

Nichtlineare Regression – (Graphpad Prism)

Copyright (c) 2007 by STATCON B. Schäfer, Schulstr. 2, 37213 Witzenhausen, Germany. All rights reserved.
 Dr. Dr. David Meintrup (STATCON B. Schäfer)
 Contact: vertrieb@statcon.de

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	Schritt 1: Auswahl des Modells	1
1.2	Wie findet man das richtige Modell?	3
1.3	Schritt 2: Auswahl der anzupassenden Parameter, Nebenbedingungen	4
1.4	Schritt 3: Auswahl der Startwerte	4
1.5	Schritt 4: Ausführung der Analyse und Interpretation der Ergebnisse	5
1.6	Schritt 5: Überprüfung der Voraussetzungen	7
2	KLASSISCHE FUNKTIONEN – ÜBERSICHT	8
3	KLASSISCHE FUNKTIONEN – DETAILS UND ANWENDUNGEN	9
3.1	Einfache Bindungsfunktion (One-site Binding)	9
3.1.1	Anwendung 1: spezifische Bindung	9
3.1.2	Anwendung 2: Enzymkinetik	9
3.1.3	Verallgemeinerung: Zweifache Bindungsfunktion (Two-site Binding)	10
3.2	Einfache Wettbewerbsfunktion (One-site Competition)	11
3.2.1	Anwendung: Bindung konkurrierender Liganden	11
3.2.2	Verallgemeinerung: Zweifache Wettbewerbsfunktion (Two-Site Competition)	12
3.2.3	Wann verwendet man das allgemeinere Modell?	12
3.3	Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion (Sigmoidal Dose-Response)	13
3.3.1	Allgemeines, Agonist, Antagonist	13
3.3.2	Warum eine logarithmische X-Skala?	14
3.3.3	EC50, ED50, IC50	14
3.3.4	Steigung – konstant oder variabel?	14
3.4	Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung (Sigmoidal Dose-Response, variable slope)	15
3.5	Boltzmann-Sigmoidfunktion (Boltzmann Sigmoidal)	16
3.5.1	Wann logistische Funktion, wann Boltzmann-Sigmoidfunktion?	16
3.6	Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion (One-Phase Exponential Decay)	17
3.6.1	Verallgemeinerung: Zweiphasige exponentielle Zerfallsfunktion (Two-Phase exponential decay)	18
3.7	Einphasige exponentielle Assoziationsfunktion (One-phase exponential association)	19
3.7.1	Verallgemeinerung: Zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion (Two-phase exponential association)	20
3.8	Exponentielle Wachstumsfunktion (Exponential Growth)	20
4	ÄQUIVALENTE FUNKTIONEN IN JMP	21
4.1	Einfache Bindungsfunktion	21
4.2	Einfache Wettbewerbsfunktion	21
4.3	Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion	21
4.4	Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung	21
4.5	Boltzmann Sigmoidfunktion	21
4.6	Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion	21
4.7	Einphasige exponentielle Assoziationsfunktion	21
4.8	Exponentielle Wachstumsfunktion	21

Disclaimer:

License / Usage Agreement

STATCON B. SCHÄFER IS PROVIDING YOU WITH THE COMPUTER SOFTWARE CODE AND/OR INFORMATION TEXT INCLUDED WITH THIS AGREEMENT ON AN "AS IS" BASIS, AND AUTHORIZES YOU TO USE THE CODE AND INFORMATION TEXT SUBJECT TO THE TERMS HEREOF. BY USING THE CODE AND INFORMATION TEXT, YOU AGREE TO THESE TERMS. YOUR USE OF THE CODE AND INFORMATION TEXT IS AT YOUR OWN RISK. STATCON MAKES NO REPRESENTATION OR WARRANTY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, NON-INFRINGEMENT AND TITLE, WITH RESPECT TO THE CODE AND INFORMATION TEXT.

The code has not necessarily been tested and the information text has not necessarily been reviewed. Accordingly, STATCON B. Schäfer makes no representation or warranty that the code and the content of text will operate error-free. STATCON B. Schäfer is under no obligation to maintain or support the Code.

STATCON B. Schäfer shall not be liable to you or any third party for any general, special, direct, indirect, consequential, incidental or other damages whatsoever arising out of or related to your use or inability to use the Code, even if STATCON B. Schäfer has been advised of the possibility of such damages.

You are not allowed to distribute containing information and make further use of included code and information text in your own projects without asking STATCON B. Schäfer.

Please ask us for enhanced versions of included information and code.

1 Einführung

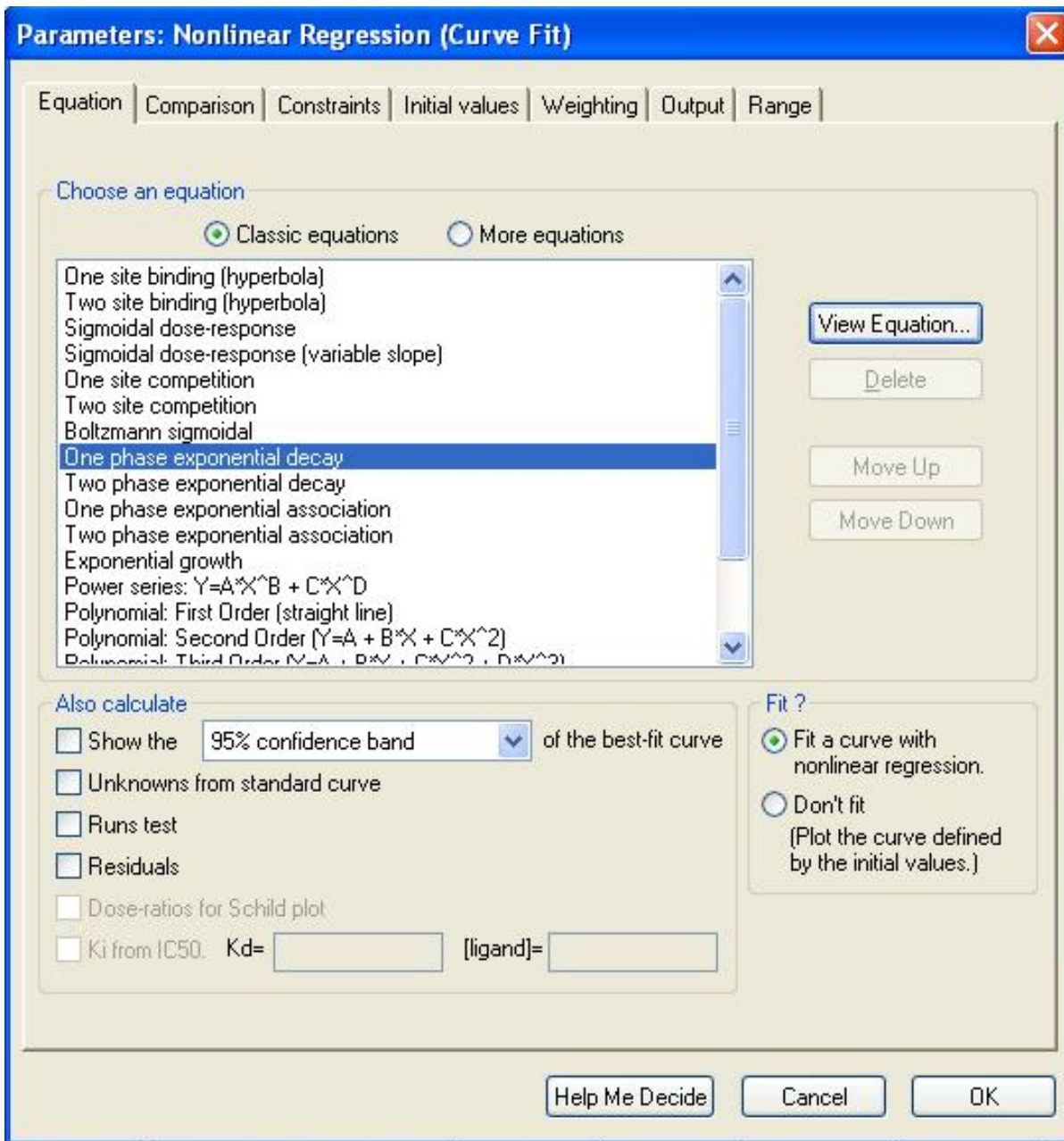
Nichtlineare Regression wird dazu verwendet, ein Modell, das einen funktionalen Zusammenhang zwischen einer unabhängigen Variable X und einer abhängigen Variable Y beschreibt, an gegebene Daten anzupassen.

