entsprechen die Bedingungen dem Reichweitentest. Die Ergebnisse, die ursprünglicher Direkter Zeitreihenfit und Direkter Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion bei den in Abbildung 7.4 dargestellten Modellen liefern, zeigt Abbildung 7.5.

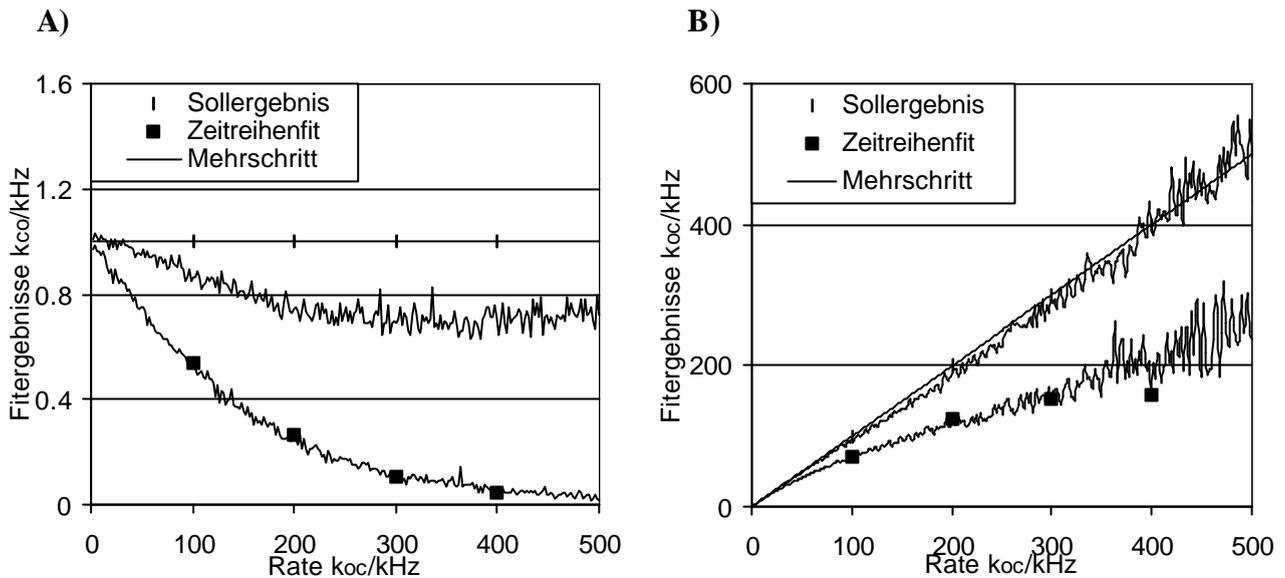


Abbildung 7.5: Ergebnisse von Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion und ursprünglichem Direktem Zeitreihenfit beim Reichweitentest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 10, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=n \cdot 2$ kHz. Es wurden jeweils 250 simulierte Zeitreihen von den Modellen aus Abbildung 7.4 ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{oc} .

Die Ergebnisse mit Mehrschrittprädiktion für k_{oc} decken sich im gesamten Bereich praktisch mit den Sollergebnissen. Rate k_{co} ist deswegen schwierig für die Fitverfahren zu entdecken, weil wegen der geringen Besetzungswahrscheinlichkeit des C-Zustandes nur sehr wenige Messwerte im Bereich des Nominalniveaus des C-Zustandes liegen. Trotzdem weichen die Ergebnisse des Zeitreihenfits mit Mehrschrittprädiktion für k_{co} nie um mehr als 25% von den Sollergebnissen ab.

Der ursprüngliche Direkte Zeitreihenfit hingegen liefert sowohl für k_{co} als auch für k_{oc} durchgehend zu niedrige Ergebnisse. Bisher kann man also durchaus von einer Verbesserung sprechen, die man mit der Mehrschrittprädiktion im Vergleich zur Einschrittprädiktion erzielt.

Alle Zeitreihen, die in diesem Abschnitt gefittet wurden, hatten aber ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10 und befanden sich damit am oberen Rand dessen, was bei tatsächlichen Messungen erreicht werden kann. Schwächen zeigt der Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion, wenn er die Übergangsraten aus Zeitreihen mit schlechterem SNR gewinnen soll, wie der folgende Rauschabhängigkeitstest zeigt.

7.3. Rauschabhängigkeitstest

Mittels des in Kapitel 5.3 beschriebenen Rauschabhängigkeitstests soll herausgefunden werden, wie sehr sich die Ergebnisse eines Fitverfahrens verschlechtern, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter wird. Von den beiden in Abbildung 5.2 dargestellten Modellen wird hier nur das Modell mit den langsamen Übergangsraten von 5 kHz und 10 kHz gefittet. Ein Fitten des anderen Modells hätte wenig Sinn, weil der Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion bei Übergangsraten von $k_{oc}=200$ kHz und $k_{co}=400$ kHz schon bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis fernab von den Sollergebnissen liegt, wie Abbildung 7.3 zeigt.

Die Ergebnisse, die mit Einschritt- und Mehrschrittprädiktion erreicht werden, stellt die folgende Abbildung dar.

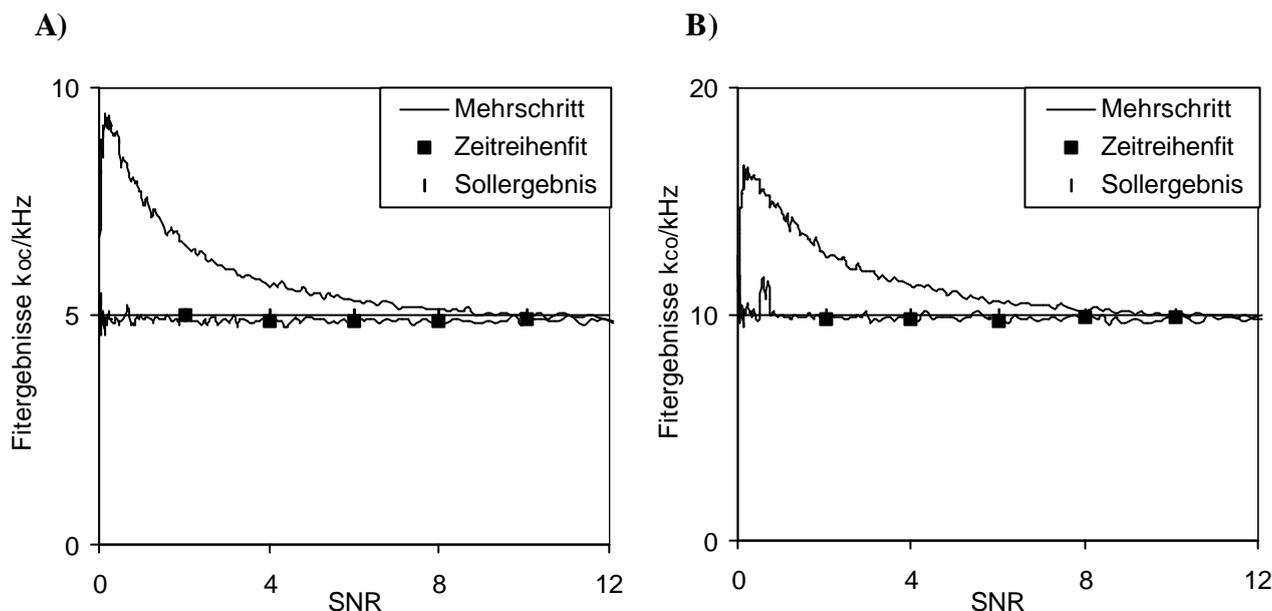


Abbildung 7.6: Ergebnisse von Zeitreihenfit mit Mehrschrittprädiktion und ursprünglichem Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=5$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=10$ kHz. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Erwünscht sind Ergebnisse, wie sie der ursprüngliche Direkte Zeitreihenfit liefert. Für beide Raten zeigen sie keine Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis und stimmen darüber hinaus sehr exakt mit den Sollergebnissen überein.

Die Resultate des Direkten Zeitreihenfits mit Mehrschrittprädiktion liegen dagegen erst ab einem Signal-Rausch-Verhältnis von 8 in der Nähe der Sollergebnisse. Bei schlechterem SNR erhält man zu hohe Übergangsraten als Ergebnis.

Eine derart ausgeprägte Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis ist für die Auswertung echter Messreihen nicht hinnehmbar. Aufnahmen mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, stellt eines der Hauptprobleme bei Patch-Clamp-Messungen dar. Eine Modifikation des Direkten Zeitreihenfits, die dazu führt, dass die Anforderungen an das Signal-Rausch-Verhältnis schon bei so kleinen Übergangsraten erheblich ansteigen, ist folglich selbst dann als Verschlechterung zu bewerten, wenn sich die Filtergebnisse in Teilbereichen verbessern. Der Ansatz, den Direkten Zeitreihenfit dadurch zu verbessern, dass bei der Messwertprädiktion mehrere zurückliegende Messpunkte berücksichtigt werden, wird deswegen an dieser Stelle verworfen.

Der Grund für das Scheitern des Zeitreihenfits mit Mehrschrittprädiktion bei schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis liegt vermutlich darin, dass die Prädiktionsgleichung 7.2 durch die Verteilungen $f_z(y)$ den Messwerten zwischen den Nominalniveaus der Zustände mit erhöhter Wahrscheinlichkeit einen Zustandswechsel zuordnet. Wenn aber bei einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis schon allein durch das Rauschen viele Messwerte zwischen den Nominalniveaus liegen, wird für zu viele Zeitpunkte ein Zustandswechsel angenommen und man erhält im Ergebnis zu hohe Übergangsraten. Dies ist genau die Beobachtung, die man in Abbildung 7.6 macht.

Weiterhin liegt man zwar mit der Annahme eines Zwischenwertes am Filterausgang bei jedem Zustandswechsel näher an der Wirklichkeit, als wenn man ausschließlich von Werten auf den Nominalniveaus ausgeht, von den tatsächlichen Begebenheiten ist man aber immer noch weit entfernt. Der Kanal ist nämlich nicht auf Zustandswechsel zu den Abtastzeitpunkten beschränkt, sondern er kann auch zwischen den Abtastzeitpunkten beliebig oft hin- und herwechseln. Dieses ist aber eine Möglichkeit, die mit einer Mehrschrittprädiktion nicht nachgebildet werden kann.

8. Betafit für Filter höherer Ordnung

8.1. Ansatzpunkt

Nachdem die Verbesserung des Direkten Zeitreihenfits mit Hilfe einer Mehrschrittprädiktion nicht gelungen ist, richtet sich das Augenmerk nun auf den Betafit. Der Betafit ist, wie in Kapitel 6 gezeigt, besser geeignet für die Auswertung schneller Übergangsraten als der Direkte Zeitreihenfit, weil die Abweichung des Amplitudenhistogramms von der Normalverteilung je größer ist, desto mehr Schaltereignisse stattfinden. Allerdings ist das Verfahren von Rießner (1998) auf Filter erster Ordnung beschränkt und damit vorwiegend von akademischem Interesse. In Aufzeichnungsanlagen werden nämlich wegen des günstigeren Frequenzganges (steiler Übergang vom Durchlass- in den Dämpfungsbereich) Filter höherer Ordnung verwendet.

Ziel dieses Kapitels ist es, einen Erweiterten Betafit für Filter höherer Ordnung zu entwickeln.

Bisher können nur Amplitudenhistogramme von Filtern erster Ordnung mit Hilfe der Theorie der Betaverteilungen berechnet werden (Rießner, 1994, 1998). Eine Erweiterung dieser Theorie auf Filter höherer Ordnung ist nicht ohne weiteres möglich, weil sich nur Filter erster Ordnung einfach als Markov-Prozess darstellen lassen.

Um die Theorie der Betaverteilungen von Filtern erster Ordnung dennoch auf Filter höherer Ordnung anwenden zu können, hat Yellen (1984) einen Skalierungsfaktor für die Abknickfrequenz des Filters erster Ordnung eingeführt. Mit diesem Skalierungsfaktor kann aber nur unter sehr eng begrenzten Voraussetzungen eine Annäherung der Amplitudenhistogramme erreicht werden. Im allgemeinen haben die Amplitudenhistogramme von Filtern höherer Ordnung eine eigene charakteristische Form, die sich der Annäherung mittels Korrekturfaktoren entzieht (Harlfinger, 2000). Es ist deswegen nicht möglich, den Anwendungsbereich des bisherigen Betafits mit Hilfe von Korrekturfaktoren auf Filter höherer Ordnung zu erweitern.

Der Weg, der hier verfolgt werden soll, besteht darin, die Amplitudenhistogramme durch Simulation zu bestimmen. Oben (in Kapitel 5.1) wurde das in der Arbeitsgruppe vorhandene Programm zur Simulation von Zeitreihen beschrieben. Aus einer simulierten Zeitreihe kann das Amplitudenhistogramm durch Abzählen gewonnen werden (siehe Kapitel 4.3). Eine derartige Bestimmung des Amplitudenhistogramms durch Simulation nimmt im Vergleich zur analytischen Berechnung einer Betaverteilung ein Vielfaches an Rechenzeit in Anspruch. Der Fortschritt der Rechnergeschwindigkeit in den letzten Jahren lässt den Weg inzwischen dennoch gangbar erscheinen.

8.2. Simulation des Amplitudenhistogramms

8.2.1. Einzelkanal

Den Ausgangspunkt für die Simulation der Amplitudenhistogramme bildet das in Kapitel 5.1 beschriebene Programm zur Zeitreihensimulation. Dieses wird hier verwendet, um die unverrauschte Zeitreihe eines einzelnen Kanals zu erzeugen. Durch Abzählen gewinnt man daraus das Amplitudenhistogramm $A_{1\text{-Kanal}}$ des unverrauschten Einzelkanals.

Anders als bei der normalen Zeitreihensimulation stören im Betafit jedoch die statistischen Abweichungen, die aus der Verwendung von Zufallszahlen resultieren. Diese Zufallszahlen bewirken, dass man – selbst bei rauschfreien Zeitreihen – bei mehrmaligem Simulieren des gleichen Modells jeweils unterschiedliche Zeitreihen und damit leicht voneinander abweichende Amplitudenhistogramme erhält. Es existiert kein exaktes Minimum der Abweichung zwischen gemessenem und simuliertem Amplitudenhistogramm, was dazu führt, dass der Fitalgorithmus nicht sicher konvergiert. Ziel ist es deswegen, diese statistischen Abweichungen so weit wie möglich zu eliminieren.

In dem Simulationsalgorithmus (siehe Kapitel 5.1) werden zwei Zufallszahlen n_1 und n_2 verwendet. Aus n_1 wird die Länge des Aufenthalts im aktuellen Zustand bestimmt, aus n_2 der Zielzustand des nächsten Sprungs gewonnen. Den größten Einfluss auf die Form des Amplitudenhistogramms hat n_1 . Die Bestimmung der Aufenthaltslängen mit Hilfe von Zufallszahlen bewirkt es nämlich, dass bei einer vorgegebenen Länge der Zeitreihe die Zahl der Sprünge bei ansonsten exakt gleichen Voraussetzungen erheblich variiert. So können in einer simulierten Zeitreihe, in der bei vorgegebener Länge und Übergangsraten durchschnittlich 1000 Sprünge stattfinden sollten, bei der ersten Simulation nur 950 Sprünge stattgefunden haben und in der nächsten 1050. Gerade die Anzahl der Sprünge ist aber maßgeblich für die Form des Amplitudenhistogramms, da nur durch Sprünge Messwerte zwischen den Nominalniveaus erzeugt werden.

Das Simulationsprogramm ist deswegen dahingehend abzuwandeln, dass bei mehrmaligem Erzeugen von Zeitreihen eines bestimmten Markov-Modells immer die gleiche Anzahl von Sprüngen simuliert wird. Dazu wird zunächst aus der Matrix der Übergangsraten des Markov-Modells die Zahl der Sprünge zwischen den einzelnen Zuständen bestimmt. Die Zahl der Sprünge S_{ij} vom Zustand i in den Zustand j berechnet sich als Produkt aus der Übergangsrate k_{ij} , der Besetzungswahrscheinlichkeit ρ_i des Zustandes i und der Gesamtlänge T der Zeitreihe:

$$S_{ij} = k_{ij} * \rho_i * T \quad (8.1)$$

Die Anzahl der Aufenthalte N_j im Zustand j ist gleich der Summe über alle Sprünge mit dem Zielzustand j :

$$N_j = \sum_{i,i \neq j} S_{ij} \quad (8.2)$$

Die Aufenthaltslängen t_n dieser N_j Aufenthalte im Zustand j lassen sich aus der Verteilung der Aufenthaltslängen (siehe Gleichung 5.1) gewinnen. Es gilt:

$$\frac{n}{N_j} = e^{-k_{rr} t_n} \Rightarrow -\frac{1}{k_{rr}} \ln \left(\frac{n}{N_j} \right) = t_n \quad (n = 0 \dots N_j) \quad (8.3)$$

Mit Hilfe dieser Gleichungen können aus der Übergangsmatrix sowohl die Anzahl der Sprünge als auch die Aufenthaltslängen in den Zuständen bestimmt werden.

Ganz ohne Zufallszahlen kommt man dennoch nicht aus. Simulationen haben nämlich gezeigt, dass die Form des Amplitudenhistogramms auch davon beeinflusst wird, in welcher Abfolge kurze und lange Aufenthalte aufeinanderfolgen. Die Bestimmung der Reihenfolge der Aufenthaltslängen erfolgt deswegen weiterhin mit Hilfe einer Zufallszahl. Die von dieser Zufallszahl verursachte Variabilität der Amplitudenhistogramme ist aber so gering, dass die Konvergenz des Fitalgorithmus nicht mehr beeinträchtigt wird.

8.2.2. Mehrere Kanäle

Für den Erweiterten Betafit ist es ausreichend, das unverrauschte Amplitudenhistogramm des Einzelkanals zu simulieren. Das Histogramm mehrerer Kanäle sowie die verrauschte Verteilung können daraus mit Hilfe von Faltungintegralen gewonnen werden.

Zunächst ist der Schritt von der unverrauschten Verteilung des Einzelkanals auf die unverrauschte Verteilung mehrerer Kanäle zu vollziehen. Dies geschieht durch Faltung der aus der Simulation bekannten unverrauschten Verteilung $A_{1\text{-Kanal}}$ des unverrauschten Einzelkanals mit sich selbst. Durch die erste Faltung erhält man das unverrauschte Amplitudenhistogramm $A_{2\text{-Kanal}}$ einer Zeitreihe von zwei Kanälen:

$$A_{2\text{-Kanal}}(I) = \int A_{1\text{-Kanal}}(u) * A_{1\text{-Kanal}}(I-u) du \quad (8.4)$$

Durch weitere Faltungen der so erzeugten Verteilung mit $A_{1\text{-Kanal}}$ kann sukzessive das unverrauschte Amplitudenhistogramm $A_{n\text{-Kanal}}$ einer Zeitreihe mit n Kanälen erzeugt werden.

8.2.3. Rauschen

Vom tatsächlichen Amplitudenhistogramm A_{gesamt} unterscheidet sich $A_{n\text{-Kanal}}$ noch dadurch, dass der Einfluss des Rauschens nicht berücksichtigt ist. In dieser Arbeit wird durchgängig von der vereinfachenden Annahme ausgegangen, dass die Aufnahmeapparatur ein weißes Rauschen erzeuge, in dem alle Frequenzen in gleicher Intensität enthalten sind. Weißes Rauschen hat auf die Verteilung der Stromwerte den gleichen Effekt, wie die Faltung mit einer Gaußverteilung. Bei einem Effektivwert des Rauschens von σ erhält man das Amplitudenhistogramm A_{gesamt} also durch:

$$A_{\text{gesamt}}(I) = \int A_{n\text{-Kanal}}(u) * R(I-u) du \quad \text{mit} \quad R(u) = \frac{1}{\sqrt{2ps}} e^{-\frac{u^2}{2s^2}} \quad (8.5)$$

Tatsächlich entsteht bei Patch-Clamp-Messungen jedoch blaues Rauschen, bei dem die Intensität mit der Frequenz ansteigt. Diese Tatsache soll kurz anhand der bekannten Verstärkungsformel des gegengekoppelten Operationsverstärkers (z.B. Tietze und Schenk, 1971) erklärt werden. Die Eingangsspannung U_e – hier das Rauschen der Emitter-Basis-Strecke des ersten Transistors – wird bei bekanntem Eingangswiderstand R_e und Ausgangswiderstand R_a folgendermaßen zur Ausgangsspannung U_a verstärkt:

$$U_a = \frac{R_a + R_e}{R_e} U_e \quad (8.6)$$

Bei Patch-Clamp-Messungen besteht der Eingangswiderstand hauptsächlich aus dem durch die Kapazität C der Pipette bestimmten Widerstand $R_e=1/j\omega C$ (Haak, 2000). Die Verstärkerformel 8.6 nimmt für große Frequenzen ω folgende Form an:

$$U_a = \frac{R_a + 1/j\omega C}{1/j\omega C} U_e \approx j\omega R_a C * U_e \quad (8.7)$$

Das weiße Rauschen der Eingangsstufe des Operationsverstärkers wird folglich proportional der Frequenz ω verstärkt und ergibt im Ausgangssignal blaues Rauschen.

Für den Zweck dieser Arbeit ist es dennoch sinnvoll, von weißem Rauschen auszugehen, weil auf diese Weise die Aussagen über die Leistungsfähigkeit verschiedener Fitverfahren besser verglichen werden können.

8.3. Leistungsfähigkeit bei Ein-Kanal-Zeitreihen

8.3.1. Reichweitentest

Die Leistungsfähigkeit des Erweiterten Betafits zu bestimmen, ist das Thema für den Rest dieses Kapitels. Alle vom Erweiterten Betafit ausgewerteten Zeitreihen sind gefiltert mit einem Besselfilter vierter Ordnung, der auch für die Messaufnahmen der Arbeitsgruppe verwendet wird.

Als Vergleichsmaßstab sind zusätzlich jeweils auch die Ergebnisse des bisherigen Betafits für Filter erster Ordnung dargestellt. Bis auf die Tatsache, dass die von letzterem Verfahren ausgewerteten Zeitreihen mit einem Filter erster Ordnung gefiltert sind, sind die Parameter der ausgewerteten Zeitreihen gleich.

Aussagen über das Zeitaufklärungsvermögen bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis liefert wie auch schon in den vorherigen Kapiteln der Reichweitentest aus Kapitel 5.2. Abbildung 8.1 zeigt die Ergebnisse des Erweiterten Betafits im Vergleich mit den Ergebnissen des bisherigen Verfahrens erster Ordnung.

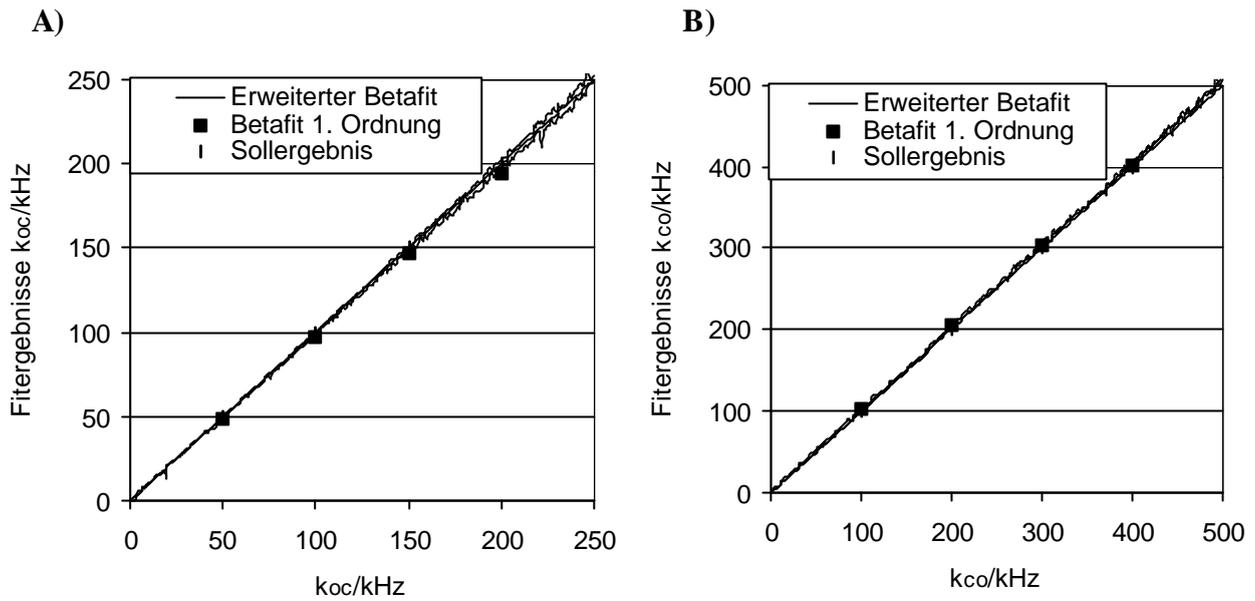


Abbildung 8.1: Ergebnisse von bisherigem und Erweitertem Betafit beim Reichweitentest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster bzw. vierter Ordnung 50 kHz, SNR 10, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=n \cdot 1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=n \cdot 2$ kHz, $n=1 \dots 250$. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Wie erhofft stimmen die Ergebnisse von Erweitertem und bisherigem Betafit exakt überein. Eine Abweichung von den Sollergebnissen ist praktisch nicht zu erkennen.

8.3.2. Rauschabhängigkeitstest

Erwartungsgemäß nehmen genau wie beim bisherigen auch beim Erweiterten Betafit die Schwierigkeiten zu, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter wird. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse beider Verfahren beim in Kapitel 5.3 beschriebenen Rauschabhängigkeitstest dargestellt.

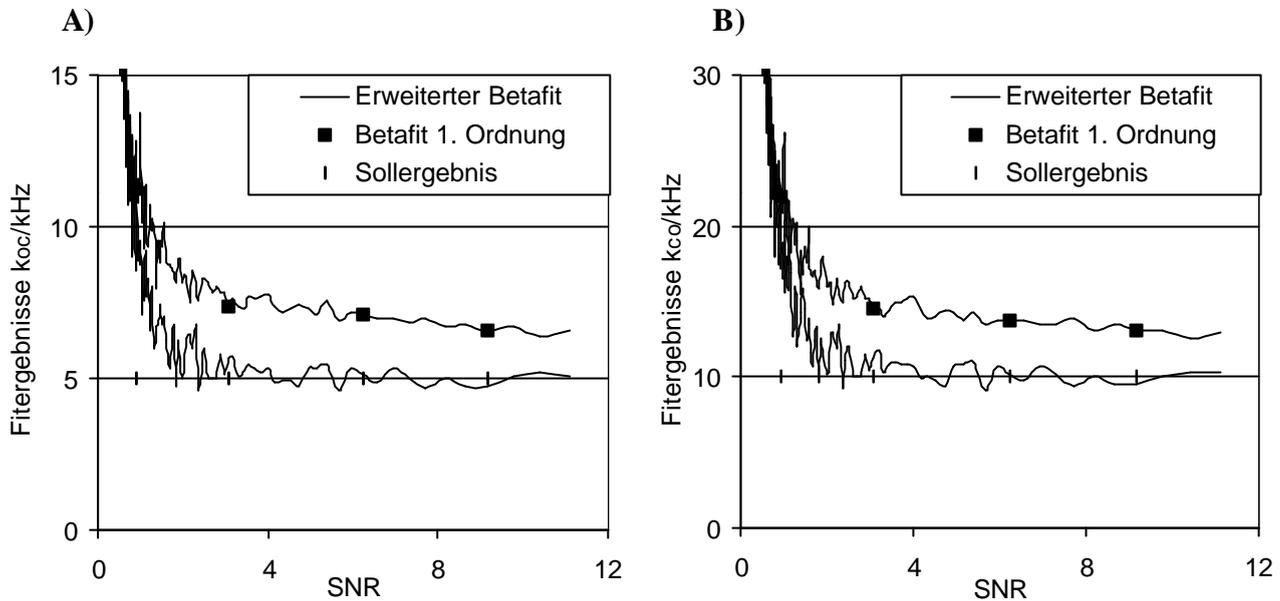


Abbildung 8.2: Ergebnisse von bisherigem und Erweitertem Betafit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster bzw. vierter Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=5$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=10$ kHz. Es wurden 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

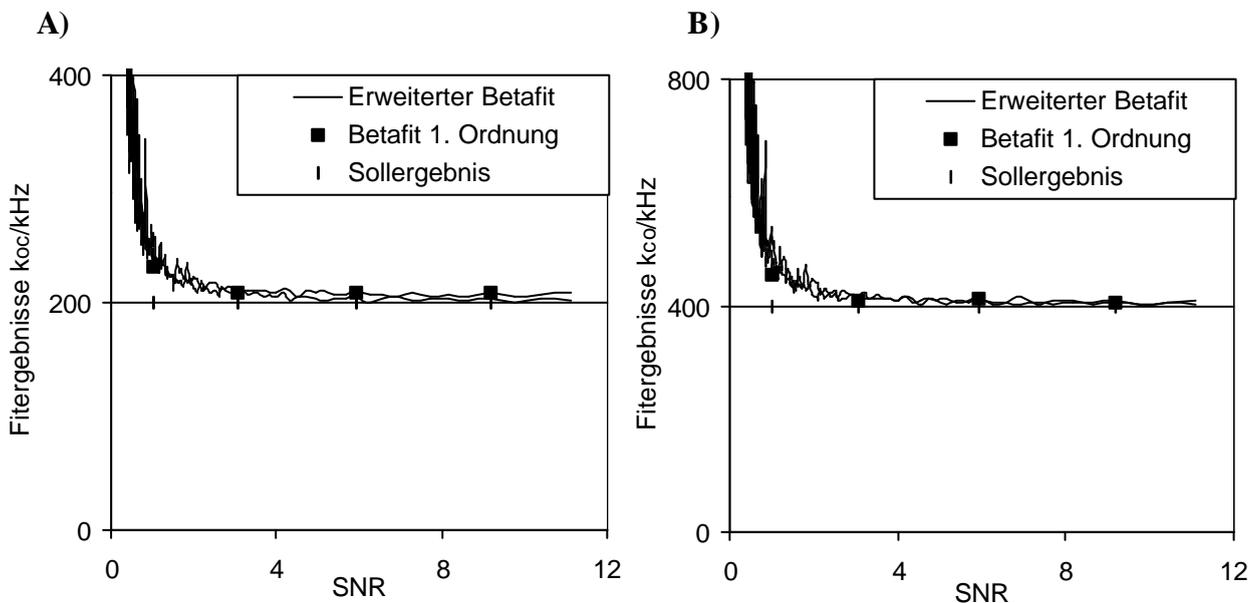


Abbildung 8.3: Ergebnisse von bisherigem und Erweitertem Betafit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster bzw. vierter Ordnung 50 kHz, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=200$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=400$ kHz. Es wurden 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Bei den schnellen Übergangsraten von 200/400 kHz zeigt sich kein Unterschied zwischen den Ergebnissen von Erweitertem Betafit und Betafit für Filter erster Ordnung. Beide Verfahren erkennen die Raten präzise, sofern das Signal-Rausch-Verhältnis besser als vier ist. Bei schlechterem Signal-Rausch-Verhältnis werden zu große Übergangsraten angenommen. Die charakteristische Form des Amplitudenhistogramms ist dann nahezu vollständig vom Rauschen überlagert.

Auch die langsamen Übergangsraten von 5/10 kHz werden von beiden Verfahren je besser erkannt desto größer das Signal-Rausch-Verhältnis ist. Allerdings liegen hier die Ergebnisse des erweiterten Verfahrens durchgängig näher an den Sollergebnissen als die des bisherigen Betafits.

Diese Beobachtung erklärt sich vermutlich durch den unterschiedlichen Einfluss der beiden Filter auf das Amplitudenhistogramm. Das Besselfilter erster Ordnung bewirkt vorwiegend eine Verbreiterung der Peaks auf den tatsächlichen Stromniveaus, während das Besselfilter vierter Ordnung eher eine Konzentration von Stromwerten in der Mitte zwischen beiden Niveaus zur Folge hat, wie die folgende Abbildung zeigt. Der besseren Anschaulichkeit wegen ist der Effekt hier bei im Vergleich zur Abknickfrequenz schnellen Übergangsraten dargestellt. In vermindertem Ausmaß tritt er auch bei langsamen Übergangsraten auf.

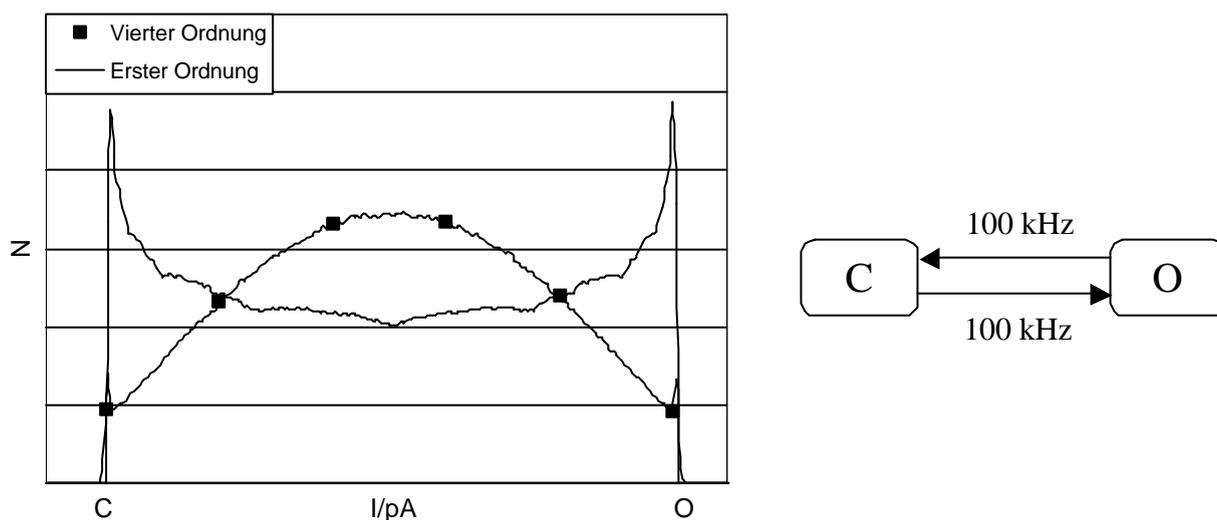


Abbildung 8.4: Vergleich der Amplitudenhistogramme von Besselfilter erster und vierter Ordnung. Simuliert wurden zwei rauschfreie Zeitreihen des rechts dargestellten Zwei-Zustands-Modells. Abtastrate 100 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster bzw. vierter Ordnung 20 kHz.

Damit hat das Amplitudenhistogramm des Filters vierter Ordnung eine charakteristische Form, die auch bei kleinen Übergangsraten und schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis ein Erkennen der Übergangsraten noch ermöglicht.

Ein weiterer Effekt, der zur größeren Unempfindlichkeit gegenüber dem Signal-Rausch-Verhältnis beitragen dürfte, ist der, dass die Besselfilter höherer Ordnung einen größeren Anteil des hochfrequenten Rauschens vernichten.

8.3.3. Fünf-Zustands-Modell

Dieser Abschnitt soll zeigen, was der Erweiterte Betafit beim Fünf-Zustands-Modell zu leisten in der Lage ist. Dazu werden wieder die bekannten Modelle aus Abbildung 5.4 gefittet, bei denen k_{og} in 250 Schritten von 2 kHz auf 500 kHz erhöht werden, während die anderen Übergangsraten bei den dort angegebenen Werten konstant gehalten werden. Startwerte für den Fit sind wie immer die tatsächlichen Übergangsraten.

Abbildung 8.5.A zeigt die Ergebnisse für k_{og} . Exemplarisch für die konstanten Raten sind in Abbildung 8.5.B die Ergebnisse für k_{cg} dargestellt. Analoge Beobachtungen lassen sich bei den übrigen konstanten Raten ebenfalls machen.

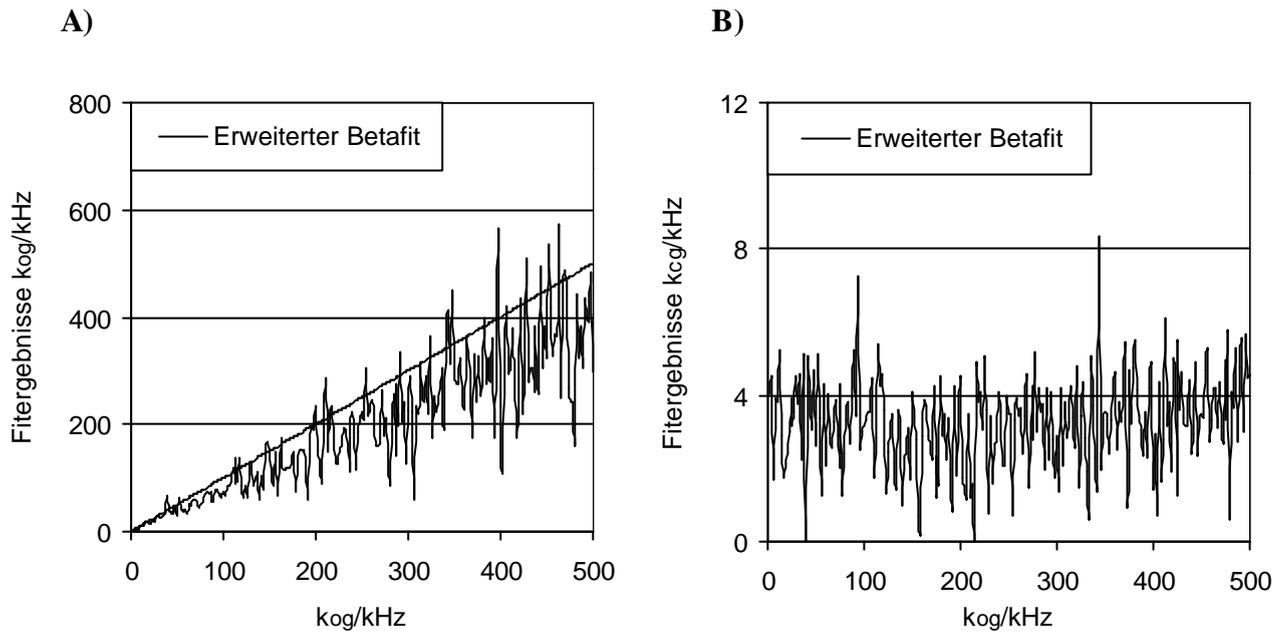


Abbildung 8.5: Ergebnisse des Erweiterten Betafits beim Fünf-Zustands-Modell, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 4, A) Sollergebnis Rate $k_{og}=n*2$ kHz, $n=1...250$, B) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

Beide Raten werden im Mittel etwas zu niedrig geschätzt, und die Ergebnisse streuen stärker als beim Zwei-Zustands-Modell. Dies stimmt überein mit den Resultaten, die der bisherige Betafit bei mit Filtern erster Ordnung gefilterten Zeitreihen des Fünf-Zustands-Modells geliefert hat (siehe Abbildung 6.6).