1.1 Schritt 1: Auswahl des Modells

Hat man sich für eine nichtlineare Regression als Analyseverfahren entschieden, so benötigt man ein Modell, das an die Daten angepasst werden soll. Als Beispiel betrachten wir Daten über den Zerfall eines radioaktiven Isotops:

	X Values	A
	Zeit [s]	% nicht zerfall. Isotope
	X	Y
1	0	100.0
2	10	55.8
3	20	33.2
4	30	24.6
5	40	16.2
6	50	2.9

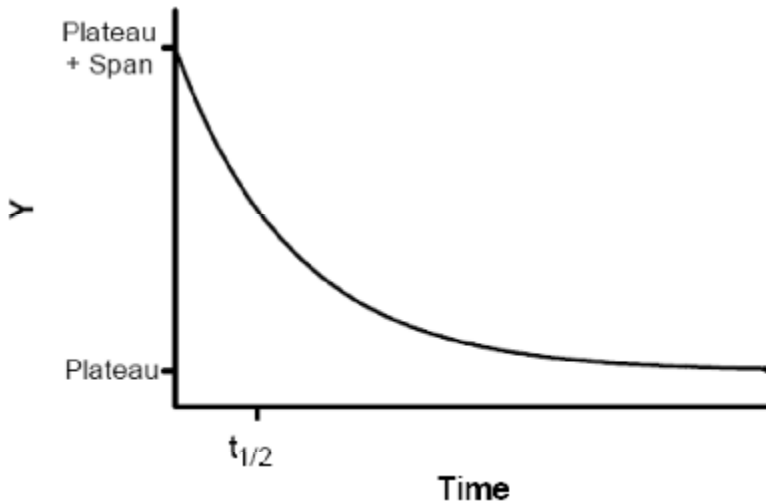
Die unabhängige X-Variable beschreibt die Zeit in Sekunden, die Y-Variable entspricht dem experimentell gemessenen prozentualen Anteil zum Zeitpunkt X noch nicht zerfallener Isotope. Nun ist aus der Physik bekannt, dass der Zerfallsprozess durch ein exponentielles Zerfallsmodell beschrieben wird, das wir als mathematisches Modell auswählen.



Die zugehörige Formel hat die folgende Gestalt:

$$Y = \text{Span} \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Plateau}$$

Das Modell stellt in allgemeiner Form einen funktionellen Zusammenhang zwischen einer unabhängigen Variable X (z.B. Zeit) und einer abhängigen Variable Y (z.B. Anteil nicht-zerfallener Isotope) dar.



Zusätzlich enthält jedes Modell Parameter, in unserem Beispiel sind dies:

Parameter:	<i>Plateau</i>	untere Schranke des Zerfalls
	<i>Span</i>	$Span + Plateau$ ist Ausgangswert zur Zeit $t = 0$
	<i>K</i>	Zerfallsrate

Das „Anpassen eines Modells“ bedeutet nun genauer, unter allen zugelassen Werten für die Parameter im Modell diejenige Wahl zu treffen, die die gemessenen Daten „am besten“ erklärt. Die Standardmethode zur Auswahl dieses Modells ist die Minimierung der Abweichungsquadrate („least squares method“).

1.2 Wie findet man das richtige Modell?

Bevor man eine Regressionsanalyse startet, muss man sich für ein Modell entscheiden. Sollte dies als eine schwierige Aufgabe erscheinen, scheint es verlockend, die Auswahl des Modells einem Computerprogramm (z.B. TableCurve von SYSTAT) zu überlassen. Vor diesem Vorgehen sei ausdrücklich gewarnt. Nimmt man beispielsweise nur die Klasse der Polynomfunktionen, so wird man in der Regel eine Funktion finden, die hinreichend gut die gemessenen Daten vorhersagt, wenn man den Grad des Polynoms groß genug wählt. Jedoch wird die Interpretation des Parameters der angepassten Polynomfunktion nur in den seltensten Fällen gelingen! Daher ist das Modell für eine wissenschaftliche Auswertung nicht zu gebrauchen. Genau dieses Problem stellt sich auch bei der automatisierten Auswahl eines Modells durch einen Computer. Dieser hat keinerlei Kenntnisse über den wissenschaftlichen Hintergrund des zugrunde liegenden Experiments und kann diesen daher bei der Modellauswahl nicht berücksichtigen. Dies ist jedoch Voraussetzung für die Interpretierbarkeit der Parameter des Modells. Zusammengefasst bedeutet dies: die Modellauswahl ist keine mathematische oder statistische Aufgabe, sondern eine wissenschaftliche. Möchte man einen physikalischen, chemischen oder biologischen Zusammenhang erklären, muss die Modellauswahl von Wissenschaftlern mit dem entsprechenden Expertenwissen getroffen werden.

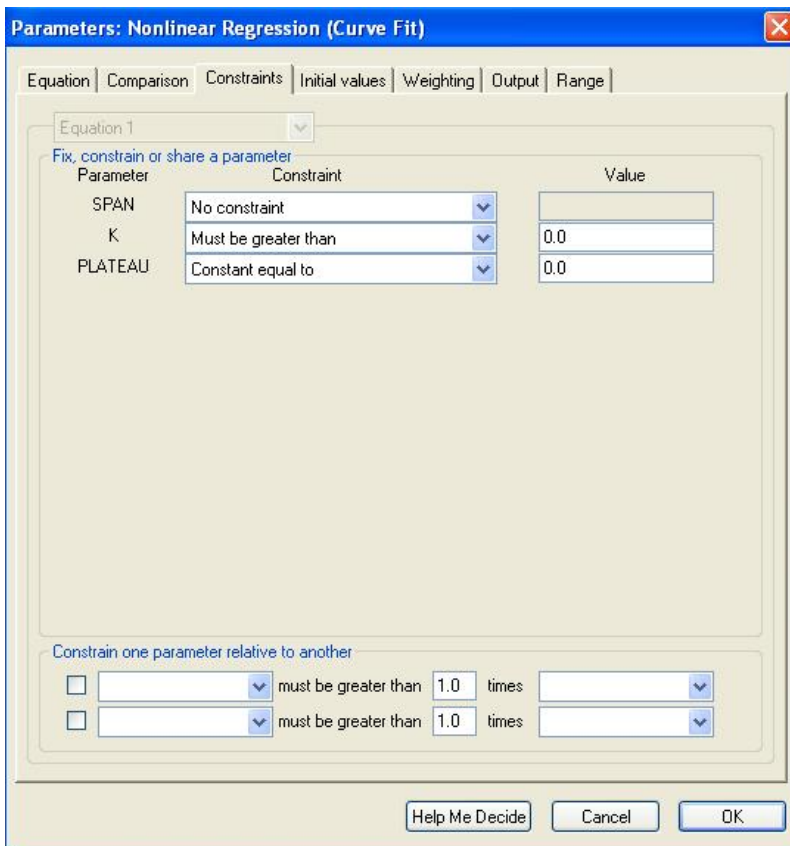
Nach der Durchführung der Regressionsanalyse besteht die Möglichkeit, die Güte der Modellanpassung zu bewerten und ggf. ein erweitertes oder anderes Modell anzupassen.

1.3 Schritt 2: Auswahl der anzupassenden Parameter, Nebenbedingungen

Hat man ein Modell ausgewählt, so muss man entscheiden, welche Parameter an die Daten angepasst werden sollen, in welchem Bereich diese variieren dürfen und welche Parameter vor der Anpassung auf einen festen Wert gesetzt werden. Betrachten wir erneut das Modell für den radioaktiven Zerfall,

$$Y = \text{Span} \cdot \exp(-K \cdot X) + \text{Plateau}$$

so ist bekannt, dass im Grenzwert großer Zeit alle radioaktiven Isotope zerfallen sind. Daher ist es geboten, in diesem Fall den Parameter $\text{Plateau} = 0$ zu setzen und nicht durch die Regression anzupassen. Da es sich um einen abfallenden Zerfallsprozess handelt, ist ebenfalls die Nebenbedingung $K > 0$ sinnvoll, da für negative K ein Wachstumsprozess dargestellt wird.

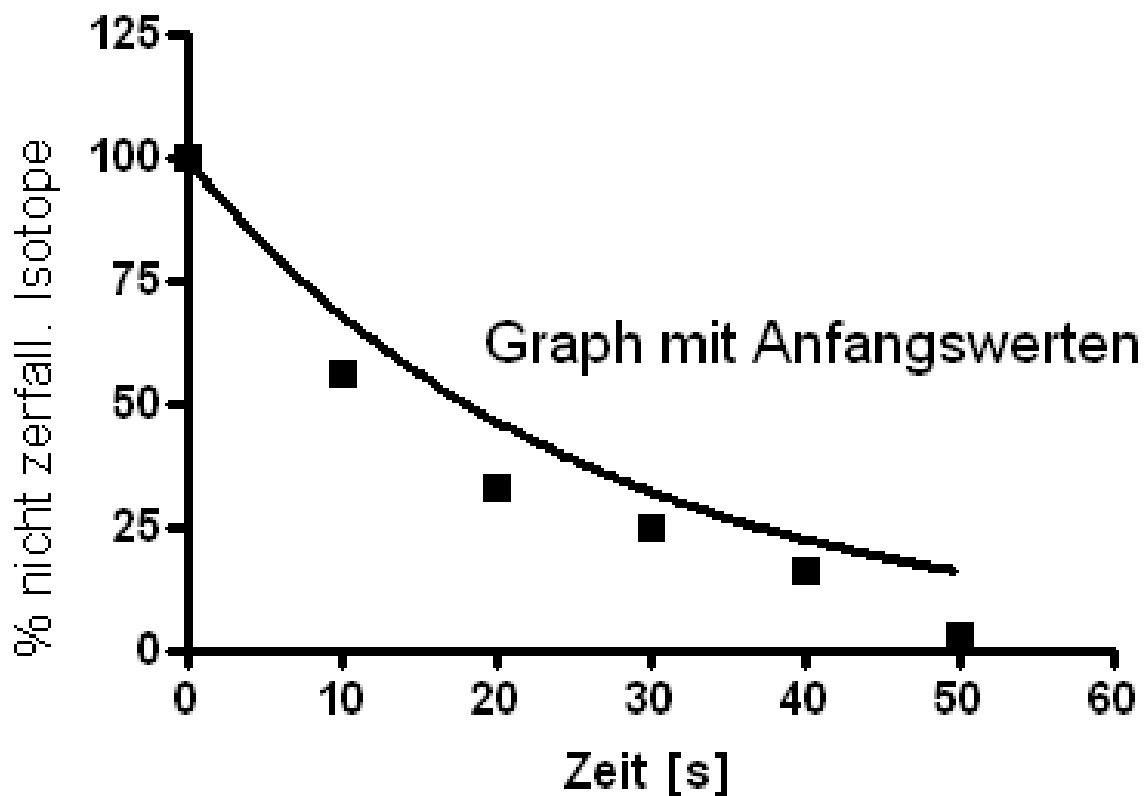


Parameter	Constraint	Value
SPAN	No constraint	
K	Must be greater than	0.0
PLATEAU	Constant equal to	0.0