8.4. Leistungsfähigkeit bei Zwei-Kanal-Zeitreihen

Auch bei Zeitreihen von zwei Kanälen erreicht der Erweiterte Betafit die Leistungsfähigkeit des bisherigen Betafits für Filter erster Ordnung. Auf eine Darstellung der Ergebnisse bei Reichweitentest und Rauschabhängigkeitstest wird hier verzichtet und stattdessen auf die Abbildungen 6.7 – 6.9 verwiesen, die die Ergebnisse des bisherigen Betafits zeigen.

Wegen der größeren Praxisrelevanz nicht verzichtet wird auf die Darstellung der Ergebnisse bei zwei gleichartigen Kanälen von den Fünf-Zustands-Modellen aus Kapitel 5.4.

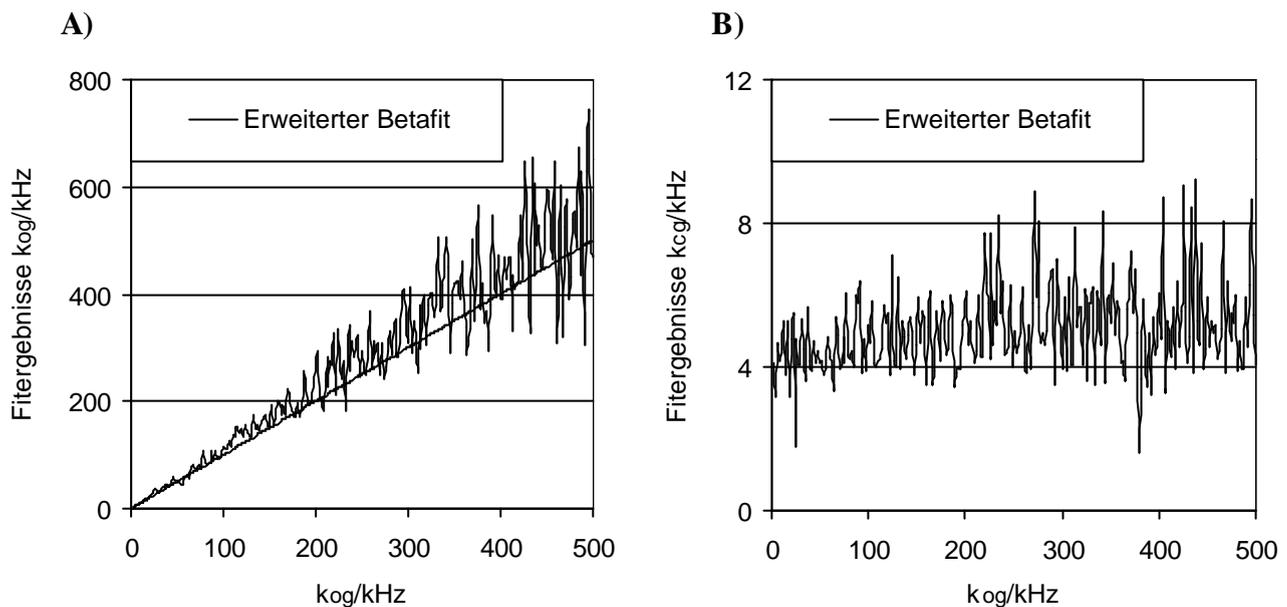


Abbildung 8.6: Ergebnisse des Erweiterten Betafits bei zwei gleichartigen Kanälen mit je fünf Zuständen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 4, A) Sollergebnis Rate $k_{og} = n \cdot 2$ kHz, $n = 1 \dots 250$, B) Sollergebnis Rate $k_{og} = 4$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

Es zeigt sich das bekannte Bild. Die Ergebnisse streuen deutlich, treffen aber im Mittel recht genau die tatsächlichen Übergangsraten.

Insgesamt ist der neu eingeführte Betafit für Filter höherer Ordnung damit genauso leistungsfähig wie der bisherige Betafit bei mit Filtern erster Ordnung gefilterten Zeitreihen. Die Einführung eines Erweiterten Betafits für Filter höherer Ordnung ist also gelungen.

Da mit dem Erweiterten Betafit mit beliebigen Filtern erzeugte Amplitudenhistogramme angefitet werden können, das Leistungsspektrum des bisherigen Verfahrens für Filter erster Ordnung also vollständig in dem neuen Verfahren enthalten ist, wird das erweiterte Verfahren im folgenden allgemein als Betafit bezeichnet.

Zu beachten ist, dass der Betafit grundsätzlich Messreihen von hoher Qualität erfordert. So führt beispielsweise bereits eine leichte Drift in der Aufnahme mit der daraus resultierenden Verfälschung des Amplitudenhistogramms dazu, dass ein exaktes Anfiten des Amplitudenhistogramms unmöglich wird. Weiterhin ist eine sehr exakte Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses erforderlich. Auch eine Fehleinschätzung des Signal-Rausch-Verhältnisses verhindert das exakte Anfiten des Amplitudenhistogramms. Es ist aus diesen Gründen immer erforderlich, mittels Simulation zu überprüfen, ob das mit dem gefitteten Markov-Modell erzeugte Amplitudenhistogramm mit dem gemessenen übereinstimmt.

9. Joint-Fit-Strategie

9.1. Ansatzpunkt

Mit dem Direkten Zeitreihenfit und dem neuen Betafit für Filter höherer Ordnung existieren zwei Verfahren zur Auswertung von Patch-Clamp-Messungen, die sehr unterschiedliche Stärken und Schwächen haben. Der Direkte Zeitreihenfit erkennt langsame Übergangsraten und ist unempfindlicher gegenüber einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Der Betafit dagegen ist besonders geeignet für die Detektion schnellen Schaltens. Ziel ist es nun, den Direkten Zeitreihenfit und den Betafit zu einem Verfahren zu verschmelzen in der Hoffnung, auf diese Weise die Vorteile beider Verfahren zu kombinieren.

Beim Direkten Zeitreihenfit werden die Übergangsraten so variiert, dass eine möglichst große Übereinstimmung mit der Zeitreihe erzeugt wird, während das Amplitudenhistogramm überhaupt nicht beachtet wird. Der Betafit dagegen zielt ausschließlich auf das Amplitudenhistogramm ab und lässt die Zeitreihe beiseite liegen. Werden nun mit Hilfe einer sogenannten Joint-Fit-Strategie Amplitudenhistogramm und Zeitreihe gleichzeitig angefitet, ist es zu erwarten, dass diese Verbreiterung der Informationsgrundlage zu einer Verbesserung der Ergebnisse führt.

Umgesetzt wird diese Idee auf folgende Weise. Im Direkten Zeitreihenfit wird die Likelihood L aus Gleichung 4.8 maximiert. Der Betafit hingegen minimiert die mittels eines χ^2 -Tests festgestellte Abweichung von gemessenem und simuliertem Amplitudenhistogramm. Im Joint-Fit-Verfahren soll der Quotient dieser beiden Werte minimiert werden:

$$\frac{c^2}{L} \rightarrow Min. \quad (9.1)$$

Da L zum Teil sehr große Werte annimmt, wird in der Praxis der natürliche Logarithmus des Quotienten betrachtet :

$$\ln\left(\frac{c^2}{L}\right) = \ln c^2 - \ln L \rightarrow Min. \quad (9.2)$$

Zwischen dem natürlichen Logarithmus von χ^2 und dem natürlichen Logarithmus von L liegen mehrere Größenordnungen. Um sicherzustellen, dass das Anfiten des Amplitudenhistogramms gegenüber dem Anfiten der Zeitreihe nicht völlig bedeutungslos bleibt, muss $\ln(\chi^2)$ gegenüber $\ln(L)$ höher gewichtet werden. Dies geschieht durch die Einführung eines Gewichtungsfaktors g :

$$g * \ln c^2 - \ln L \rightarrow Min. \quad (9.3)$$

Da die analytische Bestimmung eines Idealwertes für g nicht möglich erscheint, muss ein geeigneter Wert auf empirischem Wege gefunden werden.

9.2. Gewichtungsfaktor

Das Ziel ist es, den Gewichtungsfaktor so zu bestimmen, dass Betafit und Direkter Zeitreihenfit einen gleich starken Einfluss auf das Ergebnis haben. Damit ist sichergestellt, dass das gefittete Markov-Modell weder zur Zeitreihe noch zum Amplitudenhistogramm in Widerspruch steht.

Das Joint-Fit-Verfahren mit einem Gewichtungsfaktor von $g=0$ entspricht genau dem Direkten Zeitreihenfit, während ein sehr großer Wert für g das Joint-Fit-Verfahren zum Betafit werden lässt. Welcher Wert für g zwischen diesen beiden Extremen dazu führt, dass Amplitudenhistogramm und Zeitreihe im Joint-Fit-Verfahren in gleicher Gewichtung berücksichtigt werden, findet man durch eine Intervallschachtelung heraus.

Man testet dazu das Joint-Fit-Verfahren beispielsweise anhand der Fünf-Zustands-Modelle aus Abbildung 5.4 mit einem beliebigen Gewichtungsfaktor g_1 . Da es unwahrscheinlich ist, mit dieser zufälligen Wahl von g_1 sofort den richtigen Faktor gefunden zu haben, wird entweder der Zeitreihenfit oder der Betafit Übergewichtet sein. Ist – wie es hier beispielhaft angenommen werden soll – der Betafit zu stark gewichtet, stimmen die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens mit denen des Betafits (vgl. Abbildung 8.5) überein. In einem zweiten Schritt wählt man einen wesentlichen kleineren Gewichtungsfaktor g_2 derart, dass nun der Direkte Zeitreihenfit Übergewichtet ist. Die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens stimmen dann mit denen des Direkten Zeitreihenfits (Abbildung 6.5) überein. Im Intervall zwischen g_1 und g_2 existiert ein Wert g , bei dem Betafit und Direkter Zeitreihenfit gleich stark gewichtet sind. Diesem Wert für g nähert man sich iterativ an:

$$g_n = g_{n-1} + \frac{1}{2}(g_{n-2} - g_{n-1}) \quad (9.4)$$

Entweder mit g_{n-1} oder mit g_{n-2} bildet g_n erneut ein Intervall, an dessen einem Ende der Betafit und an dessen anderem Ende der Direkte Zeitreihenfit Übergewichtet ist. Dieses Intervall ist Ausgangspunkt für den nächsten Schritt der Intervallschachtelung. In der Gesamtschau der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Simulationen erweist es sich als ausreichend, den Gewichtungsfaktor auf 10 % genau zu bestimmen, weil eine Fortführung der Intervallschachtelung nur noch geringen Einfluss auf die Fitergebnisse hat. Abbruchbedingung für die Intervallschachtelung ist also:

$$|g_n - g_{n-1}| < 0,1 * g_n \quad (9.5)$$

Ein allgemeingültiger Gewichtungsfaktor, der für alle Markov-Modelle gleichermaßen gilt, existiert nicht. Der ideale Wert für g variiert vielmehr mit der Anzahl der Zustände des Markov-Modells sowie mit der Anzahl der Kanäle. Dies stellt in der Praxis jedoch keine bedeutende Einschränkung dar, weil noch große Bereiche verbleiben, die mit einem einheitlichen Gewichtungsfaktor abgedeckt werden können. Sollen beispielsweise Zeitreihen des K^+ -Kanals von *Chara* ausgewertet werden, wird immer ein Markov-Modell mit fünf Zuständen zugrunde gelegt. Da es in der Regel vermieden wird, Zeitreihen mit mehr als zwei Kanälen auszuwerten, benötigt man nur je einen Gewichtungsfaktor für Ein-Kanal-Zeitreihen und einen für Zwei-Kanal-Zeitreihen.

Abhängig ist der Gewichtungsfaktor ferner von der Länge der Zeitreihe. χ^2 ist nämlich von der Länge unabhängig, während $\ln(L)$ proportional mit ihr wächst. Dies stellt jedoch kein

Problem dar, weil die Länge der Zeitreihe mittels eines Eichfaktors direkt im Programmcode berücksichtigt werden kann.

9.3. Leistungsfähigkeit bei Ein-Kanal-Zeitreihen

9.3.1. Reichweitentest

Bei der iterativen Bestimmung des Gewichtungsfaktors g im Reichweitentest stellt sich das Problem, dass die Ergebnisse des Betafits die Sollergebnisse so präzise treffen, dass eine weitere Verbesserung nicht mehr möglich ist. Es ist deswegen schwierig, eine Übergewichtung des Betafits festzustellen. Das Ziel ist vielmehr bereits dann erreicht, wenn das Joint-Fit-Verfahren im Reichweitentest genauso gute Ergebnisse liefert wie der Betafit.

Die Bestimmung von g beim Zwei-Zustands-Modell wird deswegen nicht auf den Reichweitentest beschränkt, sondern es wird gleichzeitig der Rauschabhängigkeitstest einbezogen. Der Gewichtungsfaktor ist dann ideal, wenn das Joint-Fit-Verfahren beim Reichweitentest so gute Ergebnisse liefert wie der Betafit und gleichzeitig gegenüber einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses so unempfindlich ist wie der Direkte Zeitreihenfit.

Unter Berücksichtigung von sowohl Reichweiten- als auch Rauschabhängigkeitstest führt die soeben beschriebene Intervallschachtelung zu einem Gewichtungsfaktor von $g=5000$ für das Ein-Kanal-Zeitreihen des Zwei-Zustands-Modells.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse, die das Joint-Fit-Verfahren beim Reichweitentest mit $g=5000$ liefert.

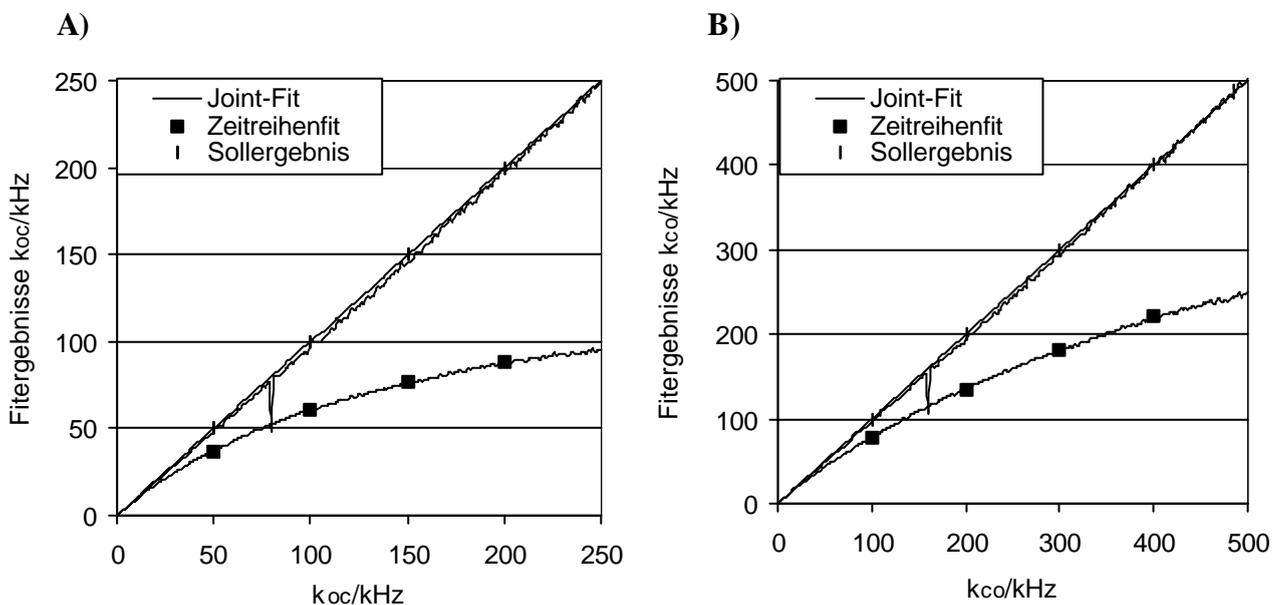


Abbildung 9.1: Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit beim Reichweitentest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 10, Gewichtungsfaktor $g=5000$, A) Sollergebnis Rate $k_c=n*1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_c=n*2$ kHz, $n=1\dots250$. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Es ergibt sich genau das gewünschte Bild: Die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens weichen nicht wesentlich von den Sollergebnissen ab und sind damit genauso gut wie die des Betafits (siehe Abbildung 8.1).

Gegenüber dem Direkten Zeitreihenfit hingegen ist ein deutlicher Fortschritt erzielt worden, wie der Vergleich mit den ebenfalls dargestellten Ergebnisse dieses Verfahrens zeigt.

9.3.2. Rauschabhängigkeitstest

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse dargestellt, die das Joint-Fit-Verfahren mit einem Gewichtungsfaktor von $g=5000$ beim Rauschabhängigkeitstest aus Kapitel 5.3 liefert.

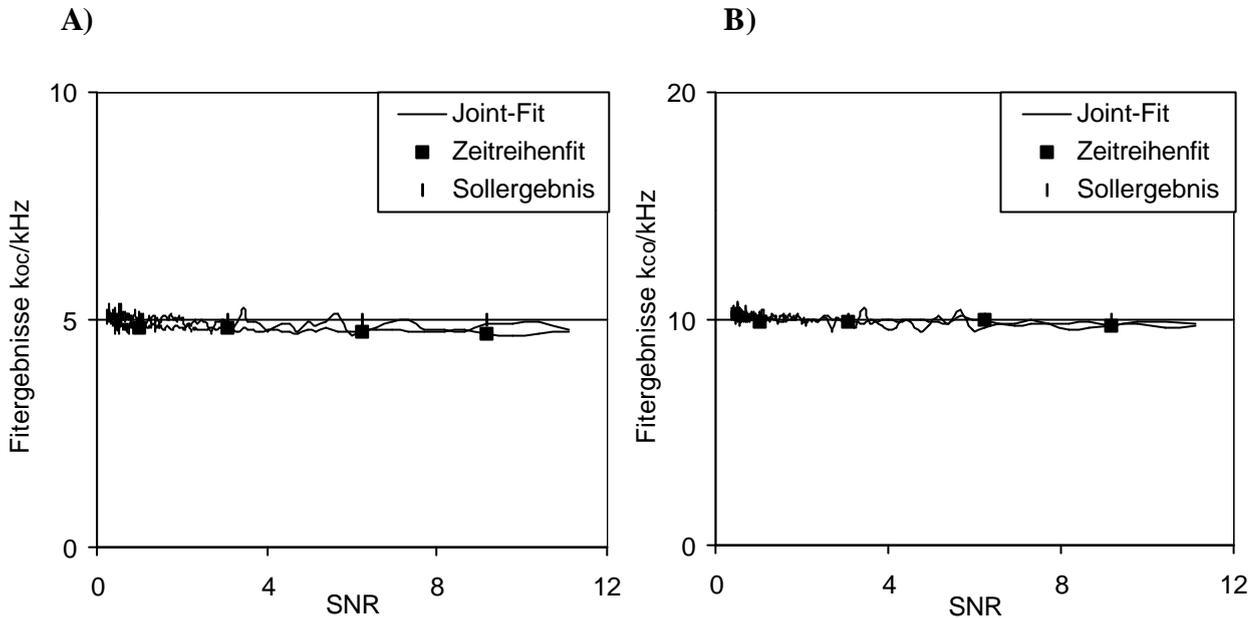


Abbildung 9.2: Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, Gewichtungsfaktor $g=5000$, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=5$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=10$ kHz. Es wurden 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

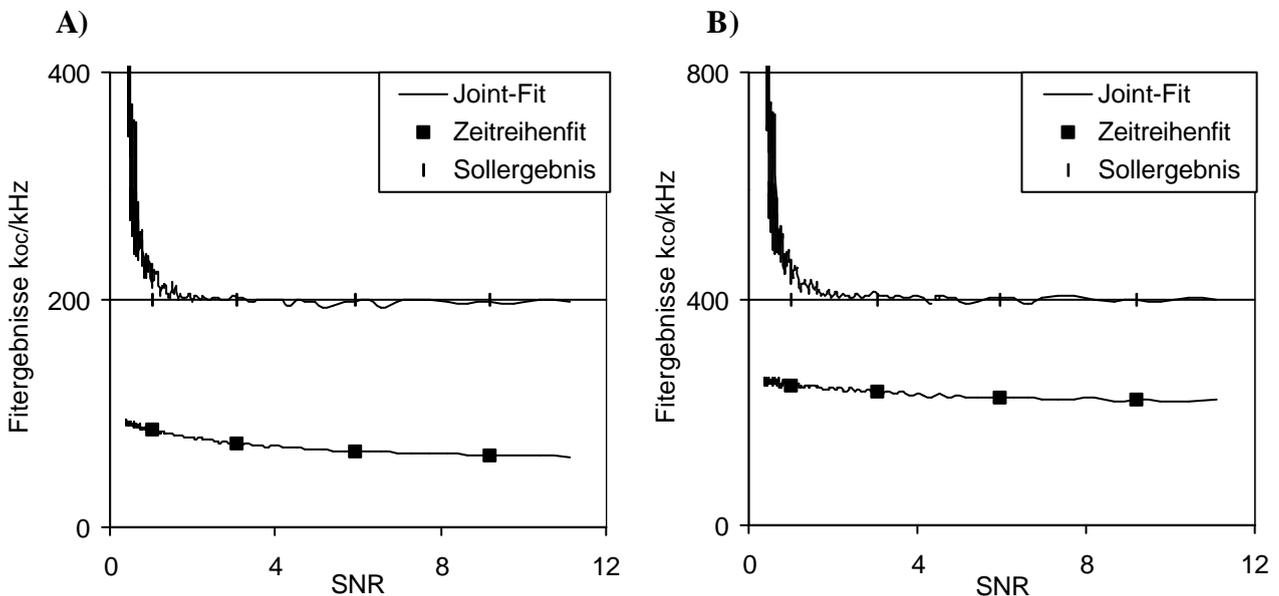


Abbildung 9.3: Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, Gewichtungsfaktor $g=5000$, A) Sollergebnis Rate $k_{co}=200$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=400$ kHz. Es wurden 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Bei den langsamen Übergangsraten von 5 kHz und 10 kHz stimmen die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens durchgängig sehr gut mit den Sollergebnissen überein. Die Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis ist ebenso gering, wie die des Direkten Zeitreihenfits. Die Verbesserung gegenüber den Ergebnissen des Betafits (siehe Abbildung 8.2) ist unverkennbar.

Bei den schnellen Übergangsraten von 200 kHz und 400 kHz ist dagegen der Fortschritt gegenüber dem Direkten Zeitreihenfit unverkennbar. Die Fähigkeit des Joint-Fit-Verfahrens, schnelle Übergangsraten herauszufinden, ist genauso ausgeprägt wie beim Betafit (vgl. Abbildung 8.3).

Damit führt das Joint-Fit-Verfahren mit einem Gewichtungsfaktor von $g=5000$ bei Ein-Kanal-Zeitreihen des Zwei-Zustands-Modells genau zu dem gewünschten Ergebnis, dass die Vorteile von Betafit und Direktem Zeitreihenfit in einem Verfahren vereint sind. Die Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis ist ebenso gering wie die des Direkten Zeitreihenfits, während schnelle Übergangsraten so gut erkannt werden wie vom Betafit.

Das einzige, was auch das Joint-Fit-Verfahren nicht leistet, ist die Detektion schneller Übergangsraten bei schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis. Diese Tatsache ist jedoch nicht verwunderlich. Das Joint-Fit-Verfahren setzt sich zusammen aus dem Betafit, der schnelle Übergangsraten nur bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis findet und dem Direkten Zeitreihenfit, der schnelle Übergangsraten überhaupt nicht entdeckt. Es wäre erstaunlich, wenn die Kombination aus beiden Verfahren plötzlich in der Lage wäre, auch schnelle Übergangsraten bei schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis zu fitten.

9.3.3. Fünf-Zustands-Modell

Für Ein-Kanal-Zeitreihen vom Fünf-Zustands-Modell ist erneut eine Bestimmung des Gewichtungsfaktors mittels Intervallschachtelung erforderlich. Die Schwäche des Betafits beim Fünf-Zustands-Modell liegt darin, dass die im Mittelwert richtigen Ergebnisse stark streuen (vgl. Abbildung 8.5), der Direkte Zeitreihenfit hingegen weicht bei schnellen Übergangsraten systematisch von den Sollergebnissen ab (Abbildung 6.5). Erstrebenswert ist also ein Gewichtungsfaktor, mit dem das Joint-Fit-Verfahren die Übergangsraten richtig und ohne große Streuung findet. Unter diesen Vorgaben führt die iterative Bestimmung zu einem Gewichtungsfaktor von $g=1000$

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse, die das Joint-Fit-Verfahren mit einem Gewichtungsfaktor von $g=1000$ bei den Fünf-Zustands-Modellen aus Kapitel 5.4 erzielt. Die Darstellung beschränkt sich auf die Raten k_{og} und k_{cg} . Die Beobachtungen, die man den übrigen Raten machen kann, entsprechen denen bei k_{cg} .

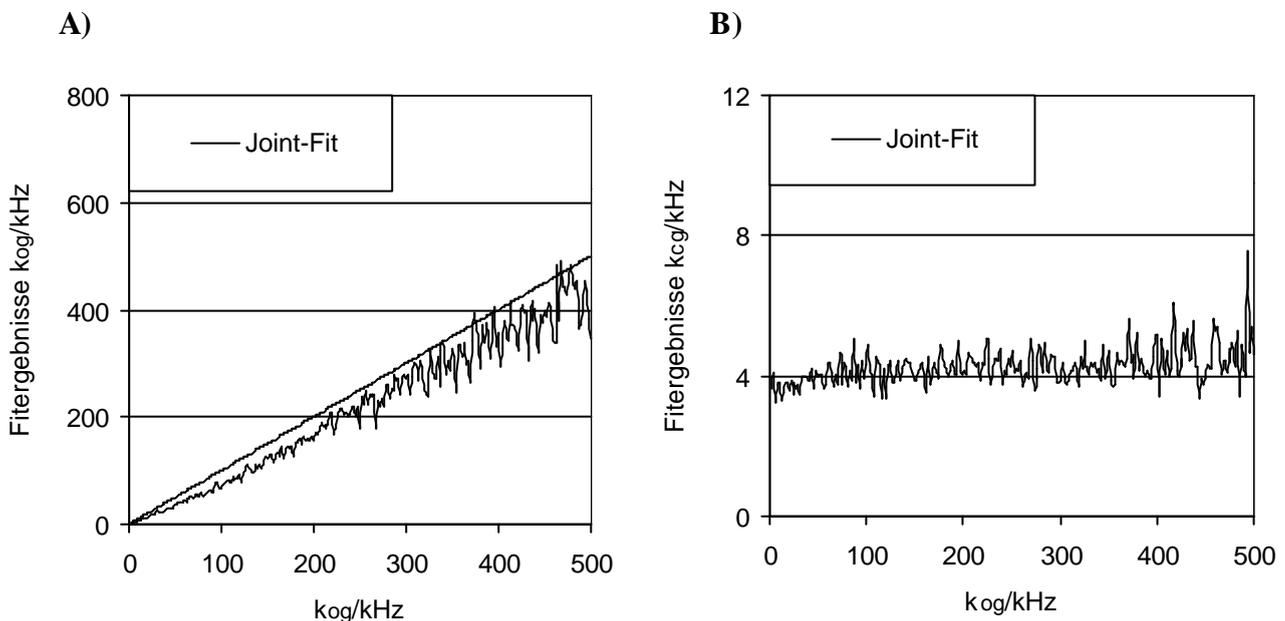


Abbildung 9.4: Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens beim Fünf-Zustands-Modell, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 50 kHz, SNR 4, Gewichtungsfaktor $g=1000$, A) Sollergebnis Rate $k_{og}=n \cdot 2$ kHz, $n=1 \dots 250$, B) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

Der erhoffte Fortschritt gegenüber den Ergebnissen von Betafit (Abbildung 8.5) und Direktem Zeitreihenfit (Abbildung 6.5) stellt sich ein. Die Ergebnisse streuen in wesentlich geringerem Maße als die des Betafits und liegen darüber hinaus insbesondere für k_{og} deutlich näher an den Sollergebnissen als die des Zeitreihenfits.

Für Ein-Kanal-Zeitreihen sowohl von Zwei-Zustands- als auch von Fünf-Zustands-Modellen ist es also mit der Joint-Fit-Strategie gelungen, die Vorteile von Betafit und Direktem Zeitreihenfit in einem Verfahren zu vereinen. Zu zeigen ist noch, dass dies auch bei Zeitreihen von zwei Kanälen gilt.

9.4. Leistungsfähigkeit bei Zwei-Kanal-Zeitreihen

9.4.1. Reichweitentest

Um in der zur Verfügung stehenden Rechenzeit zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen, wird die Leistungsfähigkeit des Joint-Fit-Verfahrens bei Zwei-Kanal-Zeitreihen mit einem Besselfilter erster Ordnung geprüft. Dies ermöglicht die analytische Berechnung der Amplitudenhistogramme und erspart deren zeitaufwändige Simulation. Die Ergebnisse sind auf Filter vierter Ordnung übertragbar, da die Leistungsfähigkeit des Betafits bei Filtern erster Ordnung mit der des Betafits bei Filtern vierter Ordnung übereinstimmt, wie die Untersuchungen in Kapitel 6 und 8 gezeigt haben.

Es wird also der in Kapitel 5.2 beschriebene Reichweitentest mit Zeitreihen von zwei gleichartigen Kanälen der Zwei-Zustands-Modelle aus Abbildung 5.1 durchgeführt. Zunächst ist wiederum die Bestimmung eines passenden Gewichtungsfaktors erforderlich. Die gemäß Absatz 9.2 durchgeführte Intervallschachtelung ergibt einen Gewichtungsfaktor von $g=10000$.

Abbildung 9.5 zeigt die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens beim Reichweitentest mit $g=10000$.

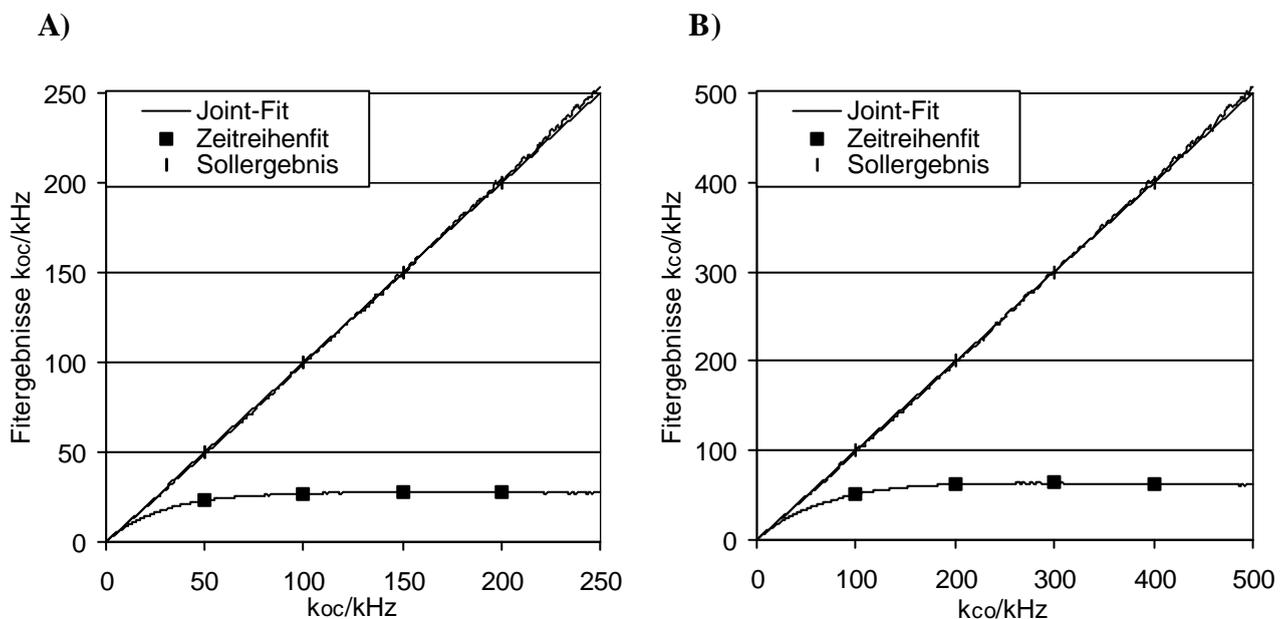


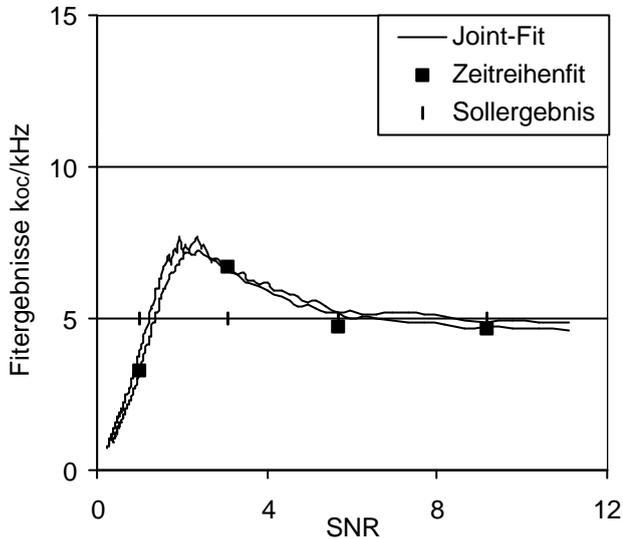
Abbildung 9.5: Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit beim Reichweitentest mit zwei gleichartigen Kanälen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster Ordnung 50 kHz, SNR 10, Gewichtungsfaktor $g=10000$, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=n \cdot 1$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=n \cdot 2$ kHz ($n=1 \dots 250$). Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Es zeigt sich das gewünschte Bild. Die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens weichen nicht von den Sollergebnissen ab. Das Joint-Fit-Verfahren fittet schnelle Übergangsraten bei Zwei-Kanal-Zeitreihen des Zwei-Zustands-Modells damit genauso gut wie der Betafit. Die Verbesserung gegenüber den ebenfalls dargestellten Ergebnissen des Direkten Zeitreihenfits ist offensichtlich.

9.4.2. Rauschabhängigkeitstest

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens beim Rauschabhängigkeitstest aus Kapitel 5.3 mit zwei gleichartigen Kanälen dargestellt. Der Gewichtungsfaktor ist wieder $g=10000$.

A)



B)

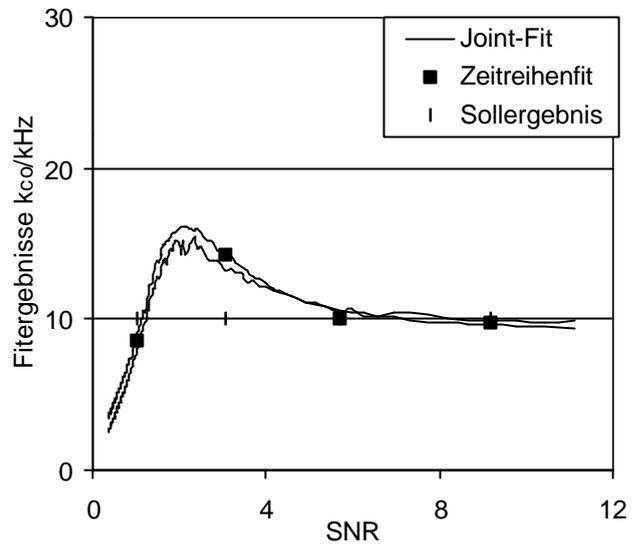
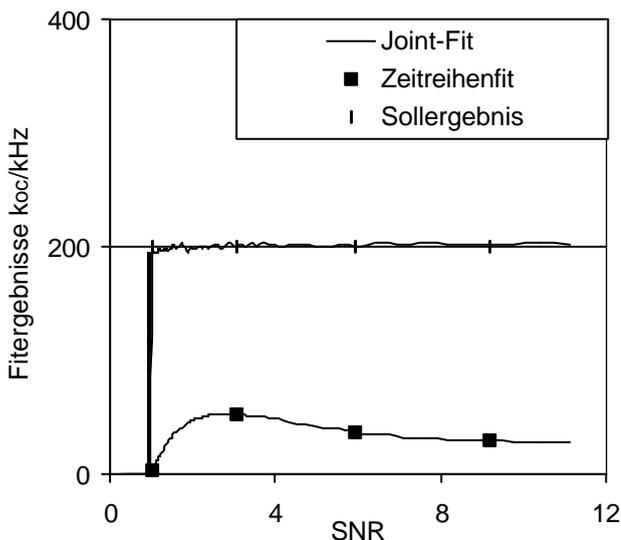


Abbildung 9.6: Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest mit zwei gleichartigen Kanälen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster Ordnung 50 kHz, Gewichtungsfaktor $g=10000$, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=5$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=10$ kHz. Es wurden 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

A)



B)

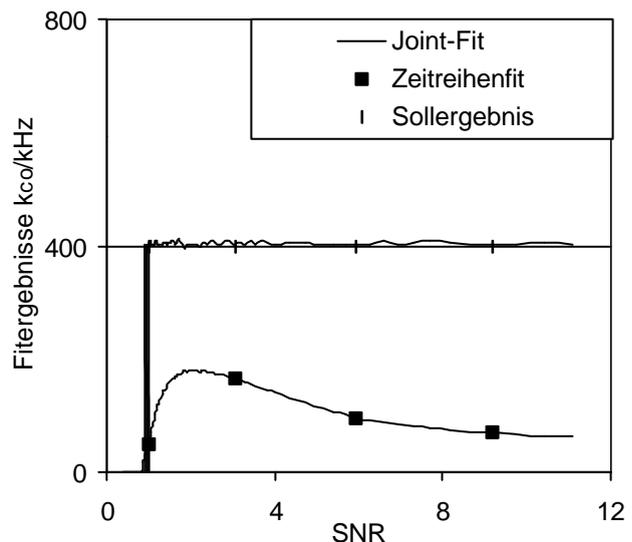


Abbildung 9.7: Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit beim Rauschabhängigkeitstest mit zwei gleichartigen Kanälen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster Ordnung 50 kHz, Gewichtungsfaktor $g=10000$, A) Sollergebnis Rate $k_{oc}=200$ kHz, B) Sollergebnis Rate $k_{co}=400$ kHz. Es wurden 170 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten.