1.4 Schritt 3: Auswahl der Startwerte

Nichtlineare Regression ist ein iterativer Prozess. Daher ist es erforderlich, den anzupassenden Parametern Startwerte zuzuordnen. Dies kann von großer Bedeutung sein, da bei falsch gesetzten Startwerten der Iterationsprozess u.U. nicht konvergiert. Hat man Startwerte ausgewählt, empfiehlt es sich, das Anfangsmodell über die gegebenen Daten zu zeichnen, um zu überprüfen, dass das Startmodell zumindest grob an die Daten angepasst ist.

Radioaktiver Zerfall

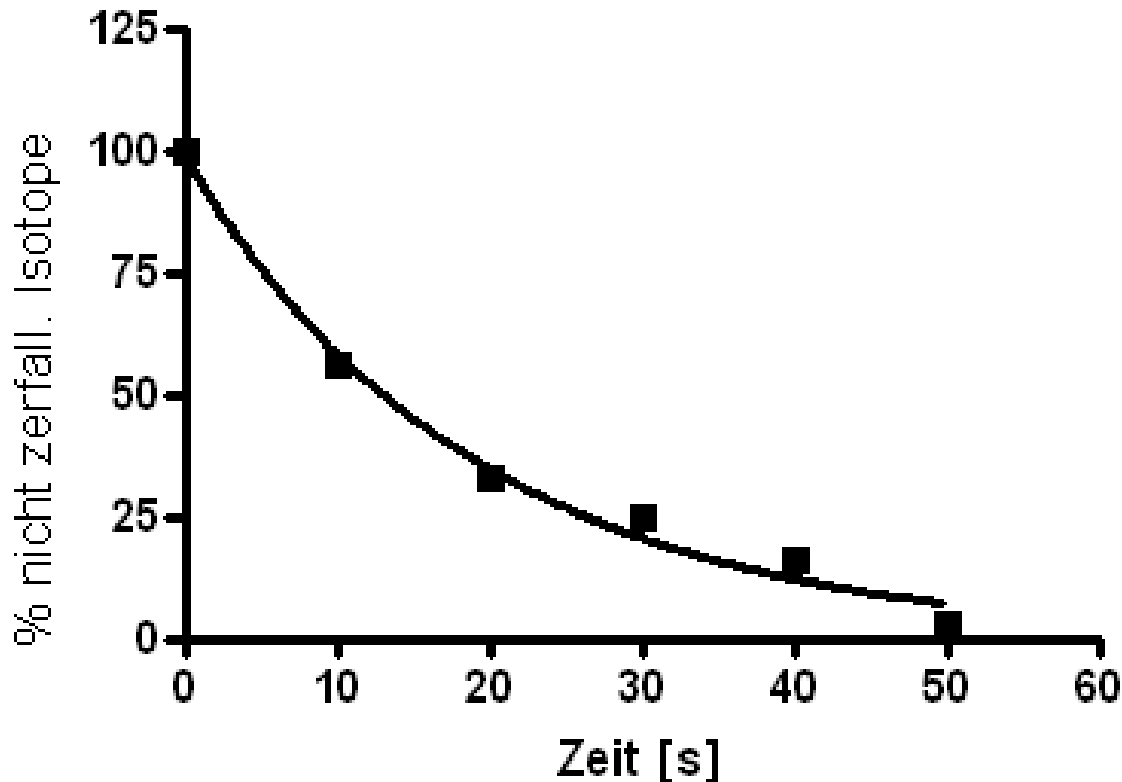


1.5 Schritt 4: Ausführung der Analyse und Interpretation der Ergebnisse

Hat man die nichtlineare Regression ausgeführt, so sind folgende Dinge zu beachten:

- Beschreibt das angepasste Modell die Daten gut?
Zur Beantwortung dieser Frage genügt gelegentlich ein Blick auf den Graphen der Funktion und die Daten. Hat man z.B. das falsche Modell gewählt, kann es vorkommen, dass der Konvergenzpunkt der Modellparameter wenig mit den Daten zu tun hat. Ähnliches kann bei falscher Wahl der Anfangsparameter geschehen. Schließlich gibt es statistische Tests, um die Güte der Anpassung zu bewerten.

Radioaktiver Zerfall



- Sind die angepassten Parameter plausibel?
Der Computer, der die Anpassung durchführt, hat keine Kenntnis der wissenschaftlichen Bedeutung der Parameter. Daher ist als erstes zu überprüfen, ob die berechneten Parameter plausibel im Sinne einer wissenschaftlichen Interpretierbarkeit sind. Kommt z.B. in der Anpassung des radioaktiven Zerfalls ein Parameter $\text{Span} < 0$ heraus, so kann dies zwar statistisch die beste Anpassung ergeben, physikalisch ergibt sich jedoch kein Sinn, da Span die Anzahl nichtzerfallener Isotope zum Zeitpunkt $t = 0$ darstellt. Liegt ein solches wissenschaftlich unsinniges Resultat vor, so ist das Regressionsergebnis zu verwerfen. Eventuell kann man durch eine zusätzliche Nebenbedingung und eine erneute Analyse zu einem sinnvollen Ergebnis gelangen.
- Wie präzise sind die Parameter?
Wie bei jedem statistischen Punktschätzer sind auch bei den berechneten Werten der nichtlinearen Regression die zugehörigen Konfidenzintervalle von größter Bedeutung. In der Regel werden neben den Schätzern für die Parameter auch ihr Standardfehler (Standardabweichung des Punktschätzers) und das 95%-Konfidenzintervall angegeben. Ist dieses verhältnismäßig klein, liegt eine relativ sichere Schätzung vor, andernfalls ist die Schätzung mit großer Vorsicht zu betrachten.

		A
		% nicht zerfall. Isotope
		Y
1	One phase exponential decay	
2	Best-fit values	
3	SPAN	98.75
4	K	0.05214
5	PLATEAU	0.0
6	HalfLife	13.29
7	Std. Error	
8	SPAN	3.718
9	K	0.003665
10	95% Confidence Intervals	
11	SPAN	88.42 to 109.1
12	K	0.04196 to 0.06231
13	HalfLife	11.12 to 16.52
14	Goodness of Fit	
15	Degrees of Freedom	4
16	R ²	0.9897
17	Absolute Sum of Squares	62.30
18	Sy.x	3.947
19	Constraints	
20	SPAN	SPAN > 0.0
21	K	K > 0.0
22	PLATEAU	PLATEAU = 0.0

Aus obiger Tabelle liest man ab, dass die Halbwertszeit $t (= \ln(2)/K)$ des angepassten Modells bei 13.29 liegt, mit einem 95%-Konfidenzintervall [11.12, 16.52]. Damit kann man vermuten, dass es sich beim dem Isotop um Beryllium-11 handelt (Halbwertszeit 13.81 Sekunden).

1.6 Schritt 5: Überprüfung der Voraussetzungen

Jede Regressionsanalyse basiert auf bestimmten Voraussetzungen. Daher ist zu überprüfen, ob diese erfüllt sind:

- X ist deterministisch, die Variation liegt vollständig in Y.
- Die Streuung in Y folgt für festes X einer bekannten (meist Normal-)Verteilung.
- Die Streuung in Y ist unabhängig von X gleich groß.
- Die Beobachtungen sind unabhängig.