Bei den langsamen Übergangsraten von 5 kHz/ 10 kHz benötigt das Joint-Fit-Verfahren ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 4, um die richtigen Ergebnisse zu liefern. Dies entspricht der Erwartung, da auch Betafit und Direkter Zeitreihenfit für die richtigen Ergebnisse auf ein SNR von mindestens 4 angewiesen sind (siehe Abbildung 6.8). Die Kombination beider Verfahren kann unter diesen Bedingungen nicht zu einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit führen, die über die der Einzelverfahren hinausgeht.

Die schnellen Übergangsraten (200 kHz/ 400 kHz) findet das Joint-Fit-Verfahren ohne große Abweichungen von den Sollergebnissen heraus, solange das Signal-Rausch-Verhältnis besser als 1 ist. Dies ist etwas besser als der Betafit (siehe Abbildung 6.9), der Fortschritt gegenüber den ebenfalls dargestellten Ergebnissen des Direkten Zeitreihenfits ist deutlich.

Auch bei Zwei-Kanal-Zeitreihen des Zwei-Zustands-Modells gelingt es also mittels der Joint-Fit-Strategie, die Vorteile beider Einzelverfahren zu verbinden. Der Fortschritt gegenüber den Einzelverfahren ist dennoch weniger ausgeprägt als bei Ein-Kanal-Zeitreihen, weil sich schon die Einzelverfahren weniger in ihrer Leistungsfähigkeit unterscheiden.

9.4.3. Fünf-Zustands-Modell

Schließlich ist noch zu zeigen, dass das Joint-Fit-Verfahren auch bei Zwei-Kanal-Zeitreihen von den Fünf-Zustands-Modellen aus Kapitel 5.4 funktioniert. Die gemäß Absatz 9.2 durchgeführte Iteration ergibt einen Gewichtungsfaktor von $g=2000$. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse für k_{og} und k_{cg} mit diesem Gewichtungsfaktor. Startwerte für die Fits sind wie immer die tatsächlichen Übergangsraten.

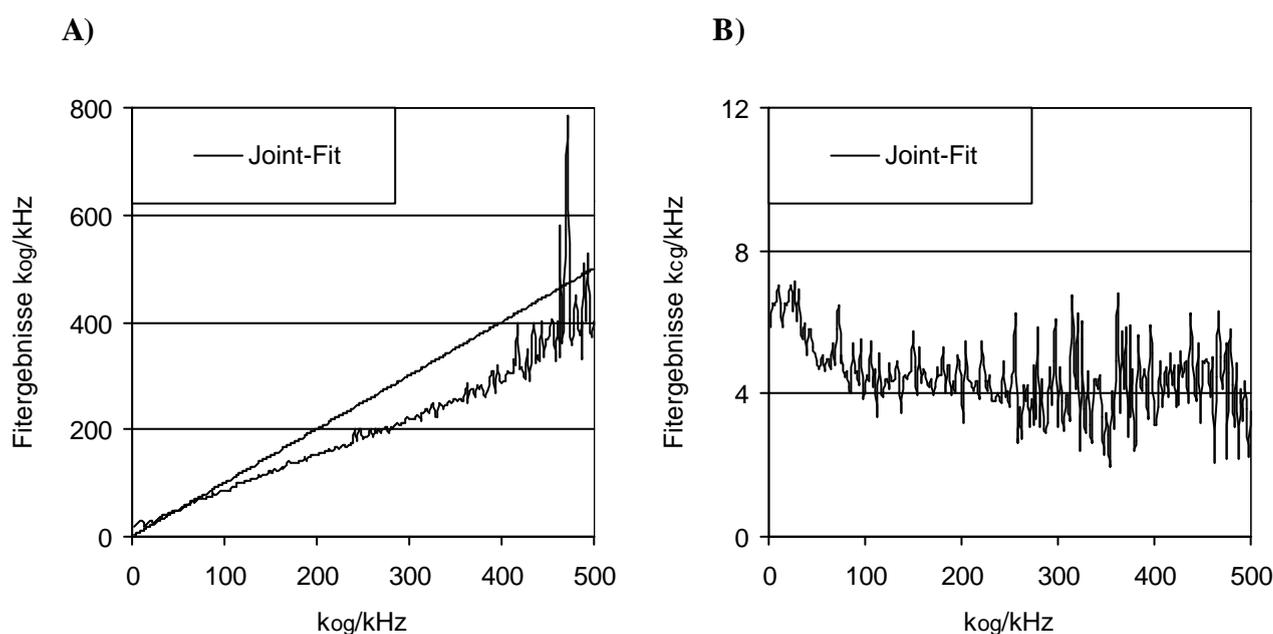


Abbildung 9.8: Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens bei zwei gleichartigen Kanälen mit je fünf Zuständen, Abtastrate 200 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters erster Ordnung 50 kHz, SNR 4, Gewichtungsfaktor $g=2000$, A) Sollergebnis Rate $k_{og}=n*2$ kHz, $n=1...250$, B) Sollergebnis Rate $k_{cg}=4$ kHz. Es wurden 250 simulierte Zeitreihen ausgewertet. Startwerte waren die tatsächlichen Übergangsraten. Die Ergebnisse für beide Übergangsraten sind aufgetragen gegen die variable Rate k_{og} .

Auch hier ist der Fortschritt gegenüber den Einzelverfahren deutlich. Die Ergebnisse für k_{og} liegen näher bei den Sollergebnissen als die des Direkten Zeitreihenfits (siehe Abbildung 6.10) und streuen weniger als die des Betafits (vgl. Abbildung 8.6). Die Rate k_{cg} wird gut erkannt. Auch hier streuen die Ergebnisse nicht so stark wie die des Betafits.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Joint-Fit-Verfahren unter allen getesteten Bedingungen einen Fortschritt gegenüber den bisherigen Verfahren darstellt. Es übertragen

sich jeweils die positiven Eigenschaften der Einzelverfahren in die Kombination beider. Es ist gelungen, ein leistungsfähiges Verfahren für die Auswertung von Patch-Clamp-Messungen zur Verfügung zu stellen.

10. Analyse von Gating-Effekten

Nachdem die Leistungsfähigkeit der neu eingeführten Verfahren bei simulierten Zeitreihen hinreichend nachgewiesen ist, sollen im folgenden exemplarisch einige echte Messreihen betrachtet werden. Im ersten Beispiel wird nur der Ausschnitt einer Zeitreihe betrachtet, und es wird die Annahme getroffen, dass dieser Ausschnitt sich durch ein einfaches C/O-Modell beschreiben lässt. Unter diesen Voraussetzungen ist es nicht erforderlich, auf das Joint-Fit-Verfahren zurückzugreifen, sondern es genügt der Erweiterte Betafit.

In Zeitreihen von Patch-Clamp-Messungen ist man häufig mit dem Problem konfrontiert, dass nicht ohne weiteres geklärt werden kann, durch welchen Mechanismus bestimmte Effekte in der Zeitreihe hervorgerufen werden. Beispielhaft gezeigt wird dies an einer Patch-Clamp-Zeitreihe einer nicht näher identifizierten Unterart der *Characaen* aus dem Botanischen Garten der Universität Kiel. In der Zeitreihe erkennt man unschwer das bei 0 pA liegende Geschlossen-Niveau und das bei -2,06 pA liegende Offen-Niveau des Kanals. Beide sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet.

Nicht sofort einsichtig ist hingegen, wie es zu den innerhalb der Markierung liegenden Messwerten kommt, die weder mit dem Offen- noch mit dem Geschlossen-Niveau übereinstimmen. Die Werte liegen auf einem sogenannten Sublevel.

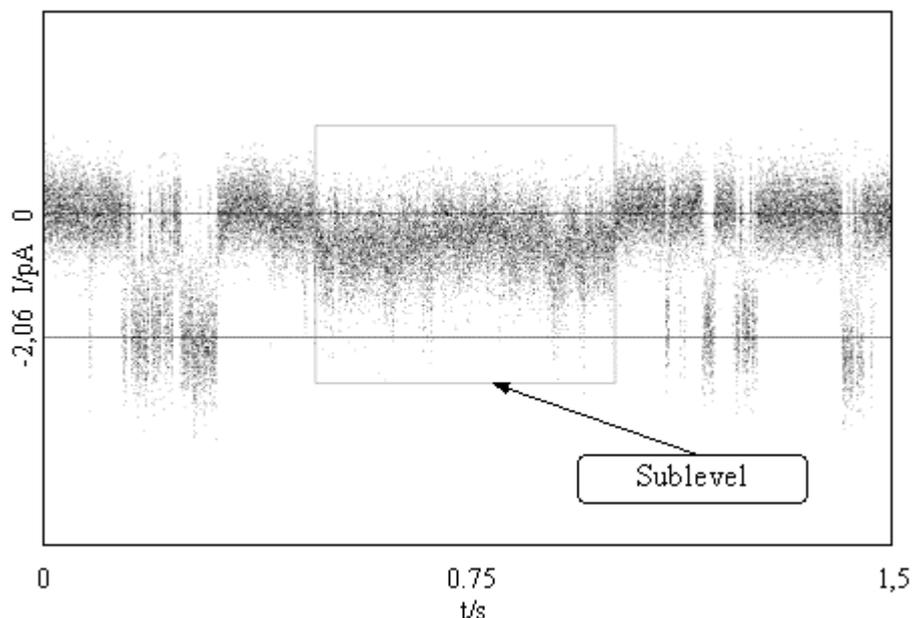


Abbildung 10.1: Ausschnitt einer Stromzeitreihe von Vesikeln einer nicht näher identifizierten Unterart der *Characaen*, Badlösung 10 mM TINO₃ + 115 mM KNO₃ + 5 mM CaNO₃, Pipettenlösung 115 mM TINO₃ + 10 mM KNO₃ + 5 mM CaNO₃, Membranspannung U=-40 mV; längere Abschnitte des Geschlossen-Niveaus ohne Schalten sind herausgetrennt.

Erklären ließen sich die Zwischenwerte auf dem Sublevel zum einen durch einen Permeationsmechanismus, zum anderen durch Gating.

Bei einem Permeationsmechanismus steigt der mittlere Abstand zwischen zwei Ionen, weil der Durchgang mehr Zeit beansprucht. Die Offen-Leitfähigkeit des Kanals und damit die gemessene Stromstärke sinken.

Von Gating spricht man hingegen, wenn der mittlere Abstand der permeierenden Ionen konstant bleibt, der Stromfluss aber durch Pausen der Inaktivität unterbrochen wird. Wegen der integrierenden Wirkung des Tiefpassfilters misst man in der Aufnahmeapparatur nicht diesen schnellen Wechsel zwischen aktiven und inaktiven Zuständen, sondern einen mittleren Stromwert, der niedriger ist als der normale Strom des Offenzustandes.

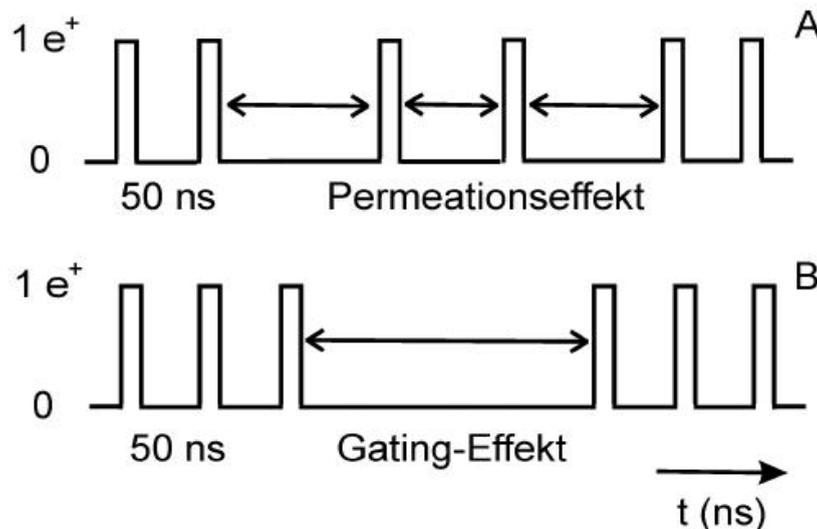


Abbildung 10.2: Schematische Darstellung von Permeationsmechanismus (A) und Gating (B). Beim Gating ist der mittlere Abstand zweier aufeinanderfolgender Ionen konstant, es gibt aber Pausen der Inaktivierung. Ein Permeationsmechanismus bewirkt, dass der Abstand zwischen den Ionen sich ändert. (Quelle: Hansen et al., 1997).

Gating von Permeationseffekten zu unterscheiden, war bisher mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Eine Möglichkeit bestand darin, die zeitliche Auflösung der Messapparatur soweit zu erhöhen, dass die Unterbrechungen des Ionenflusses direkt sichtbar wurden. Diesen Weg beschritten Draber und Hansen (1994) beim Block des K^+ -Kanals durch Cs^+ . Erste Messungen mit Filtern von 5 kHz hatten eine negative Steigung der Strom-Spannungskurve bei Anwesenheit von Cs^+ ergeben. Durch Erhöhung der Abtastfrequenz auf 100 kHz und der Abknickfrequenz des Filters auf 25 kHz konnte das schnelle Schalten, das bei den vorangegangenen Messungen die Stromreduktion bewirkt hatte, direkt gezeigt werden.

War eine Verbesserung der Aufnahmeapparatur nicht möglich, konnte der Versuch unternommen werden, mit Hilfe von Simulationen zwischen Gating und Permeation zu unterscheiden (Farokhi et al., 2000). Ausgangspunkt waren die Filtergebnisse des Direkten Zeitreihenfits. Diese waren bei schnellem Schalten regelmäßig falsch, da die jenseits der Abknickfrequenz des Filters liegenden Übergangsraten deutlich unterschätzt werden (vgl. Kapitel 6).

Versucht werden konnte nun, simulierte Zeitreihen derart zu erzeugen, dass sie bei der Auswertung mit dem Direkten Zeitreihenfit die gleichen Ergebnisse lieferten wie die gemessene Zeitreihe. Schaffte man es, eine derartige Zeitreihe zu simulieren, lag es nahe, dass

die Kinetik der gemessenen Zeitreihe mit der bekannten Kinetik der simulierten Zeitreihe übereinstimmte. Nachteil dieser Vorgehensweise war ein erheblicher zeitlicher Aufwand.

Hier liefert der Erweiterte Betafit einen neuen Ansatzpunkt. Da es für die Unterscheidung zwischen Gating und Permeation nicht erforderlich ist, die Kinetik der gesamten Zeitreihe auszuwerten, kann das Sublevel separat betrachtet werden. Unter der Annahme, dass beim Gating zwischen nur zwei Zuständen schnell hin- und hergewechselt wird, kann das Amplitudenhistogramm des Sublevels mit einem C/O-Modell gefittet werden. Mit dem Satz von Übergangsraten, die der Betafit ermittelt, wird eine Zeitreihe simuliert. Ein Vergleich des Amplitudenhistogramms dieser Zeitreihe mit dem Amplitudenhistogramm des Sublevels zeigt, ob die Verteilung des Sublevels die für schnelles Schalten charakteristische Verteilung aufweist.

Beispielhaft soll diese Auswertung nun für das Sublevel aus Abbildung 10.1 vorgenommen werden. Dazu zeigt Abbildung 10.3 zunächst das Amplitudenhistogramm nur des Sublevels.

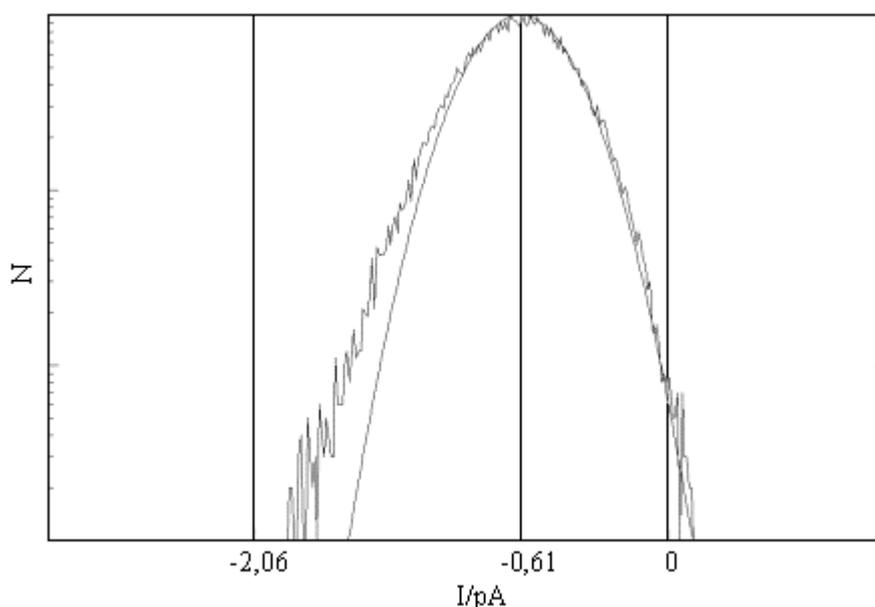


Abbildung 10.3: Amplitudenhistogramm des Sublevels (markierter Bereich) aus Abbildung 10.1, Geschlossen-Niveau der Zeitreihe $I_c=0$ pA, Offen-Niveau $I_o=-2,06$ pA.

Einen Hinweis darauf, dass das Amplitudenhistogramm des Sublevels durch schnelles Schalten entstanden sein könnte, liefert die Tatsache, dass die Annäherung durch eine Gaußverteilung nicht möglich ist. Wäre das Sublevel nämlich durch einen Permeationsmechanismus entstanden, so wäre der reduzierte Kanalstrom nur mit dem Rauschen der Aufnahmeapparatur überlagert. Die Stromwerte wären gaußverteilt.

Als Parameter für den Betafit der Sublevelverteilung werden der Zeitreihe aus Abbildung 10.1 entnommen: ein Geschlossen-Strom von $I_c=0$ pA, ein Offenstrom von $I_o=-2,02$ pA und ein Effektivwert des Rauschens von $\sigma=0,48$ pA. Wichtig ist es, die Stärke des Rauschens auf einem der Nominalniveaus zu bestimmen. Durch schnelles Schalten entstandene Sublevels haben nämlich auch dann eine breitere Verteilung der Werte, wenn sie optisch noch nicht von Gaußverteilungen zu unterscheiden sind. Eine Bestimmung des σ anhand des Sublevels würde deswegen die Ergebnisse verfälschen.

Mit diesen Parametern findet der Betafit für ein C/O-Modell die folgenden Übergangsraten.

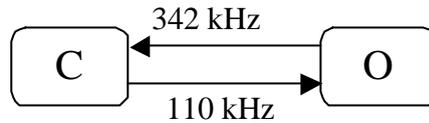


Abbildung 10.4: Übergangsraten des Ein-Kanal-C/O-Modells, mit denen der Betafit das Amplitudenhistogramm des Sublevels (Abbildung 10.3) fittet.

Zur Probe wird nun eine Zeitreihe mit diesen Übergangsraten simuliert und das Amplitudenhistogramm der simulierten Zeitreihe mit dem Amplitudenhistogramm des Sublevels verglichen.

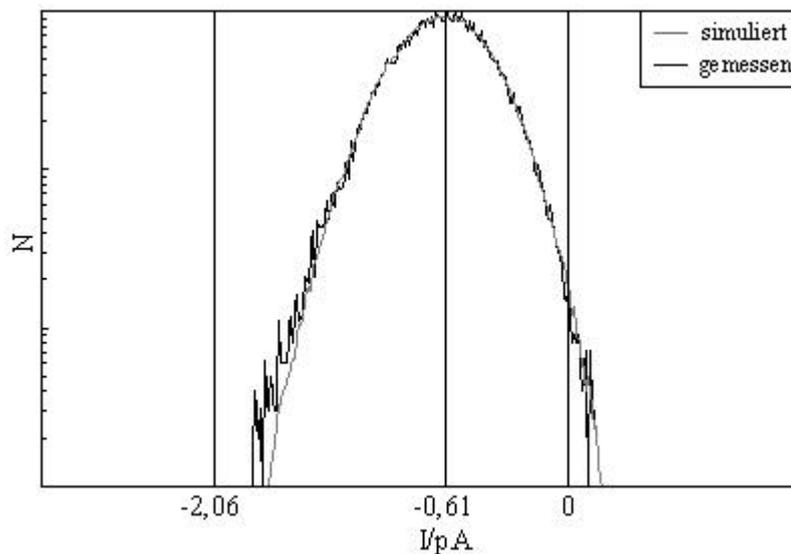


Abbildung 10.5: Vergleich des Amplitudenhistogramms des Sublevels aus Abbildung 10.1 mit dem Amplitudenhistogramm der mit den Übergangsraten aus Abbildung 10.4 simulierten Zeitreihe.

Beide Histogramme stimmen exakt überein. Kleinere Abweichungen sind bei weniger als zehn Ereignissen pro Wert zu erkennen. Dabei handelt es sich um normale statistische Schwankungen.

Aus dieser Übereinstimmung folgt insbesondere, dass das in der Zeitreihe erkennbare Sublevel nur ein scheinbares Stromniveau darstellt. Die Häufung von Stromwerten bei 0,61 pA entsteht durch schnelles Hin- und Herschalten zwischen dem Offen-Niveau bei 2,06 pA und dem Geschlossen-Niveau bei 0 pA. Der normale Einzelkanalstrom von 2,06 pA ist also durch Gating auf 0,61 pA reduziert.

Damit ist gezeigt, dass das Sublevel ein Ergebnis schnellen Schaltens des Kanals ist. Als Zusatzinformation bekommt man die Übergangsraten zwischen dem Offen- und dem Geschlossen-Zustand des Kanals.

Die hier ausgewertete Zeitreihe ist aus zwei Gründen besonders gut geeignet, um das schnelle Schalten als Ursache der gemessenen Stromreduzierung nachzuweisen. Zum einen enthält die Zeitreihe neben dem schnellen auch noch langsames Schalten, so dass man den tatsächlichen Offen-Strom direkt ablesen kann. Bei einer Zeitreihe, die nur aus schnellem Schalten besteht, bereitet die Bestimmung des tatsächlichen Kanalstroms erhebliche Schwierigkeiten (Farokhi, 2002). Zum zweiten bleibt der Kanal so lange im Sublevel, dass es möglich ist, ein separates Amplitudenhistogramm des Sublevels zu erstellen. Dadurch wird es erst möglich, sich bei der Auswertung mit dem Betafit auf ein Zwei-Zustands-Modell zu

beschränken. Häufig wird der Kanal aber so häufig zwischen langsamem und schnellem Schalten hin- und herwechseln, dass es nicht möglich ist, ein separates Amplitudenhistogramm zu erstellen, das nur schnelles Schalten enthält. In diesem Fall muss das gesamte Amplitudenhistogramm mit einem Mehr-Zustands-Modell gefittet werden.

11. Modell-Verifikation

11.1. A-O-G-C-Z-Modell

Voraussetzung für alle Fitverfahren ist die Kenntnis des dem Kanal zugrunde liegenden Markov-Modells (siehe oben Kapitel 4.6). Das Herausfinden des passenden Modells ist ein schwieriges Problem. Ein Verfahren, das Modell unmittelbar aus der Zeitreihe zu gewinnen, existiert nicht. Im folgenden wird eine der im Verlauf dieser Arbeit aufgenommenen Zeitreihen mit Hilfe des Joint-Fit-Verfahrens ausgewertet, um zu zeigen, dass das Verfahren unter bestimmten Umständen auch Aussagen darüber ermöglicht, ob das passende Markov-Modell zugrundegelegt wurde.

Durch Simulationen und Plausibilitätserwägungen haben Farokhi et al. (2000) herausgefunden, dass die beim AMFE des K^+ -Kanals von *Chara corallina* auftretende Stromreduktion durch ein Fünf-Zustands-Modell am besten erklärt werden kann. Das Modell besteht aus zwei Offen- und drei Geschlossen-Zuständen, die jeweils nebeneinander liegen.

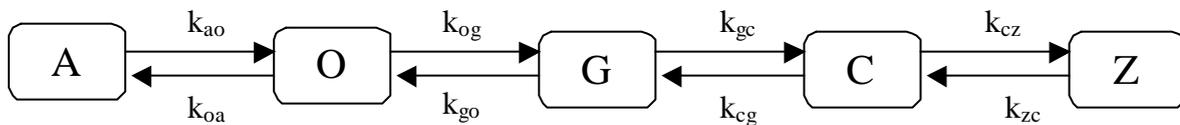


Abbildung 11.1: Markov-Modell mit zwei Offen-Zuständen A und O sowie drei Geschlossen-Zuständen G, C und Z. Dieses Modell wurde von Farokhi et al. (2000) verwendet, um den AMFE im K^+ -Kanal von *Chara corallina* zu erklären.

Naheliegender ist die Vermutung, dass den hier durchgeführten Messungen am K^+ -Kanal von *Chara corallina* das gleiche Markov-Modell zugrunde liegt.

Abbildung 11.2 zeigt einen Ausschnitt der Zeitreihe, anhand derer die Auswertung durchgeführt wird.

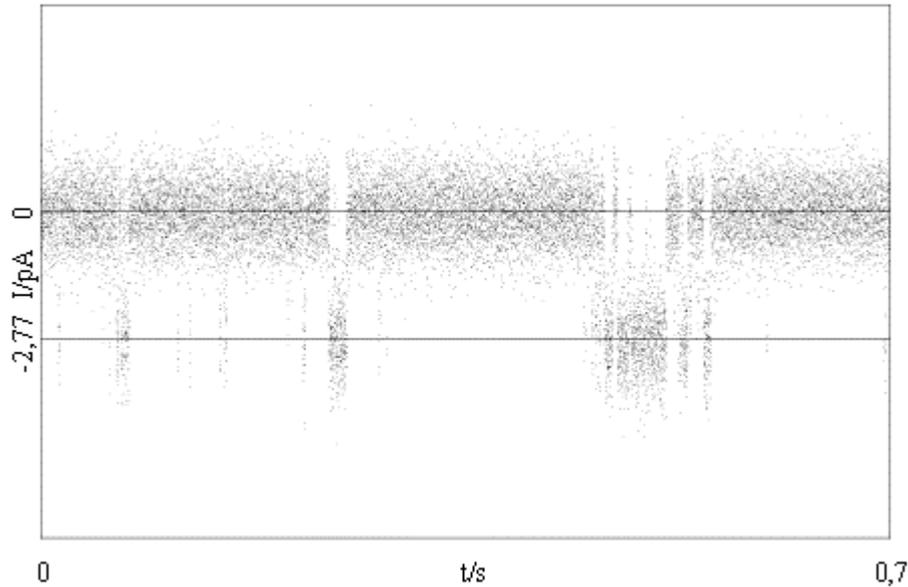


Abbildung 11.2: Stromzeitreihe eines K^+ -Kanals von Vesikeln aus *Chara corallina*; Badlösung 10 mM $TiNO_3$ + 115 mM KNO_3 + 5 mM $CaNO_3$, Pipettenlösung 115 mM $TiNO_3$ + 10 mM KNO_3 + 5 mM $CaNO_3$, Membranspannung $U=-40$ mV, Abtastfrequenz 100 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 20 kHz; dargestellt ist ein 0,7 s langer Ausschnitt der 16,5 s langen Zeitreihe.

Es handelt sich um die Zeitreihe eines einzelnen K^+ -Kanals. Der Kanal ist die überwiegende Zeit geschlossen, es fließt also kein Strom. Zwischendurch wechseln sich sehr kurze mit etwas längeren Abschnitten ab, in denen der Kanal offen ist. Es fließt dann der Offenstrom von $I_o=-2,77$ pA.

Im ersten Schritt der Auswertung wird das Amplitudenhistogramm der Zeitreihe erstellt.

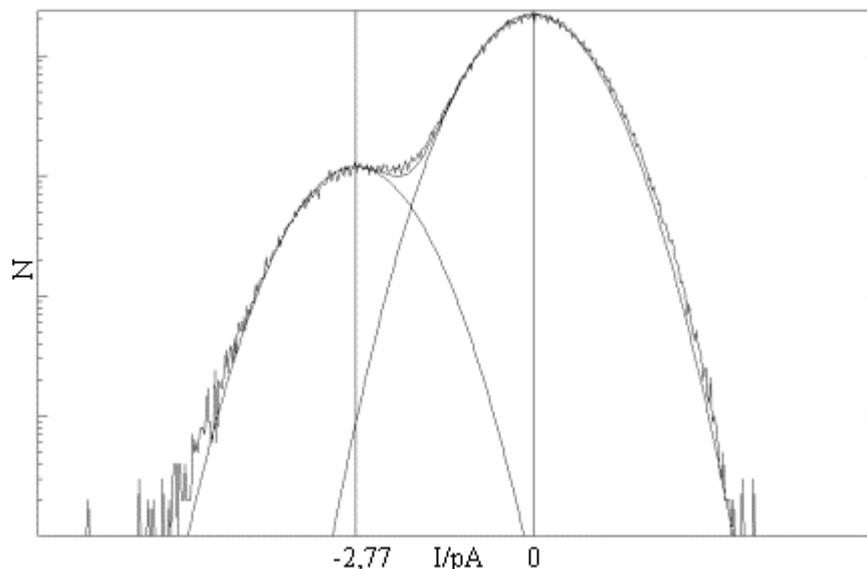


Abbildung 11.3: Amplitudenhistogramm der Zeitreihe aus Abbildung 11.2. Der Effektivwert des Rauschens ohne Einfluss schnellen Schaltens ist $s_{Rausch}=0,73$ pA.

Im Unterschied zu der sonst üblichen Vorgehensweise stellt sich bei der Anwendung des Joint-Fit-Verfahrens nicht die Frage, ob es grundsätzlich möglich ist, dieses Amplitudenhistogramm durch eine Summe von Gauß-Verteilungen anzunähern. Vielmehr wird

der Effektivwert σ_{Rausch} des Rauschens auf einem Abschnitt der Zeitreihe bestimmt, in dem der Kanal nicht schaltet. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass tatsächlich nur die Stärke des Rauschens bestimmt wird, ohne dass eine Verfälschung durch eventuelles schnelles Schalten stattfindet. In dieser Zeitreihe beträgt $\sigma_{\text{Rausch}}=0,73$ pA.

In Abbildung 11.3 ist zu erkennen, dass das Gesamtamplitudenhistogramm trotz dieser separaten Bestimmung der Stärke des Rauschens nur marginal von der Summe der Gaußverteilungen abweicht. Folglich ist es auch nicht zu erwarten, dass das Joint-Fit-Verfahren wesentlich andere Ergebnisse liefert als der Direkte Zeitreihenfit. Denn zusätzliche Informationen lassen sich aus dem Amplitudenhistogramm nur dann gewinnen, wenn dieses aufgrund schnellen Schaltens von der Normalverteilung abweicht.

Für die Auswertung der Zeitreihe auf Grundlage des Fünf-Zustands-Modells aus Abbildung 11.1 wird im Joint-Fit-Verfahren der Gewichtungsfaktor $g=1000$ verwendet, der sich in Kapitel 9.3.3 als ideal für Ein-Kanal-Zeitreihen des Fünf-Zustands-Modells herausgestellt hat. Damit findet das Joint-Fit-Verfahren in der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 die folgenden Übergangsraten:

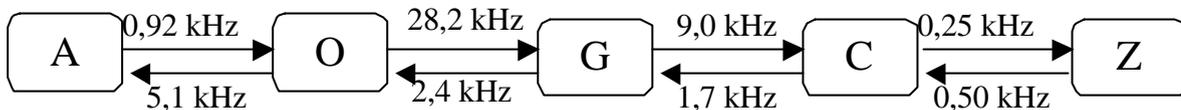


Abbildung 11.4: Übergangsraten, die das Joint-Fit-Verfahren in der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 findet, $g=1000$.

Der Direkte Zeitreihenfit hingegen fittet die gleiche Zeitreihe mit den folgenden Übergangsraten:

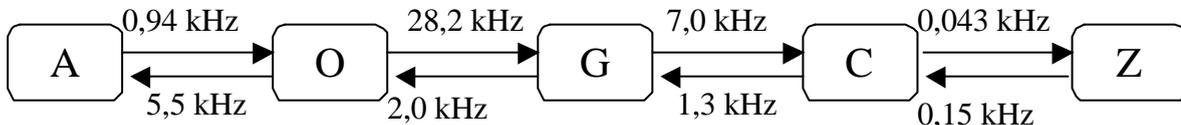


Abbildung 11.5: Übergangsraten, die der Direkte Zeitreihenfit in der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 findet.

Beide Verfahren bestätigen die schon aus dem Amplitudenhistogramm gewonnene Information, dass in der Zeitreihe kein schnelles Schalten enthalten ist. Bemerkenswert ist aber der Unterschied zwischen dem Ergebnis von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit bei den Raten k_{CZ} und k_{ZC} . Durch diese beiden Übergangsraten wird die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in dem langen Geschlossen-Zustand Z festgelegt. Je größer die Wahrscheinlichkeit ist, aus dem Zustand Z wieder in Zustand C zu wechseln, also je größer k_{ZC} ist, desto kürzer ist der Aufenthalt im Z-Zustand. Gerade diese Aufenthaltswahrscheinlichkeit im langen Geschlossen-Zustand Z bestimmt aber wesentlich die Form des Amplitudenhistogramms, weil sich die Besetzungswahrscheinlichkeit zwischen den Offen- und Geschlossen-Zuständen verschiebt.

Folglich deuten die vom Direkten Zeitreihenfit abweichenden Ergebnisse des Joint-Fit-Verfahrens daraufhin, dass die vom Direkten Zeitreihenfit gefundenen Ergebnisse das Amplitudenhistogramm nicht richtig wiedergeben. Dieser Befund erstaunt, weicht doch das Amplitudenhistogramm praktisch nicht von der Normalverteilung ab. Es besteht deswegen Anlass, das gefundene Ergebnis genauer zu betrachten.

Dazu wird mit den vom Joint-Fit-Verfahren gefundenen Übergangsraten (Abbildung 11.4) eine Zeitreihe simuliert und überprüft, ob diese in ihren wesentlichen Zügen mit der gemessenen Zeitreihe übereinstimmt. Diese Übereinstimmung ist zu erwarten, da es gerade das Wesen des Joint-Fit-Verfahrens ist, eine Übereinstimmung sowohl mit Amplitudenhistogramm als auch mit Zeitreihe herzustellen.

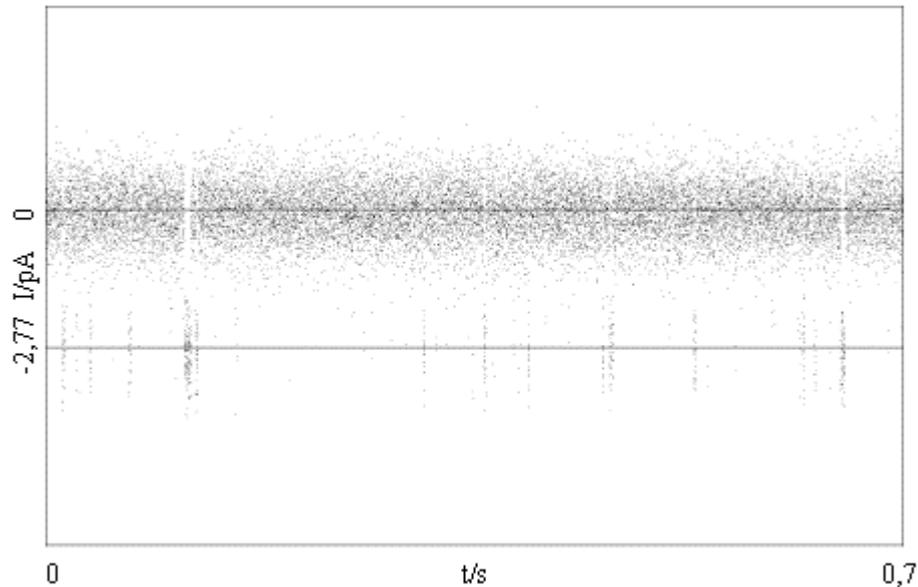


Abbildung 11.6: 0,7 s langer Ausschnitt einer mit dem Markov-Modell aus Abbildung 11.4 simulierten Zeitreihe, Abtastfrequenz 100 kHz, Abknickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 20 kHz.

Die simulierte Zeitreihe gibt die Charakteristika der gemessenen Zeitreihe aus Abbildung 11.2 nicht wieder. Die Aufenthalte auf dem Offen-Niveau sind zu kurz, dafür wird zu häufig in den Offen-Zustand geschaltet. Die langen Geschlossen-Phasen ohne Schalten fehlen.