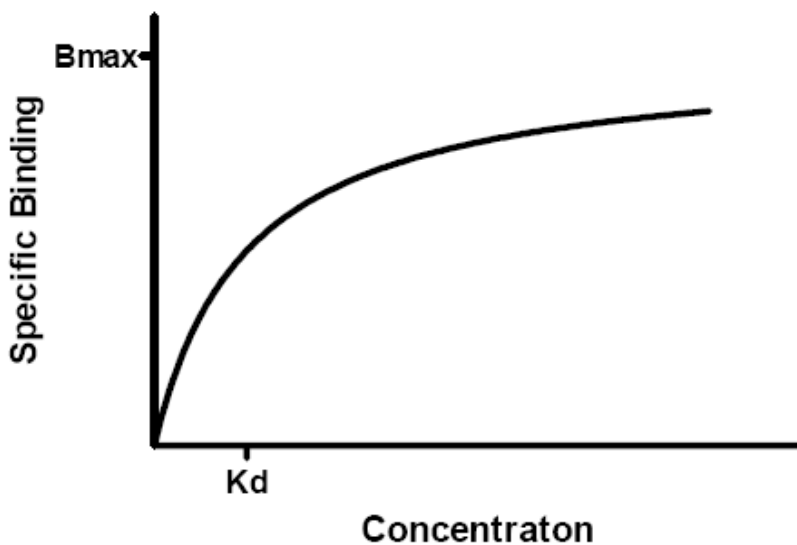
2 Klassische Funktionen – Übersicht

Funktionsbezeichnung	Formel	Anwendungen
1. Einfache Bindungsfunktion (One-Site Binding)	$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_d + X}$	<ul style="list-style-type: none"> - Spezifische Bindung (Rezeptor/Ligand) - Enzymkinetik
2. Einfache Wettbewerbsfunktion (One-Site Competition)	$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{X - \log(EC50)}}$	Bindung eines markierten Liganden gegen unmarkierte Liganden
3. Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion (Sigmoidal Dose-Response)	$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{\log(EC50) - X}}$	Abhängigkeit der Wirkung von logarithmierter Dosis, feste Steigung
4. Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung (Sigmoidal Dose-Response, variable slope)	$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(\log(EC50) - X) \cdot HillSlope}}$	Abhängigkeit der Wirkung von logarithmierter Dosis, variable Steigung
5. Boltzmann-Sigmoidfunktion (Boltzmann Sigmoidal)	$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + \exp\left(\frac{V50 - X}{Slope}\right)}$	Leitfähigkeit eines Ionenkanals in Abhängigkeit des (log.) Membranpotentials
6. Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion (One-Phase Exponential Decay)	$Y = Span \cdot \exp(-K \cdot X) + Plateau$	<ul style="list-style-type: none"> - Zerfall radioaktiver Isotope - Abbau eines Medikaments - Dissoziation eines Liganden vom Rezeptor
7. Einphasige exponentielle Assoziationsfunktion (One-phase exponential association)	$Y = Y_{\max} (1 - \exp(-K \cdot X))$	Assoziation des Liganden über der Zeit/des Substrats am Enzym
8. Exponentielle Wachstumsfunktion (Exponential Growth)	$Y = Start \cdot \exp(K \cdot X)$	Exponentielles Wachstum, z.B. Zellpopulation über Zeit
Weitere Funktionen: 9. Potenzreihen (Power Series) 10. Polynomfunktionen (Polynomial equations) 11. Sinusfunktion (Sine wave) 12. Gauß-Dichtefunktion (Gaussian distribution)	Hier nicht betrachtet.	

3 Klassische Funktionen – Details und Anwendungen

3.1 Einfache Bindungsfunktion (One-site Binding)

Formel:
$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_d + X}$$



Parameter: B_{\max} maximal gebundene Rezeptoren
 K_d (Gleichgewichts-)Dissoziationskonstante

3.1.1 Anwendung 1: spezifische Bindung

Die Funktion beschreibt die Interaktion zwischen Rezeptoren und Liganden. X beschreibt die Ligandenkonzentration, Y die spezifische Bindung der Rezeptoren. Die Funktion nähert sich für große X asymptotisch der maximal gebundenen Rezeptorenanzahl B_{\max} . Die Dissoziationskonstante K_d stellt ein reziprokes Maß für die Affinität der Bindungsstelle des Liganden zum entsprechenden Rezeptor dar.

3.1.2 Anwendung 2: Enzymkinetik

Die Enzymkinetik ist ein Teilgebiet der biophysikalischen Chemie. Sie beschreibt, wie schnell enzymkatalysierte chemische Reaktionen verlaufen. Die Enzymkinetik findet breite Anwendung in Biologie und Medizin, da auch biologische Substrate (Reaktionspartner) – darunter solche, die im Menschen auftreten – untersucht werden. Ein Hauptziel der Enzymkinetik ist die Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit mit geeigneten Formeln, sowie die

Bestimmung der dazugehörigen Parameter für ein bestimmtes Protein (Enzymaktivität und katalytische Effizienz). Da Enzyme dazu dienen, Reaktionen zu beschleunigen und zu lenken, ist die enzymkinetische Analyse zum Verständnis von Enzymfunktionen unerlässlich.

Die Sättigungsfunktion eines "Michaelis-Menten Enzyms" lässt sich unter Verwendung der Parameter K_m (Michaelis-Konstante) und V_{max} (maximale Geschwindigkeit bei Sättigung) wie folgt formulieren:

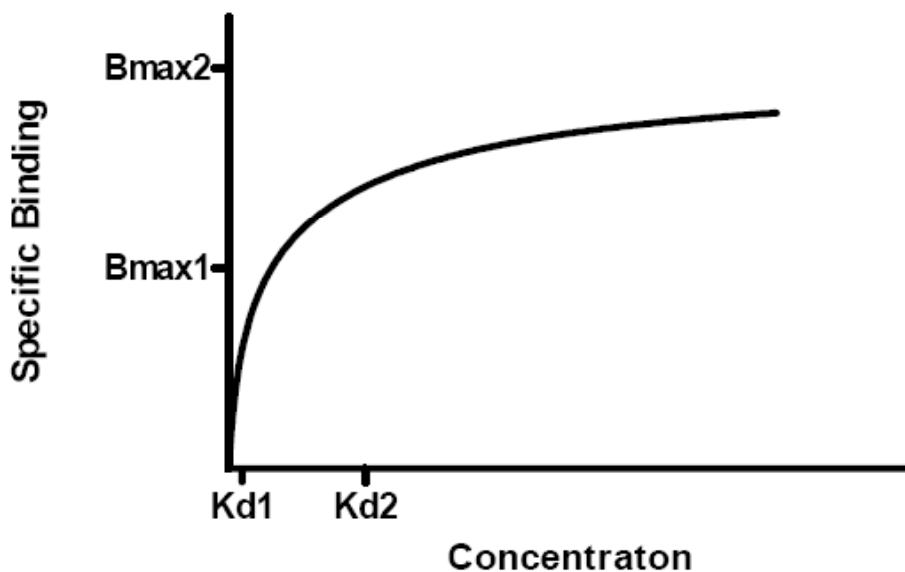
$$Y = \frac{V_{max} \cdot X}{K_m + X}$$

Dies ist die *Michaelis-Menten Beziehung*, d.h. die Gleichung einer Hyperbel mit den folgenden Eigenschaften:

- Ihre Tangenten entsprechen den Werten V_{max} (realer Ast) und $-K_m$ (imaginärer Ast);
- gleicht die Substratkonzentration [S] dem K_m -Wert, so liegt die Hälfte des ursprünglich vorhandenen Enzyms [E₀] in Form des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] vor, die andere Hälfte ist frei [E];

3.1.3 Verallgemeinerung: Zweifache Bindungsfunktion (Two-site Binding)

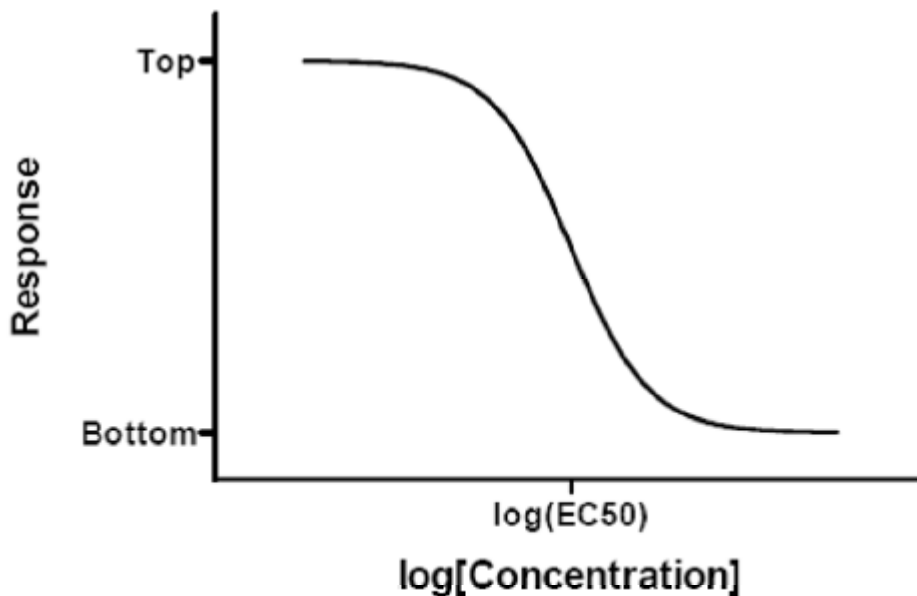
$$\text{Formel: } Y = \frac{B_{max1} \cdot X}{K_{d1} + X} + \frac{B_{max2} \cdot X}{K_{d2} + X}$$



Analoge Parameter und Anwendungen wie One-Site Binding, lediglich auf den Fall zweier Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten bzw. zweier Isozyme mit unterschiedlichen Michaelis-Konstanten erweitert.

3.2 Einfache Wettbewerbsfunktion (One-site Competition)

$$\text{Formel: } Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{X - \log EC50}}$$



Parameter:	<i>Top</i>	gesamte Bindung ohne konkurrierende Liganden
	<i>Bottom</i>	unspezifische Bindung
	$\log EC50$	Logarithmus des EC50 (Wendestelle)

3.2.1 Anwendung: Bindung konkurrierender Liganden

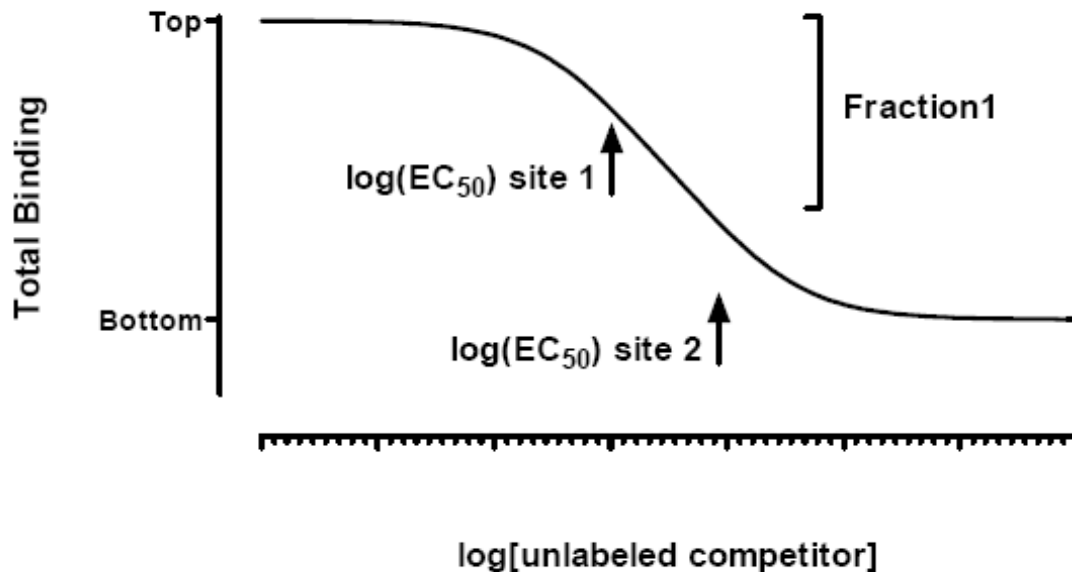
In Bindungsexperimenten mit konkurrierenden Liganden misst man die Bindung einer bestimmten Konzentration markierter Liganden bei variierender Konzentration nicht-markierter Liganden. Die Konzentration der nichtmarkierten Liganden sollte dabei über mindestens 6 Größenordnungen variieren.

Das obere Niveau, *Top*, kennzeichnet die (maximale) Bindung des markierten Liganden ohne konkurrierende Liganden. Das untere Niveau, *Bottom*, entspricht der Bindung bei sehr hoher Konzentration nichtmarkierter Liganden, also der unspezifischen Bindung des markierten Liganden. Die Konzentration nichtmarkierter Liganden, die zur mittleren Bindung zwischen *Top* und *Bottom* führt, wird mit IC50 („inhibitory concentration 50%“) oder EC50 („effective concentration 50%“) bezeichnet. Da die Konzentrationen typischer Weise um feste Faktoren (z.B. 10) verändert werden, wird die X-Achse logarithmisch skaliert, so dass äquidistante Messwerte entstehen. Der entsprechende (10er-)Logarithmus des EC50 tritt als weiterer Parameter in der Formel auf ($\log EC50$).

Die Formel ist ein Spezialfall der allgemeinen Dose-Response-Kurve mit Steigungsparameter -1 (*Hillslope*).

3.2.2 Verallgemeinerung: Zweifache Wettbewerbsfunktion (Two-Site Competition)

$$\text{Formel: } Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) \left[\frac{\text{Fraction}_1}{1 + 10^{X - \log(\text{EC}_{50}_1)}} + \frac{1 - \text{Fraction}_1}{1 + 10^{X - \log(\text{EC}_{50}_2)}} \right]$$



Parameter:	<i>Top</i>	gesamte Bindung ohne konkurrierende Liganden
	<i>Bottom</i>	unspezifische Bindung
	$\log \text{EC}_{50_{1/2}}$	Logarithmus des EC50 für Rezeptor 1/2
	<i>Fraction₁</i>	Anteil der Rezeptoren mit Affinität $\log \text{EC}_{50}_1$

Diese Formel beschreibt die Bindung eines Liganden in Konkurrenz mit anderen bei zwei verschiedenen Rezeptortypen. Der markierte Ligand hat für beide Rezeptoren die gleiche Affinität, aber der konkurrierende Ligand besitzt verschiedene Affinitäten.

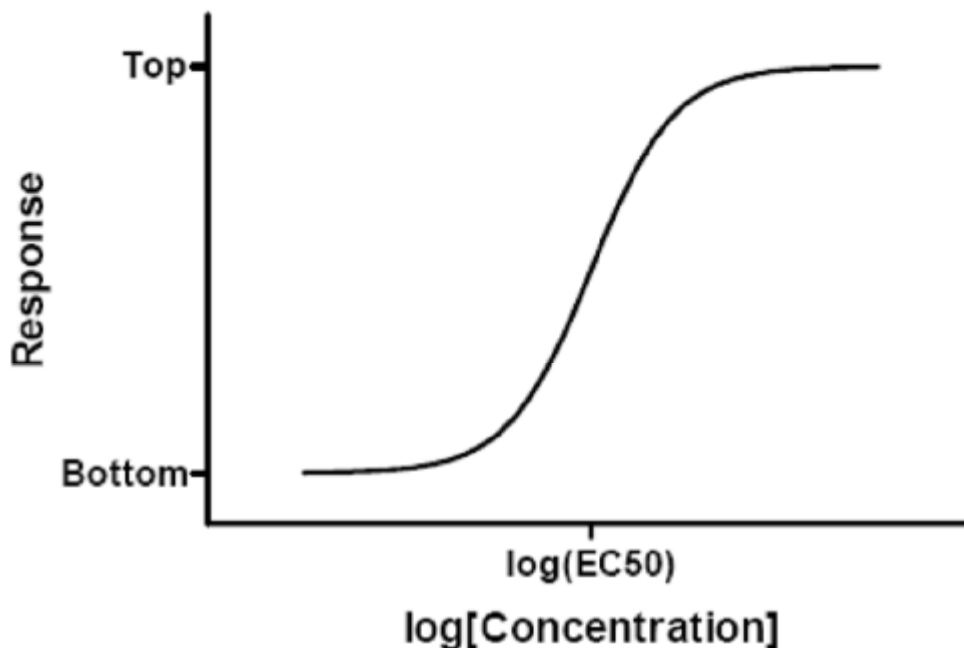
3.2.3 Wann verwendet man das allgemeinere Modell?

Oft ist es zweckmäßig, Daten aus konkurrierenden Bindungsexperimenten sowohl an das einfache als auch das verallgemeinerte Modell anzupassen. Aufgrund der zwei zusätzlichen Parameter wird in der Regel das verallgemeinerte Modell einen besseren Fit ergeben. Ob diese Verbesserung jedoch relevant ist, muss getestet werden (z.B. durch einen F-Test oder AIC). Sicher unsinnig ist das verallgemeinerte Modell in folgenden Fällen:

- die zwei EC50-Werte sind fast identisch
- der geschätzte Wert für Fraction ist nahe 0 oder 1, kleiner 0 oder größer 1.
- Die geschätzten Werte für *Bottom* und *Top* sind weit außerhalb der Spannweite.

3.3 Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion (Sigmoidal Dose-Response)

$$\text{Formel: } Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{\log(\text{EC50}) - X}}$$



Parameter:	<i>Top</i>	maximale Wirkung
	<i>Bottom</i>	Wirkung bei Dosierung 0 (bzw. <<)
	$\log EC50_{1/2}$	Logarithmus des EC50 (Wendestelle)

3.3.1 Allgemeines, Agonist, Antagonist

Dose-Response-Kurven können als Modelle für viele verschiedene Experimente genutzt werden. Typischerweise bezeichnet X die Konzentration des Medikaments oder des Hormons und Y die untersuchte biologische Antwortvariable, z.B. die Enzymaktivität, das Membranpotential oder die Kontraktion eines Muskels. Der Begriff „Dose“ (Dosis) wird dabei relativ breit interpretiert, nicht nur im engen Sinne eines Medikaments, das einem Menschen oder Tier in verschiedenen Konzentrationen verabreicht wird. Genauso wird er für In-vitro-Experimente, gelegentlich sogar für X-Variablen wie Temperatur oder Spannung verwendet.

Ein *Agonist* ist eine Substanz, die an einen Rezeptor bindet und eine Reaktion verursacht. Ist diese Reaktion eine Stimulation in Abhängigkeit der Dosierung, so verläuft die Dose-Response-Kurve von einem niedrigen Niveau bei kleinen Konzentrationen bergauf zu einem hohen Niveau bei höheren Konzentrationen. Verursacht der Agonist eine hemmende (inhibitory) Reaktion, so verläuft die Dose-Response-Kurve umgekehrt von einem hohen Niveau auf ein niedriges Niveau für hohe Konzentrationen.

Ein *Antagonist* verursacht selbst keine Reaktion, sondern blockiert eine Agonist-gesteuerte Reaktion. Variiert man daher die Konzentration eines Antagonisten (bei konstanter Konzentration eines zugehörigen Agonisten), so wird die Dose-Response-Kurve genau den umgekehrten Verlauf der zugehörigen Kurve des Agonisten beschreiben.