Die folgende Abbildung zeigt das Amplitudenhistogramm der simulierten Zeitreihe verglichen mit dem Amplitudenhistogramm der gemessenen Zeitreihe.

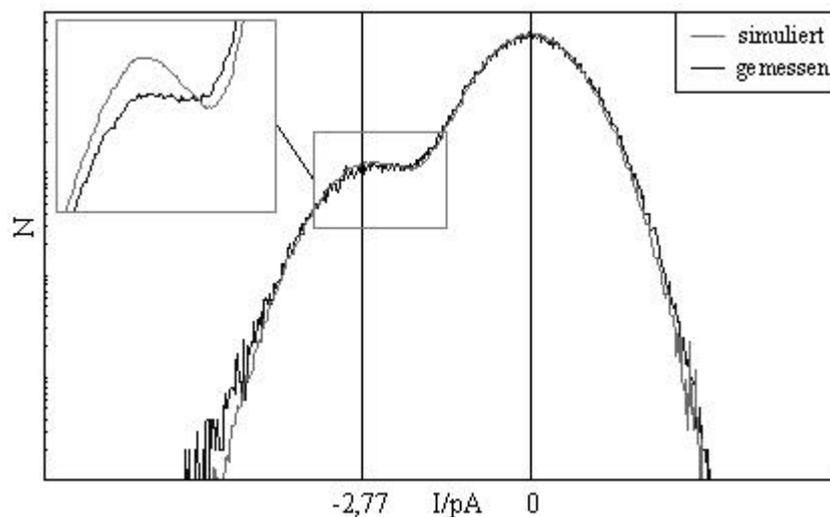


Abbildung 11.7: Amplitudenhistogramm der gemessene Zeitreihe aus Abbildung 11.2 verglichen mit dem Amplitudenhistogramm der simulierten Zeitreihe aus Abbildung 11.6; Ausschnittsvergrößerung geglättet.

Die Darstellung zeigt auf ersten Blick eine gute Übereinstimmung der Verteilungen von gemessener und simulierter Zeitreihe. In der Ausschnittsvergrößerung der auf dem Offen-Niveau liegenden Werte zeigt sich jedoch, dass die simulierte Zeitreihe zu viele Werte auf dem Offen-Niveau hat. Die Abweichung beträgt mehr als 10%. Da die Besetzungswahrscheinlichkeit im allgemeinen sehr genau angefittet wird (Blunck et al., 1998), handelt es sich um eine signifikante Abweichung.

Die Tatsache, dass mit den vom Joint-Fit-Verfahren gefundenen Übergangsraten weder der Zeitverlauf noch das Amplitudenhistogramm von gemessener und simulierter Zeitreihe übereinstimmen, legt die Vermutung nahe, dass für das zugrunde gelegte A-O-G-C-Z-Modell kein geeigneter Satz von Übergangsraten existiert. Das A-O-G-C-Z-Modell ist nicht in der Lage, das Verhalten des Kanals richtig zu beschreiben.

11.2. Z-A-C-O-G-Modell

Im folgenden wird untersucht, ob das Verhalten des Kanals möglicherweise mit einem anderen Fünf-Zustands-Modell besser wiedergegeben werden kann. Das bisher verwendete A-O-G-C-Z-Modell ist offensichtlich nicht geeignet, die charakteristischen Merkmale der Zeitreihe wiederzugeben.

Möglicherweise gelingt dies besser mit einem Modell, in dem die beiden Offen-Zustände A und O nicht unmittelbar nebeneinander liegen. Der Auswertung der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 wird deswegen erneut durchgeführt, dieses Mal auf der Basis eines Z-A-C-O-G-Modells.

Mit diesem Modell kommt das Joint-Fit-Verfahren bei einem Gewichtungsfaktor von $g=1000$ zu folgenden Übergangsraten:

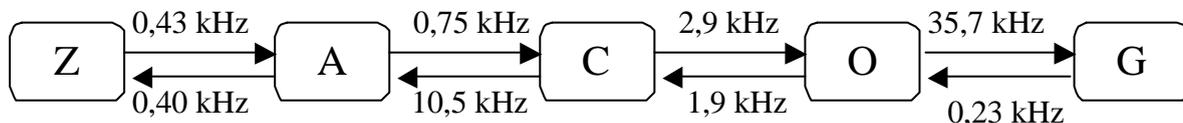


Abbildung 11.8: Übergangsraten, die das Joint-Fit-Verfahren in der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 auf Basis eines Z-A-C-O-G-Modells findet.

Der Zeitreihenfit kommt zu diesem Ergebnis:

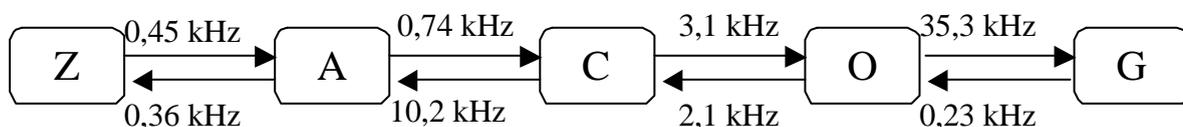


Abbildung 11.9: Übergangsraten, die der Direkte Zeitreihenfit in der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 mit dem Z-A-C-O-G-Modell findet.

Wie es bei einem nicht von der Normalverteilung abweichenden Amplitudenhistogramm erwartet werden kann, stimmen die Ergebnisse von Joint-Fit-Verfahren und Direktem Zeitreihenfit überein. Diese Übereinstimmung stellt einen Hinweis dar, dass das Z-A-C-O-G-Modell besser als das A-O-G-C-Z-Modell in der Lage ist, das Verhalten des der Zeitreihe aus Abbildung 11.2 zugrundeliegenden Kanals zu beschreiben.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wird nun zusätzlich eine Zeitreihe mit den von beiden Verfahren gefundenen Raten simuliert. Es wird verglichen, ob zeitlicher Verlauf und Verteilung der Werte dieser simulierten Zeitreihe mit der gemessenen Zeitreihe übereinstimmen.

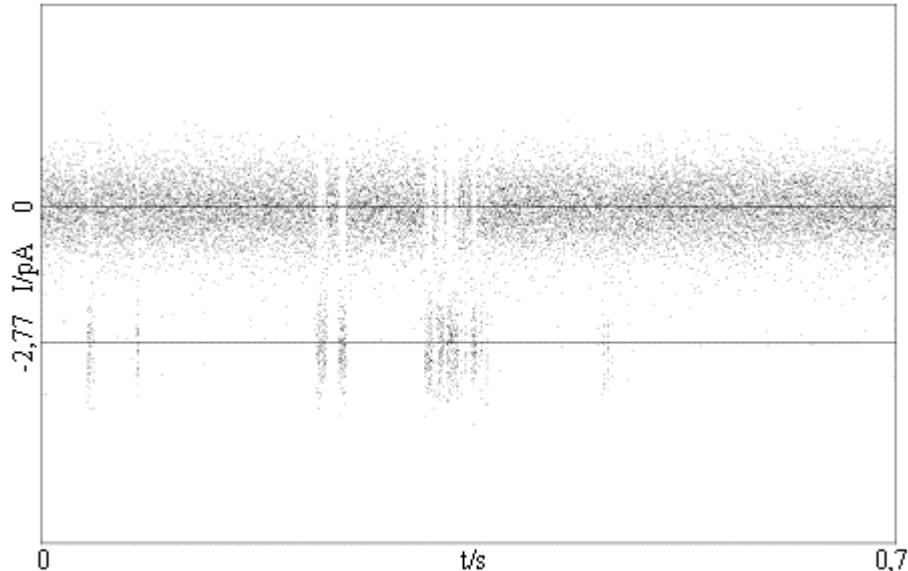


Abbildung 11.10: 0,7 s langer Ausschnitt einer mit dem Markov-Modell aus Abbildung 11.8 simulierten Zeitreihe, Abtastfrequenz 100 kHz, Abnickfrequenz des Besselfilters vierter Ordnung 20 kHz.

Diese simulierte Zeitreihe entspricht in ihren Charakteristika der gemessenen Zeitreihe. Es gibt lange Geschlossen-Abschnitte ohne Schalten, die Aufenthalte auf dem Niveau sind zum Teil sehr kurz, zum Teil deutlich länger.

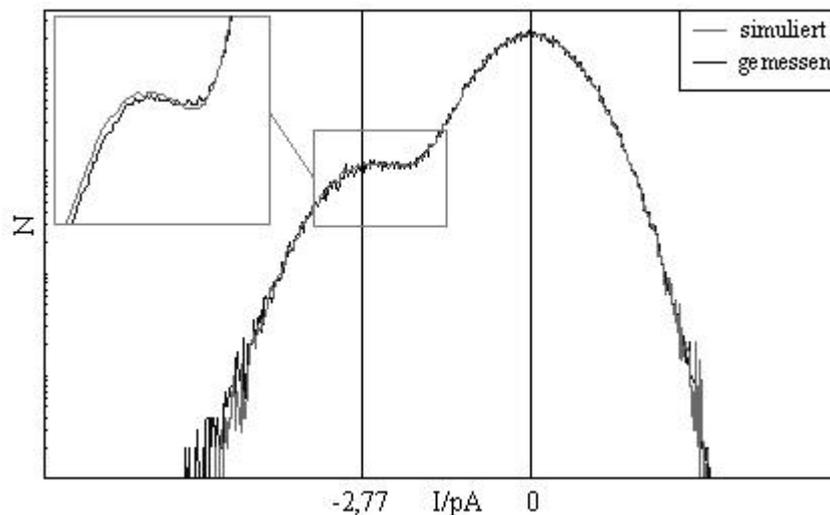


Abbildung 11.11: Amplitudenhistogramm der gemessene Zeitreihe aus Abbildung 11.2 verglichen mit dem Amplitudenhistogramm der simulierten Zeitreihe aus Abbildung 11.10; Ausschnittsvergrößerung geglättet.

Das auf Basis des Z-A-C-O-G-Modells aus Abbildung 11.8 simulierte Amplitudenhistogramm stimmt exakt mit dem gemessenen Amplitudenhistogramm überein.

Damit ist gezeigt, dass das A-O-G-C-Z-Modell für die vorliegende Zeitreihe nicht passt. Mit den für das Z-A-C-O-G-Modell gefundenen Übergangsraten stimmen sowohl der

zeitliche Verlauf als auch das Amplitudenhistogramm von gemessener und simulierter Zeitreihe überein. Weiterhin finden das Joint-Fit-Verfahren und der Direkte Zeitreihenfit auch den gleichen Satz von Übergangsraten. Dies entspricht der Erwartung, da das Amplitudenhistogramm nur minimal von der durch die Summe der Gaußverteilungen vorgegebenen Normalverteilung abweicht.

Das Z-A-C-O-G-Modell ist folglich im Gegensatz zum A-O-G-C-Z-Modell geeignet, das Verhalten der hier ausgewerteten Zeitreihe korrekt wiederzugeben.

12. Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, verbesserte Verfahren für die Ermittlung von Übergangsraten aus Zeitreihen von Patch-Clamp-Messungen einzuführen. Es wurde erreicht.

Bereits die Erweiterung des Betafits auf Filter höherer Ordnung stellt eine echte Bereicherung des Spektrums an Auswerteverfahren für Messreihen dar. Mit dem Erweiterten Betafit existiert nunmehr erstmals ein für die Auswertung echter Messreihen geeignetes Verfahren, das speziell darauf ausgelegt ist, schnelle Übergangsraten zu detektieren.

Nachdem die grundsätzliche Leistungsfähigkeit des Verfahrens durch umfangreiche Untersuchungen an simulierten Zeitreihen nachgewiesen wurde, wurde beispielhaft die Anwendbarkeit des Verfahrens auf echte Messreihen gezeigt. In Zeitreihen von Patch-Clamp-Messungen findet man neben den auf den Nominalniveaus liegenden Messwerten häufig eine große Anzahl von Werten, die weder dem Offen- noch dem Geschlossen-Niveau direkt zugeordnet werden können. Diese Werte liegen auf einem sogenannten Sublevel. Bisher war die Untersuchung, ob diese Sublevel durch Gating oder durch einen Permeationsprozess entstehen, mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Mit Hilfe des Erweiterten Betafits kann nun direkt unterschieden werden, ob die Verteilung der Werte auf dem Sublevel durch schnelles Schalten erzeugt wurde oder nicht. Insbesondere eröffnet der Erweiterte Betafit damit auch die Möglichkeit festzustellen, ob eine gemessene Reduzierung des Einzelkanalstroms ihre Ursache in schnellem Kanalschalten findet.

Schwächen des Erweiterten Betafits liegen darin, dass er Schwierigkeiten hat, langsame Übergangsraten zu erkennen und empfindlich auf eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses reagiert. Weiterhin negativ auf die Filtergebnisse wirkt es sich aus, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis nur ungenau bestimmt wurde. Ungeeignet ist der Betafit für die Auswertung von Zeitreihen minderer Qualität, weil bereits bei einer leichten Drift das Amplitudenhistogramm so verfälscht wird, dass ein exaktes Anfitzen unmöglich wird.

Trotz des Fortschritts, den der Erweiterte Betafit bietet, ist er also kein Verfahren, das für sich alleine genommen die umfassende Auswertung von Patch-Clamp-Messungen leisten kann.

Zu einem sehr umfassenden Auswerteverfahren kommt man jedoch, wenn man mittels einer Joint-Fit-Strategie den Direkten Zeitreihenfit und den Erweiterten Betafit in einem Verfahren kombiniert. Im Gegensatz zu den Einzelverfahren, die entweder nur die Zeitreihe oder nur das Amplitudenhistogramm auswerten, maximiert das Joint-Fit-Verfahren gleichzeitig die Übereinstimmung des Markov-Modells sowohl mit der Zeitreihe als auch mit dem Amplitudenhistogramm. In zahlreichen Auswertungen simulierter Zeitreihen konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise die Vorteile von Direktem Zeitreihenfit und Erweitertem Betafit in einem Verfahren vereint werden.

Etwas erschwert wird die Anwendung des Joint-Fit-Verfahrens dadurch, dass ein einheitlicher Faktor für die richtige Gewichtung der aus Amplitudenhistogramm und Zeitreihe gewonnenen Informationen nicht existiert. Vielmehr ist es erforderlich, einen geeigneten Gewichtungsfaktor durch Intervallschachtelung zu bestimmen. Vor der Auswertung echter Messreihen ist also immer die Betrachtung einiger simulierter Zeitreihen zum Herausfinden des passenden Gewichtungsfaktors erforderlich.

Diese kleine Einschränkung der praktischen Handhabung ändert jedoch nichts an der Tatsache, dass das Joint-Fit-Verfahren in der Summe seiner Fähigkeiten die Leistungsfähigkeit der bisher bekannten Verfahren deutlich übersteigt.

Eine wesentliche Hürde, die es zu überwinden gilt, bevor die beschriebenen Verfahren überhaupt zum Einsatz kommen können, besteht darin festzustellen, welches Markov-Modell der Zeitreihe zugrunde liegt. Als A-priori-Information werden benötigt die Zahl der Offen- sowie der Geschlossen-Zustände des Modells und die Anordnung diese Zustände zueinander.

Ein Verfahren, das in der Lage ist, das Markov-Modell direkt aus der Zeitreihe zu gewinnen, existiert bisher nicht. Das Standardverfahren bestand bislang darin, eine Zeitreihe mit verschiedenen Modellen auszuwerten und sich anhand von Plausibilitätsüberlegungen für eines der Modelle zu entscheiden. Parallel zu dieser Arbeit wurde der 2-D-Dwell-Time-Fit implementiert (Huth, 2003). Dieses Verfahren könnte erstmals einen objektiven Maßstab für die Vereinbarkeit der Zeitreihe mit einem bestimmten Markov-Modell bieten. Allerdings ist das Verfahren sehr rechenaufwändig und konnte deswegen noch nicht umfassend getestet werden.

Einen alternativen Ansatz zur Modellerkennung zeigt Kapitel 11 auf. Notwendige Bedingung dafür, dass das Kanalverhalten mit einem bestimmten Markov-Modell beschrieben werden kann, ist es, dass eine aus dem gefitteten Markov-Modell simulierte Zeitreihe sowohl das Amplitudenhistogramm als auch die wesentlichen Charakteristika der Zeitreihe korrekt wiedergibt. Gibt also das mit dem Joint-Fit-Verfahren gewonnene Markov-Modell die Zeitreihe und das Amplitudenhistogramm nicht richtig wieder, kann dies als Indiz gewertet werden, dass die Auswertung auf einem falschen Markov-Modell basiert. Ein möglicher Ansatz für Nachfolgearbeiten könnte es sein, das in Kapitel 11 aufgeworfene Verfahren weiter auszubauen.

Ist die richtige Konfiguration der Zustände im Markov-Modell bekannt, steht für die Ermittlung der Übergangsraten aus der Zeitreihe mit den in dieser Arbeit eingeführten Verfahren ein leistungsfähiges Spektrum an Werkzeugen zur Verfügung. Mit diesen sollte in zukünftigen Arbeiten ein merklicher Fortschritt bei der modellhaften Beschreibung der Vorgänge in Ionenkanälen zu erzielen sein.

13. Zusammenfassung

Bei der Auswertung von Patch-Clamp-Messungen unter der Annahme, dass das Schaltverhalten der Ionenkanäle durch diskrete Markov-Modelle beschrieben werden kann, ist die Ermittlung der Übergangsraten zwischen den Zuständen des Markov-Modells ein wesentliches Problem. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Sie hat das Ziel, die Leistungsfähigkeit bestehender Fitverfahren zu erhöhen.

Die Arbeit basiert auf in der Arbeitsgruppe vorhandenen Verfahren, die in der Lage sind, die Zeitreihe direkt und ohne informationsvermindernde Vorbehandlung (wie beispielsweise Sprungerkennung) auszuwerten. Das zentrale Verfahren, das diese Anforderung erfüllte, war der Direkte Zeitreihenfit von Albertsen und Hansen (1994). Darüber hinaus existierte noch der Betafit (Rießner, 1998), der dieses Kriterium zwar grundsätzlich erfüllte, der wegen seiner Beschränkung auf Filter erster Ordnung jedoch nicht für die Auswertung echter Messreihen geeignet war.

Im ersten Ansatz wird versucht, eine Verbesserung durch einen unmittelbaren Eingriff in den Algorithmus des Direkten Zeitreihenfits herbeizuführen. Anstatt bisher nur eines werden im Prädiktionsschritt mehrere zurückliegende Messwerte berücksichtigt. Es kann gezeigt werden, dass sich durch diese Maßnahme unter bestimmten Voraussetzungen tatsächlich das Zeitauflösungsvermögen für schnelle Übergangsraten verbessert. Erkauft wird diese Verbesserung mit einer deutlich erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Signal-Rausch-Verhältnis. Diese höheren Anforderungen an das Signal-Rausch-Verhältnis überwiegen die beim Zeitauflösungsvermögen erzielten Fortschritte, so dass insgesamt nicht von einer Verbesserung gesprochen werden kann. Der Ansatz einer Mehrschrittprädiktion im Direkten Zeitreihenfit wird deswegen aufgegeben und nicht weiter verfolgt.