Die obige Funktion beschreibt allgemein einen Zusammenhang zwischen einer Konzentration einer Substanz oder Enzyms und der zugehörigen Antwort, z.B. einer Wirkung. Sie wird auch als logistische Funktion mit 3 Parametern bezeichnet. Diese verläuft S-förmig von einem niedrigen Niveau (*Bottom*) auf ein hohes Niveau maximaler Wirkung (*Top*).

3.3.2 Warum eine logarithmische X-Skala?

Üblich ist eine logarithmische X-Skala, da die Agonisten-Konzentration typischer Weise mehrere Größenordnungen umfasst. Daher ist die graphische Darstellung mit Hilfe einer logarithmischen Skala erheblich einfacher. Die Konzentration wird oft um einen konstanten Faktor erhöht. Dies führt auf der logarithmischen Skala zu äquidistanten Punkten. Schließlich ist der Fehler des EC50-Schätzer auf einer linearen Skala nicht normalverteilt, eine Voraussetzung für viele Analysen. Skaliert man X nicht logarithmisch sondern linear, so entsteht als Antwort-Kurve gerade eine einfache Bindungsfunktion (One-Site-Binding) wie unter 3.1.

3.3.3 EC50, ED50, IC50

Bei S-förmigen Kurven gibt es genau einen X-Wert, bei dem das mittlere Niveau zwischen *Bottom* und *Top* erreicht wird. Dieser Punkt wird als EC50 („effective concentration 50%“) bzw. als ED50 („effective dose 50%“) oder bei fallendem Verlauf als IC50 („inhibitory concentration 50%“) bezeichnet. In den Formeln wird das Symbol $\log EC50$ verwendet, um daran zu erinnern, dass die X-Achse logarithmisch skaliert wird.

Nach Definition hängt der EC50 vom *Bottom* und *Top*-Niveau ab. Er ist einer von 4 Parametern, welche die Lage der Dose-Response-Kurve festlegen. Daher wird der EC50 oft als Maß für die Stärke (potency) eines Agonisten verwendet. Man beachte jedoch, dass der EC50 nicht direkt in Verbindung steht mit der Dissoziationskonstante K_d , also kein direktes Maß für die Affinität des Liganden-Rezeptor-Paares ist.

Ein alternatives Maß für die Stärke des Agonisten ist der pEC50, der negative 10-Logarithmus des EC50.

$$pEC50 := -\log(EC50)$$

Oft ist der pEC50 bequemer handhabbar, da der EC50 in Nano- oder Mikromol gemessen wird. Ist z.B. $EC50 = 167 \text{ nM}$, so ist $pEC50 = 6.78$

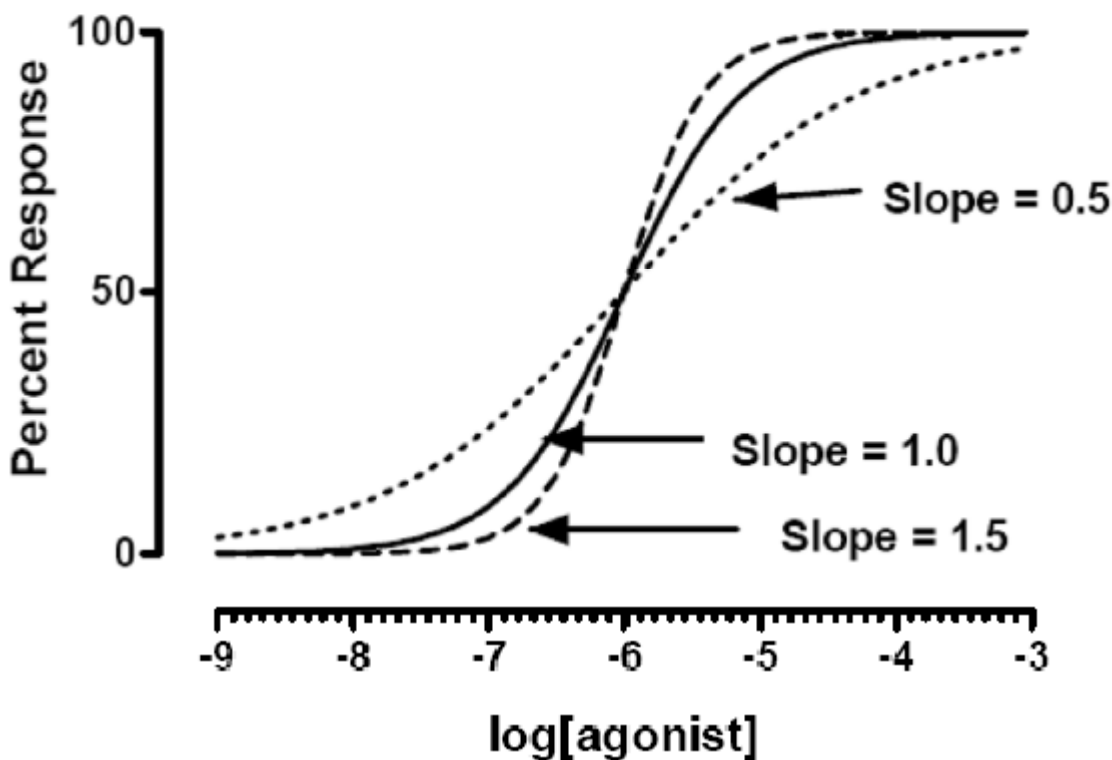
3.3.4 Steigung – konstant oder variabel?

Bei dieser Dose-Response-Kurve ist das Steigungsverhalten festgelegt. Charakteristisch ist, dass für den Anstieg von 10% über *Bottom* auf 90% nicht ganz zwei logarithmische Einheiten auf der X-

Achse (genauer: Faktor 81) benötigt werden. Ist diese Voraussetzung nicht gegeben, so muss ein zusätzlicher Parameter in das Modell eingebracht werden, wie im nächsten Fall.

3.4 Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung (Sigmoidal Dose-Response, variable slope)

$$\text{Formel: } Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log(\text{EC}_{50}) - X) \text{Hillslope}}}$$

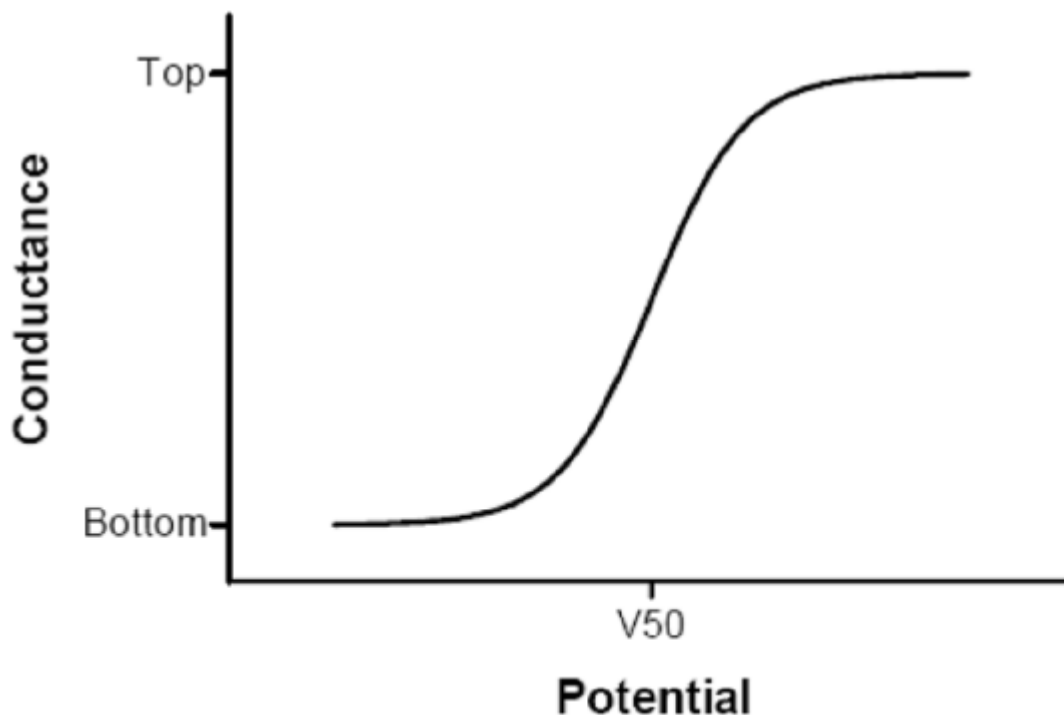


Parameter:	<i>Top</i>	maximale Wirkung
	<i>Bottom</i>	Wirkung bei Dosierung 0 (bzw. <<)
	$\log \text{EC}_{50_{1/2}}$	Logarithmus des EC50 (Wendestelle)
	<i>Hillslope</i>	Steigungsparameter

Diese Funktion ist eine natürliche Verallgemeinerung der Dose-Response-Kurve für den Fall, dass das Steigungsverhalten mit angepasst werden muss. Sie wird auch als logistische Funktion mit 4 Parametern bzw. Hill-Funktion bezeichnet. Neu ist der Steigungsparameter *Hillslope*, der die Steilheit der Kurve steuert. Ist er gleich 1, erhält man den obigen Spezialfall zurück. Für Werte größer als 1 ist die Kurve steiler für Werte < 1 flacher. Ist der Steigungsparameter negativ, erhält man einen gespiegelten, abfallenden Verlauf, z.B. für die Wirkung eines Antagonisten oder für ein konkurrierendes Bindungsexperiment (vgl. 3.2).

3.5 Boltzmann-Sigmoidfunktion (Boltzmann Sigmoidal)

$$\text{Formel: } Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + \exp\left(\frac{V50 - X}{\text{Slope}}\right)}$$



Parameter:	<i>Top</i>	maximale Wirkung
	<i>Bottom</i>	minimale Leitfähigkeit
	<i>V50</i>	Wendestelle
	<i>Slope</i>	Steigungsparameter

Die Boltzmann-Sigmoidfunktion ist eine Variante einer S-förmigen Funktion mit 4 Parametern. Sie wird z.B. für die Beschreibung der Leitfähigkeit eines Ionenkanals in Abhängigkeit des Membranpotentials verwendet. Wie stets bezeichnet *Bottom* bzw. *Top* das minimale bzw. maximale Niveau der Leitfähigkeit. Der Parameter *V50* ist der Wendepunkt, bei dem 50% Leitfähigkeit zwischen *Bottom* und *Top* erreicht sind. Der Parameter *Slope* steuert die Steigung, wobei größere Werte eine flachere Kurve erzeugen.

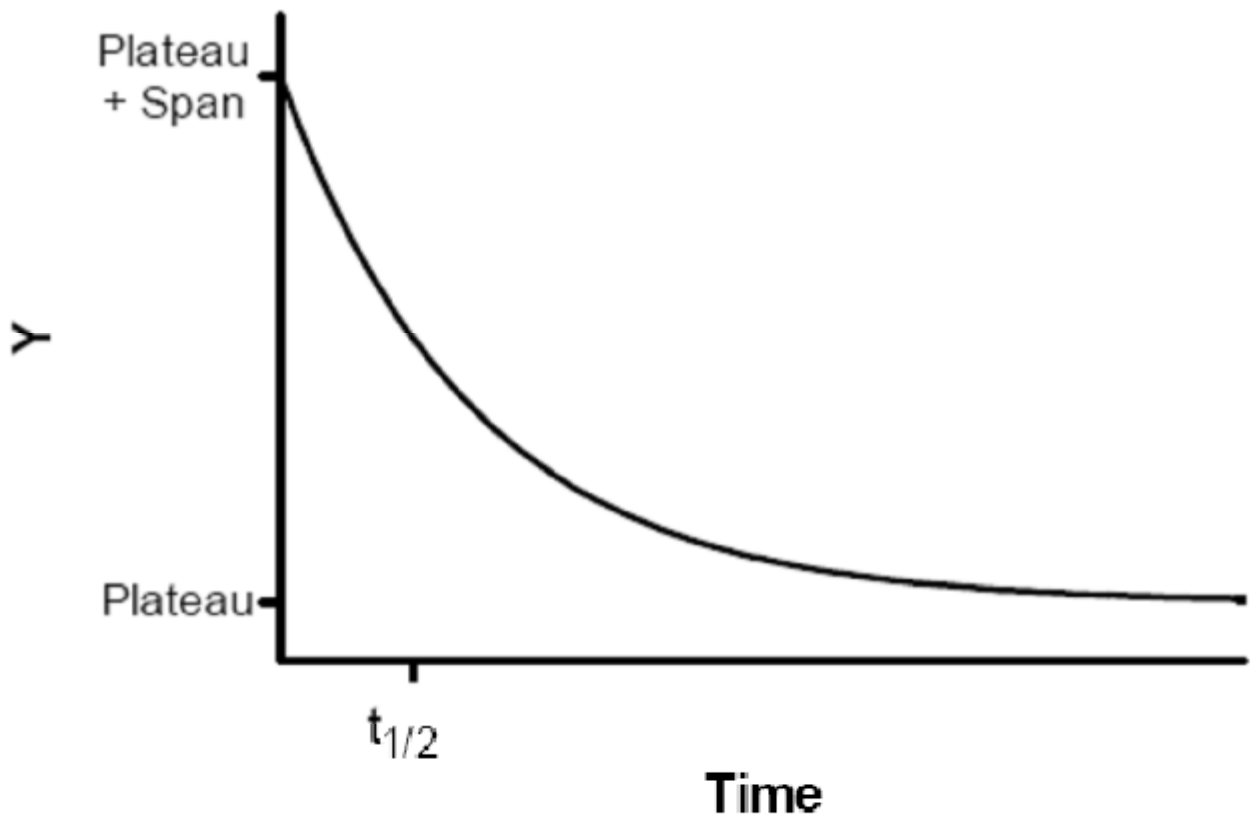
3.5.1 Wann logistische Funktion, wann Boltzmann-Sigmoidfunktion?

Diese beiden Funktionen sind vollständig äquivalent, die jeweils 4 Parameter lassen sich bijektiv ineinander umrechnen. Der Unterschied besteht also lediglich in der Art der Darstellung der Ergebnisse, die dem jeweiligen Anwendungsfeld angepasst sind. Die logistischen Funktionen werden im Zusammenhang mit Dosis-Antwort-Kurven oder Liganden-Bindungsexperimenten

verwendet, während die Boltzmann-Sigmoidfunktion von Elektrophysiologen für Fragen der Leitfähigkeit genutzt wird.

3.6 Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion (One-Phase Exponential Decay)

Formel: $Y = Span \cdot \exp(-K \cdot X) + Plateau$

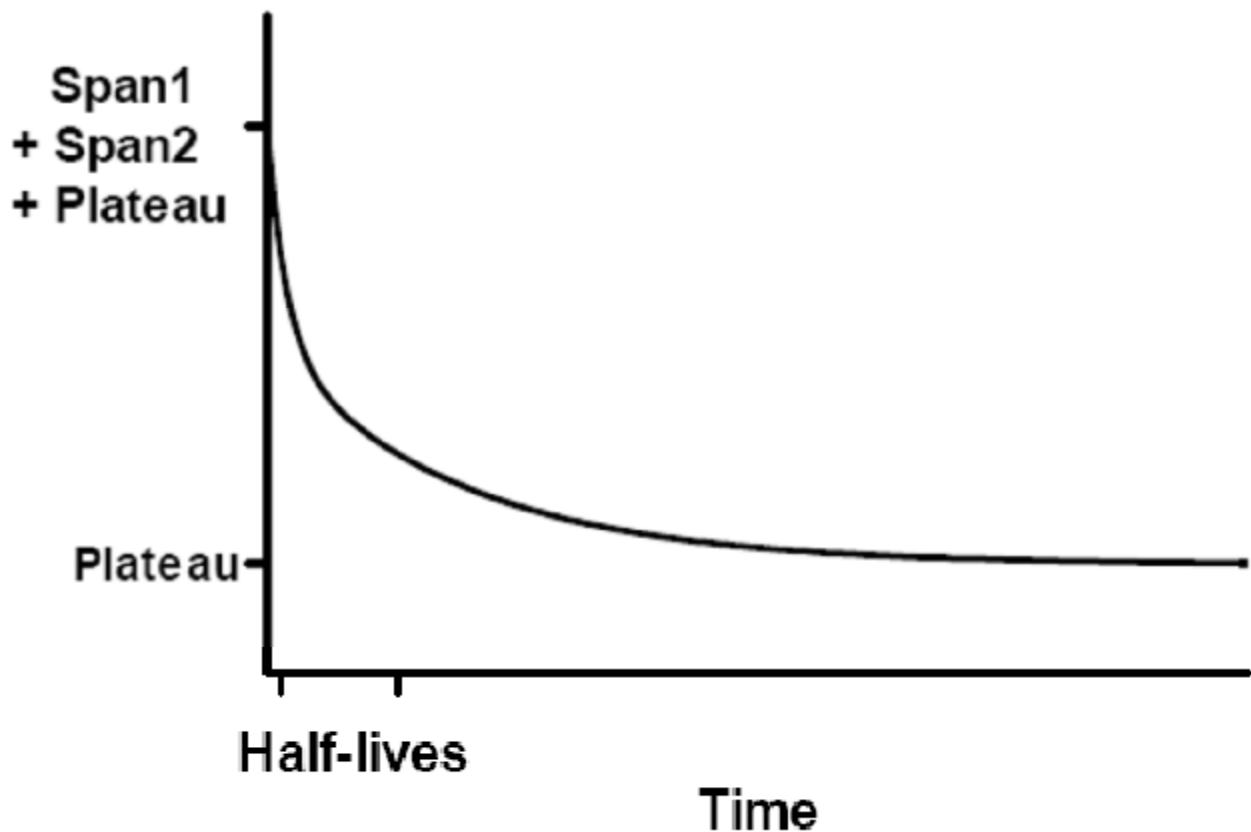


Parameter:	<i>Plateau</i>	untere Schranke des Zerfalls
	<i>Span</i>	$Span + Plateau$ ist Ausgangswert zur Zeit $t = 0$.
	<i>K</i>	Rate des Zerfalls (in 1/Zeit)

Diese Funktion kann sehr unterschiedliche Größen beschreiben, die exponentiell abfallen. Auf der X-Achse wird die Zeit abgetragen, der Zerfall beginnt zum Zeitpunkt $t = 0$ auf dem Niveau $Span + Plateau$ und fällt mit der konstanten Rate K asymptotisch auf das Niveau $Plateau$ (oft 0). Beispiele für exponentielles Verhalten sind der Zerfall radioaktiver Isotope, der Abbau eines Medikaments im Körper oder die Dissoziation eines Liganden von einem Rezeptor.