Der nächste Schritt setzt beim Betafit an. Das Verfahren ist in seiner vormaligen Form auf Filter erster Ordnung beschränkt und deswegen vorwiegend von akademischem Interesse. In echten Messapparaturen werden nämlich wegen des besseren Frequenzganges regelmäßig Filter höherer Ordnung verwendet. Die Erweiterung des Betafits auf Filter höherer Ordnung gelingt dadurch, dass die Amplitudenhistogramme nicht mehr analytisch berechnet, sondern simuliert werden.

In umfangreichen Auswertungen simulierter Zeitreihen wird die Leistungsfähigkeit des erweiterten Verfahrens untersucht. Beim Ein-Kanal-C/O-Modell werden ausführlich das Zeitauflösungsvermögen und die Abhängigkeit vom Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt. Da den Ionenkanälen in der Praxis kompliziertere Modelle zugrundeliegen, werden anschließend Fünf-Zustands-Modelle gefittet, um zu überprüfen, inwiefern die Aussagen vom einfachen C/O-Modell auf kompliziertere Modelle übertragbar sind. Alle diese Tests werden sowohl mit Zeitreihen vom Einzelkanal als auch mit Zeitreihen von zwei gleichartigen Kanälen durchgeführt.

Auf diese Weise kann nachgewiesen werden, dass der Erweiterte Betafit die Übergangsraten in mit Filtern vierter Ordnung erzeugten Zeitreihen zumindest ebenso gut findet wie der bisherige Betafit in Zeitreihen von Filtern erster Ordnung. Bei starkem Rauschen übersteigt die Leistungsfähigkeit des erweiterten Verfahrens sogar die des bisherigen. Mit dem Erweiterten Betafit steht erstmals ein Verfahren für die Auswertung

echter Messreihen zur Verfügung, das speziell auf die Auswertung schnellen Schaltens gerichtet ist.

Bei den Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit von Betafit und Direktem Zeitreihenfit stellt sich heraus, dass die beiden Verfahren sehr unterschiedliche Vorzüge aufweisen. Der Direkte Zeitreihenfit ist eher geeignet für langsame Übergangsraten. Dafür ist er unempfindlicher gegenüber einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Der Betafit findet die jenseits der Abknickfrequenz des Tiefpassfilters liegenden schnellen Übergangsraten besser heraus.

Mittels einer Joint-Fit-Strategie werden in einem nächsten Schritt beide Verfahren zu einem zusammengeführt, mit dem Ziel, die jeweiligen Vorteile zu vereinen. Dadurch, dass in einem Verfahren sowohl die Zeitreihe als auch das Amplitudenhistogramm angefitet werden, ist die Informationsgrundlage gegenüber den Einzelverfahren, die ihre Informationen jeweils nur aus einer der beiden Quellen beziehen, erheblich verbreitert.

Von Nachteil ist es, dass eine allgemeine Aussage, in welchem Verhältnis die aus Zeitreihe bzw. Amplitudenhistogramm gewonnenen Informationen zueinander zu gewichten sind, nicht möglich erscheint. Ein geeigneter Gewichtungsfaktor zwischen beiden muss deswegen durch Intervallschachtelung gewonnen werden. Es ist also immer erforderlich, einige simulierte Zeitreihen auszuwerten, um den passenden Gewichtungsfaktor für das Markov-Modell zu finden, bevor echte Zeitreihen bearbeitet werden können.

Mit den gleichen Untersuchungsmethoden wie schon beim Erweiterten Betafit wird gezeigt, dass das Joint-Fit-Verfahren die Vorzüge von Direktem Zeitreihenfit und Erweitertem Betafit in sich vereint.

Anschließend wird die praktische Anwendbarkeit der neu eingeführten Verfahren an einigen echten Patch-Clamp-Aufzeichnungen demonstriert. Zunächst wird das in Messreihen häufig auftretende Phänomen der Sublevel betrachtet. In einer Zeitreihe existieren dann Messwerte, die sich weder dem Offen- noch dem Geschlossen-Niveau des Kanals zuordnen lassen, sondern die in der Mitte zwischen beiden liegen. Durch Anfitten eines derartigen Sublevels mit dem Erweiterten Betafit kann gezeigt werden, dass die Zwischenwerte in dieser Zeitreihe nicht aus einer veränderten Leitfähigkeit des Kanals resultieren, sondern aus schnellem Schalten zwischen Offen- und Geschlossen-Niveau. Dieses schnelle Schalten kann wegen der integrierenden Wirkung des Tiefpasses der Aufzeichnungsanlage nicht direkt aufgelöst werden.

Schließlich wird noch eine Anwendungsmöglichkeit des Joint-Fit-Verfahrens gezeigt. Bei der Auswertung einer Messung des K^+ -Kanals von *Chara corallina* mit dem A-O-G-C-Z-Modell ergibt sich, dass die mit den gefitteten Übergangsraten erzeugte Zeitreihe in wesentlichen Zügen nicht mit der gemessenen Zeitreihe übereinstimmt. Besser beschreiben lässt sich die ausgewertete Zeitreihe mit einem Z-A-C-O-G-Modell. Dies stellt einen Hinweis dar, dass der gemessenen Zeitreihe letzteres Modell zugrunde liegt.

Auf diese Weise ist das Joint-Fit-Verfahren in der Lage, einen Beitrag zur Modellunterscheidung zu leisten.

Literaturverzeichnis

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1990. Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage VCH, Weinheim.
- Albertsen A 1992. Erfassung und Auswertung schneller Schaltvorgänge bei Patch-Clamp Untersuchungen. Diplomarbeit Kiel.
- Albertsen A 1994. Fast Patch-Clamp Data Acquisition and Kinetic Analysis of Multi-Channel records – Schnelle Datenerfassung von Patch-Clamp-Daten und kinetische Analyse von Mehrkanalaufzeichnungen. Dissertation Kiel.
- Albertsen A, Hansen UP 1994. Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. Biophys. J. 67: 1393-1403.
- Assmann SM, Romano LA 1998. Secondary messenger regulation of ion channels/Plant patch clamping. Meths. Enzymology 294: 410-441.
- Ball FG, Sansom MSP 1988. Aggregated Markov processes incorporating time interval omission. Adv. Appl. Prob. 20: 546-572.
- Ball FG, Sansom MSP 1989. Ion channel gating mechanisms: model identification and parameter estimation from single channel recordings. Proc. Roy. Soc. Lond. B 236: 383-416.
- Ball FG, Rice JA 1992. Stochastic models for ion channels: introduction and bibliography. Math. Biosci. 112: 189-206.
- Benz R, Läuger P 1976. Kinetic analysis of carrier-mediated ion transport by the charge-pulse technique. J. Membr. Biol. 27: 171-191.
- Benz R, Cros D, Läuger P, Stark G 1980. Effects of lipid structure on the kinetics of carrier-mediated ion transport. Acta Physiol. Scand. Suppl. 481: 47-52.
- Berneche S, Roux B 2001. Energetics of ion conduction through the K⁺ Channel, Nature 414: 73-76.
- Bezaniilla F 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. Physiol. Rev. 80: 555-592.
- Blatt MR, Gradmann D 1997. K⁺-sensitive gating of the K⁺ outward rectifier in *Vicia faba* guard cells. J. Membr. Biol. 158: 241-256.
- Blunck R 1996. Nachweis des schnellen Schaltens beim Na⁺-Block des K⁺-Kanals in *Chara*. Diplomarbeit Kiel.
- Blunck R, Kirst U, Rießner T, Hansen UP 1998. How powerful is the Dwell-Time Analysis of Multichannel Records. J. Membr. Biol. 165: 19-35.

- Catterall WA 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.* 72: 15-48.
- Chung SH, Moore JB, Xia L, Premkumar LS, Gage PW 1990. Characterization of single-channel currents using digital signal processing techniques based on hidden Markov models. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 329: 265-285.
- Chung SH, Krishnamurthy V, Moore JB 1991. Adaptive Processing techniques based on Hidden Markov Models for characterizing very small channel currents buried in noise and deterministic interferences. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 334: 357-384.
- Chung SH, Gage PW 1998. Signal processing techniques for channel current analysis based on hidden Markov models. *Methods in Enzymology* 293: 420-437.
- Colquhoun D, Hawkes AG 1977. Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc. R. Soc. Lond. B* 199: 231-262.
- Colquhoun D, Hawkes AG 1981. On the stochastic properties of single ion-channels. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 211: 205-235.
- Colquhoun D, Hawkes AG 1982. On the stochastic properties of bursts of single ion-channel openings and of clusters of bursts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 300: 1-59.
- Colquhoun D, Hawkes AG 1987. A note on correlations in single ion channel records. *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 230: 15-52.
- Colquhoun D, Hawkes AG 1990. Stochastic properties of ion channel openings and bursts in a membrane patch that contains two channels: evidence concerning the number of channels present when a record containing only single openings is observed. *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 240: 453-477.
- Colquhoun D, Hawkes AG 1995. The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanism. In: *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, eds. Plenum Press, N.Y. pp. 589-633.
- Colquhoun D, Hawkes AG, Srodzinski K 1996. Joint distributions of apparent open times and shut times of single ion channel and the maximum likelihood fitting of mechanisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 354: 2555-1290.
- Conejero C 1997. Anion exchanger AE1 as a candidate pathway for taurine transport in rat erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 272: C1457-C1464.
- Corey DP, Stevens CF 1983. Science and technology of patch-recording electrodes. In: *Single Channel Recording*. Sakmann, B. and Neher, E., editors. Plenum Press, New York and London. pp 53-68.
- Crouzy SC, Sigworth FJ 1990. Yet another approach to the dwell-time omission problem of single-channel analysis. *Biophys. J.* 58: 731-743.
- Doyle DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- Draber S, Schultze R, Hansen UP 1993. Cooperative behavior of K⁺-channels in the tonoplast of *Chara corallina*. *Biophys. J.* 65: 1553-1559.

- Draber S 1994. Methods for analyzing fast single-channel data and studies on the K⁺ channel under Cs⁺ blockade and under control conditions. Dissertation, Kiel.
- Draber S, Schultze R 1994. Correction for missed events based on a realistic model of a detector. *Biophys. J.* 66: 191-201.
- Draber S, Hansen UP 1994. Fast single-channel measurements resolve the blocking effect of Cs⁺ on the K⁺ channel. *Biophys. J.* 67: 120-129.
- Durell SR, Guy HR 1992. Atomic scale structure and functional modes of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 62: 238-250.
- Durell SR, Guy HR 1998. Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K⁺ channels in open, closed, and inactivated conformations. *J. of Structural Biol.* 121: 263-284.
- Esser JE, Liao YJ, Schroeder JI 1997. Characterization of ion channel modulator effects on ABA and malate-induced stomatal movements: strong regulation by kinase and phosphatase inhibitors, and relative insensitivity to mastoparans. *J. Experimental Botany* 48: 539-550.
- Farokhi A, Keunecke M, Hansen UP 2000. The anomalous Mole Fraction Effect in *Chara*: Gating at the edge of temporal resolution. *Biophys. J.* 79: 3072-3082.
- Farokhi A 2002. Nachweis und Modellierung des Gatingmechanismus beim anomalen TI⁺/K⁺-Molfraktionseffekt im Vergleich zu spontanen Stromänderungen in Na⁺/K⁺-Lösung. Dissertation Kiel.
- FitzHugh R 1983. Statistical properties of the asymmetric random telegraph signal with application to single channel analysis. *Math. Biosci.*, 64, 75-89.
- Fredkin DR, Rice JA 1992. Maximum likelihood estimation and identification directly from single-channel recordings. *Proc. R. Soc. Lond. B* 249: 125-132.
- Galli A, Defelice LJ, Duke BJ, Moore KR, Blakely RD 1995. Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J. Exp. Biol.* 198: 2197-2212.
- Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402: 813-817.
- Haak T 2000. Entwicklung und Erprobung einer neuartigen Methode der Einzelkanalstrommessung in biologischen Membranen. Diplomarbeit Kiel.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 392: 85-100.
- Hansen UP, Albertsen A, Moldaenke C, Draber S, Schultze R 1995. Detecting events in signals from sensors: the Hinkley-detector is the answer. *Sensors Materials* 7: 289-300.
- Hansen UP, Keunecke M, Blunck R 1997. Gating and permeation models of plant channels. *J. Exp. Bot.* 48: 365-382.

- Harlfinger P 2000. Bestimmung sehr schneller Übergangsraten in Markov-Prozessen durch verbesserte Berücksichtigung der Amplitudenverteilung im direkten Zeitreihenfit. Diplomarbeit Kiel.
- Hawkes AG, Jalali A, Colquhoun D 1990. The distribution of the apparent open times and shut times in a single channel record when brief events cannot be detected. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 332: 511-538.
- Hedrich R, Bregante M, Dreyer I, Gambale F 1995. The voltage-dependent potassium-uptake channel of corn coleoptiles has permeation properties different from other K⁺ channels. *Planta* 197: 193-199.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R 1994. Mutations in the K⁺ channels signature sequence. *Biophys. J.* 66: 483-491.
- Hille B 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Huang XD, Ariki Y, Jack MA 1990. Hidden Markov Models for Speech Recognition. Edinburgh University Press, Edinburgh 276 pp.
- Huth T 2003. Untersuchung der Inaktivierung von vergifteten und mutierten Na⁺-Kanälen mit verschiedenen Methoden der Markov-Modellierung. Dissertation Kiel (in Arbeit).
- Jackson MB 1997. Inversion of Markov processes to determine rate constants from single-channel data. *Biophys. J.* 73: 1382-1394.
- Jan LY, Jan YN 1992. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 537-555.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 33-41.
- Keller BU, Hedrich R, Raschke K 1989. Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* 341: 450-453.
- Keunecke M 1995. Untersuchung des anomalen Mofraktionseffektes an der Grünalge *Chara corallina*. Diplomarbeit Kiel.
- Klein S, Timmer J, Honerkamp J 1997. Analysis of multi channel patch clamp recordings by Hidden Markov models. *Biometrics* 53: 870-884.
- Kleinig H, Maier U 1999. Zellbiologie. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Korn SJ, Horn R 1988. Statistical discrimination of fractal and Markov models of single-channel gating. *Biophys. J.* 54: 871-877.
- Kukulenz, D 1997. Entwicklung und Erprobung eines ML-Schätzers für die Parameterbestimmung bei Ionenkanälen aus Verweilzeithistogrammen durch die statistische Analyse von Aggregated Markov Prozessen. Diplomarbeit Kiel.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300: 1922-1926.
- Lankat-Buttgereit B, Tampé R 2002. The transporter associated with antigen processing: Function and implications in human diseases. *Physiol. Rev.* 82: 187-204.

- Larsson C, Möller IM, Widell S 1990. Introduction to the plant plasma membrane – Structure, Function and Molecular Biology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hongkong: 1-15.
- Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY 1996. Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4. *Neuron* 16: 287-397.
- Läuger P 1980. Kinetic properties of ion carriers and channels. *J. Membrane Biol.* 57: 163-178.
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K 1999. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79: 1317-1372.
- Levitt DG 1999. Modeling of ion channels. *J. Gen. Physiol.* 113: 789-794.
- Liebovitch LS, Fischbarg J, Koniarek JP, Todorova I, Wang M 1987. Fractal model of ion-channel kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 896: 173-180.
- Miller C 1991. Annus Mirabilis of potassium channels. *Science* 252: 1092-1096.
- Moss BL, Magleby KL 2001. Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9–S10 tail domain of the α Subunit: A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J. Gen. Physiol.* 118: 711-734.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 207: 599-605.
- Neher E, Sakman B 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Neher E, Stevens CF 1977. Conductance fluctuations and ionic pores in membranes. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 6, 345-381.
- Nultsch W 1982. Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Numberger M, Draguhn A 1996. Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Ophasi LR, Webb WW 1994. Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes. *Biophys. J.* 66: 75-79.
- Pawula R 1970. The transition probability density function of the low-pass filtered random telegraph signal. *Internat. J. Control* 12: 25-32.
- Pongs O. 1992. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 72: 69-88.
- Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA, Vetterling WT 1987. Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney.
- Rießner T 1994. Statistische Analyse von schnellen Schaltereignissen in Patch-Clamp-Daten mit Hilfe von erweiterten Betaverteilungen. Diplomarbeit Kiel.
- Rießner T 1998. Level Detection and Extended Beta Distributions for the Analysis of Fast Rate Constants of Markov Processes in Sampled Data – Automatische Niveaubestimmung und erweiterte Betaverteilungen für die Analyse schneller Ratenkonstanten von Markov-Modellen in gesampelten Daten. Dissertation Kiel.

- Sakman B, Neher E 1983. Geometric Parameters of pipettes and membrane patches. In: Single Channel Recording. Sakman B, Neher E, editors. Plenum Press, New York and London: 37-51.
- Sanders D, Hansen UP, Gradmann D, Slayman CL 1984. Generalized kinetic analysis of ion-driven cotransport systems: a unified interpretation of selective ionic effects on Michaelis parameters. *J. Membr. Biol.* 77: 123-152.
- Schottky W 1918. Über spontane Stromschwankungen in verschiedenen Elektrizitätsleitern. *Ann. d. Phys.* 57: 541-567.
- Schottky W 1922. Zur Berechnung und Beurteilung des Schroteffekts. *Ann. d. Phys.* 68: 157-176.
- Schröder I, Huth T, Suitchmezian V, Jarosik J, Hansen UP 2003. Distributions per level: A means of testing level detectors and models of patch clamp data. *J. Membr Biol.* (eingereicht).
- Schultze R, Draber S 1993. A nonlinear filter algorithm for the detection of jumps in patch-clamp data. *J. Membr. Biol.* 132: 41-52.
- Singer SJ, Nicolson GL 1972. The fluid mosaic model of cell membranes. *Science* 173: 720-731.
- Stryer L 1996. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, 4 Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Sutter U 1996. Biophysikalische Untersuchungen an Xylemkontaktzellen: Präparation, Meßtechnik, Transporteigenschaften und Modellentwicklung. Diplomarbeit Kiel.
- Tester M 1988. Potassium channels in the plasmalemma of *Chara corallina* are multiion pores: voltage-dependent blockade by Cs⁺ and anomalous permeabilities. *J. Membr. Biol.* 105: 87-94.
- Tietze U, Schenk C 1971. Halbleiter-Schaltungstechnik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Vanselow KH, Hansen UP 1989. Rapid effect of light on the K⁺-channel in the plasmalemma of *Nitella*. *J. Membr Biol.* 110: 175-187.
- Yang PK, George AI Jr, Horn R 1996. Molecular basis of charge movement in voltage gated sodium channels. *Neuron* 16: 113-122.
- Yellen G 1984. Ionic permeation and blockade in Ca²⁺ activated K⁺ channels of bovine chromaffin cells. *J. Gen. Physiol.* 84: 157-86.
- Yeo GF, Milne RK, Edeson RO, Madsen BW 1988. Statistical inference from single channel records: two state Markov model with limited time resolution. *Proc. R.Soc. Lond. B.* 235: 63-94.
- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-48.