3.6.1 Verallgemeinerung: Zweiphasige exponentielle Zerfallsfunktion (Two-Phase exponential decay)

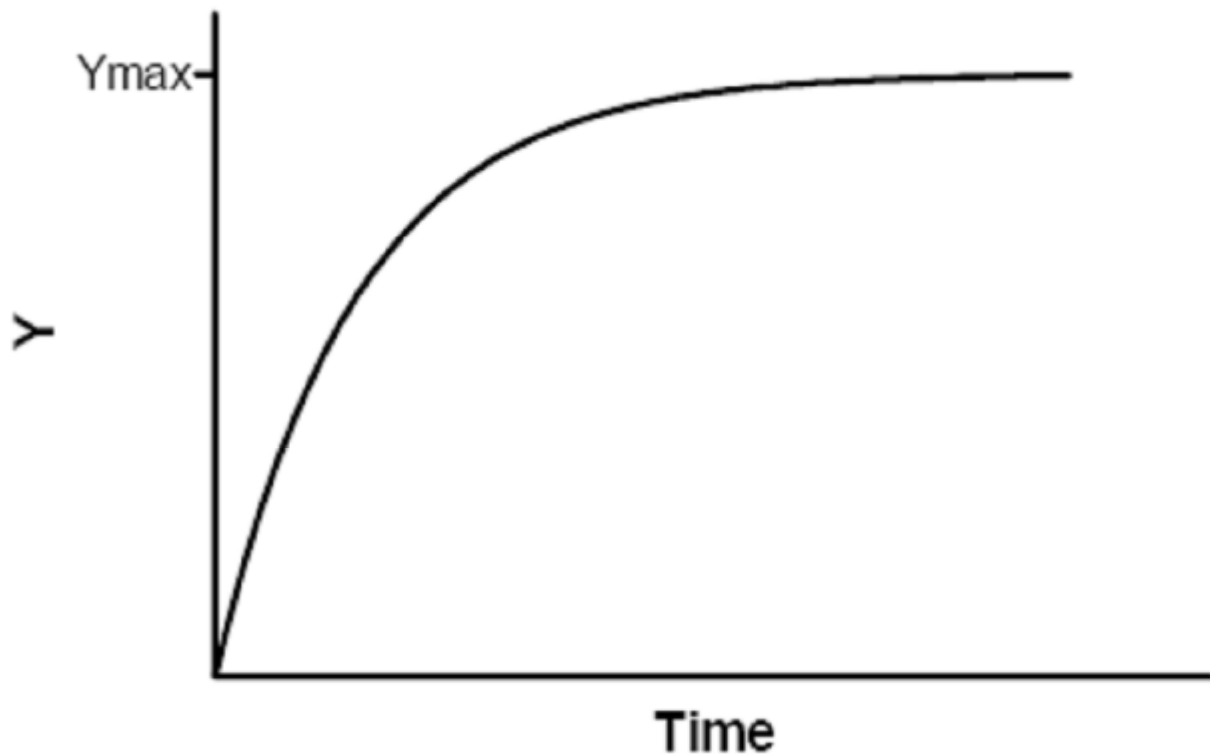
$$\text{Formel: } Y = \text{Span}_1 \cdot \exp(-K_1 \cdot X) + \text{Span}_2 \cdot \exp(-K_2 \cdot X) + \text{Plateau}$$



Dies ist eine natürliche Verallgemeinerung für den Fall zweier Zerfallsprozesse mit unterschiedlichen Raten.

3.7 Einphasige exponentielle Assoziationsfunktion (One-phase exponential association)

Formel: $Y = Y_{\max} (1 - \exp(-K \cdot X))$



Parameter: Y_{\max} spezifische Bindung im Gleichgewicht für feste Konzentration
 K (beobachtete) Rate

Diese Funktion beschreibt das Assoziationsverhalten bei fixierter Ligandenkonzentration. Zu Beginn des Experiments besteht keine Bindung, im Laufe der Zeit wächst diese bis zu ihrem Maximalwert Y_{\max} im Gleichgewicht. Dies geschieht exponentiell mit der Rate K . K ist nicht gleich der Assoziationsrate K_{on} , diese hängt von K und der Dissoziationsrate K_{off} folgendermaßen ab ([Ligand] ist die Ligandenkonzentration in Mol)

$$K_{on} = \frac{K - K_{off}}{[Ligand]}$$

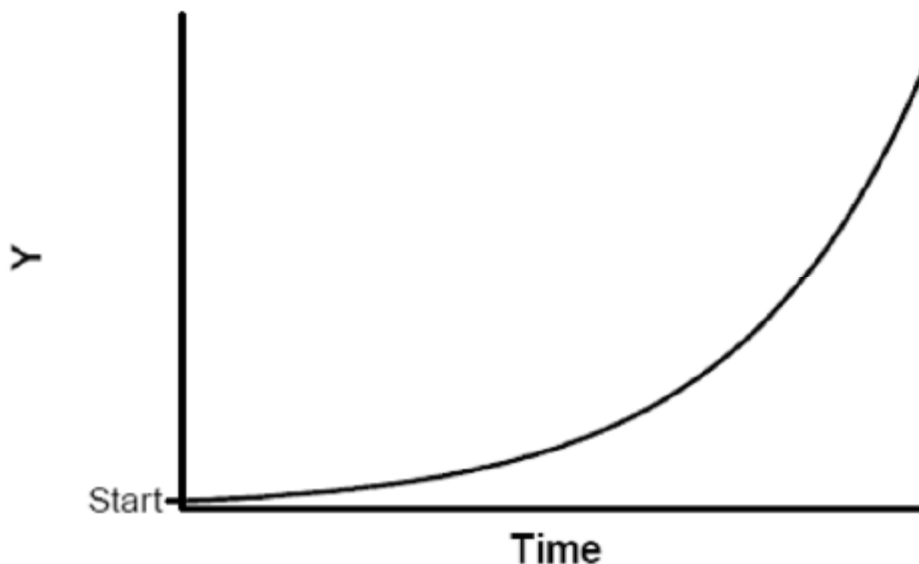
3.7.1 Verallgemeinerung: Zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion (Two-phase exponential association)

$$\text{Formel: } Y = Y_{\max 1} (1 - \exp(-K_1 \cdot X)) + Y_{\max 2} (1 - \exp(-K_2 \cdot X))$$

Diese Formel stellt eine natürliche Verallgemeinerung der Assoziation für den Fall zweier unabhängiger Rezeptoren da.

3.8 Exponentielle Wachstumsfunktion (Exponential Growth)

$$\text{Formel: } Y = \text{Start} \cdot \exp(K \cdot X)$$



Parameter: *Start* Populationsgröße zur Zeit $t = 0$.
 K (Wachstums-) Rate

Diese Funktion beschreibt exponentielles Wachstum, zum Beispiel die Populationsgröße einer Zellkultur in Abhängigkeit der Zeit. Die Population hat zu Beginn die Größe *Start* und wächst exponentiell mit der Rate *K*.

Die Anpassung eines exponentiellen Wachstums mittels nichtlinearer Regression ist nicht unproblematisch, da kleine Veränderungen der Anfangswerte große Veränderungen der Residuenquadrate zur Folge haben können. Insbesondere dann, wenn die Residuen mit der Zeit wachsen („Trompetenform“ des Residuenplots), sollte man eine Log-Transformation der Y-Daten durchführen und diese anschließend mittels linearer Regression behandeln. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dann der exponentiellen Wachstumsrate in den untransformierten Daten.

4 Äquivalente Funktionen in JMP

4.1 Einfache Bindungsfunktion

JMP: „Michaelis-Menten-Model (2P)“: $Y = \frac{q_1 \cdot X}{q_2 + X}$

4.2 Einfache Wettbewerbsfunktion

JMP: Spezialfall von „Logistic 4p“, siehe unter 3.4

4.3 Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion

JMP: Spezialfall von „Logistic 4p“, siehe unter 3.4 (Achtung „Logistic 3p“ in JMP beschreibt andere Parameter:

$$Y = \frac{q_1}{(1 + q_2 \exp(q_3 X))}$$

4.4 Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung

JMP: „Logistic 4p“, $Y = \frac{q_2 - q_1}{(1 + \exp(q_3(X - q_4)))}$

4.5 Boltzmann Sigmoidfunktion

JMP: Spezialfall von „Logistic 4p“, siehe unter 3.4

4.6 Einphasige exponentielle Zerfallsfunktion

JMP: „First order decay kinetics“: $Y = q_1 \exp(-q_2 X) + q_3$

4.7 Einphasige exponentielle Assoziationsfunktion

JMP: „mechanistic growth model“: $Y = q_1 (1 - q_2 \exp(-q_3 X))$ (ein Parameter mehr)

4.8 Exponentielle Wachstumsfunktion

JMP: „Model F“: $Y = q_1 + q_2 \exp(q_3 X)$ (ein Parameter mehr)