



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 03 428 T2 2005.06.02

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 348 124 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 03 428.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US01/49928

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 994 392.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 02/061423

(86) PCT-Anmeldetag: 21.12.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 08.08.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.10.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 19.05.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.06.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: G01N 33/50  
G06F 19/00

(30) Unionspriorität:

258147 P 22.12.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

Cellomics, Inc., Pittsburgh, Pa., US

(72) Erfinder:

SAMMAK, Paul, Pittsburgh, US; ROSANIA, Gustavo, Ann Arbor, US; RUBIN, Richard, Pittsburgh, US; NEDERLOF, Michel, Pittsburgh, US; LAPETS, P., Oleg, Allison Park, US; SHOPOFF, O., Randall, Pittsburgh, US; KANNAN, Murugan, Allison Park, US

(74) Vertreter:

Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman Vossius, Dr. Martin Grund, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München

(54) Bezeichnung: IDENTIFIZIERUNG VON ZELLEN WÄHREND KINETISCHER VERSUCHSREIHEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die Anmeldung betrifft zellbasiertes, kinetisches Screening.

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Kinetische Assays werden durchgeführt, indem Messungen bei einer Reihe von Zeitpunkten durchgeführt werden, um die Veränderung einer Probe zu messen. Die Messungen zu einem beliebigen Zeitpunkt könnten auch für einen nicht-kinetischen Assay verwendet werden, welcher hier als ein Assay mit festem Endpunkt bezeichnet wird. Assays mit festen Endpunkten sind für Proben ausreichend, die wenig oder keine Veränderung über die Dauer des Assays erfahren. Wenn sich die Probe über die Zeit verändert, werden kinetische Messungen notwendig, um diese Veränderungen zu messen. Mathematische Beschreibungen der Trends der verschiedenen Zellparameter über die Zeit stellen kinetische Merkmale dar, die sich von den Messungen, wie sie in Assays mit festem Endpunkt berechnet werden, unterscheiden.

**[0003]** Die kinetischen Assays werden auf derselben Probe über die Zeit durchgeführt und unterscheiden sich von den üblichen Experimenten, welche eine Annäherung der kinetischen Merkmale bei Assays mit festem Endpunkt auf unterschiedliche Teile einer Probe durchführen. Wenn z.B. die Probe eine Zellpopulation ist, die eine Anzahl von ähnlichen individuellen Zellen umfasst, können Veränderungen bei der Population über die Zeit gemessen werden, indem Teile der Probe mit einer Reihe von Assays mit festem Endpunkt untersucht werden. Diese Verfahrensweise wird üblicherweise in biochemischen oder immunhistochemischen Assays verwendet, bei denen die Proben während des Assays unbrauchbar (d.h. fixiert) oder zerstört werden. Eine Reihe von Assays mit festem Endpunkt führen Messungen auf individuellen Zellen durch, aber die bestimmten individuellen Zellen in jeder Population unterscheiden sich bei jedem Assay mit festem Endpunkt und können nicht auf der Zellebene miteinander in Relation gesetzt werden. Eine Reihe von Assays mit festem Endpunkt liefern nur dann kinetische Informationen, wenn vorausgesetzt wird, dass die durchschnittlichen Messungen der Population von einem Teil zu einem anderen Teil der Probe in Relation gesetzt werden und die individuellen Zellen in der Population als Äquivalent vorausgesetzt werden.

**[0004]** Die Verfahrensweise mit einem festen Endpunkt reicht nicht aus, wenn die Zellen in der Probe nicht äquivalent sind oder wenn die Veränderungen über die Zeit auf einer Zell-zu-Zell-Basis in Relation gesetzt werden müssen. Messungen von physiologisch relevanten Zellen sind heterogen, was die übliche Variabilität des Zellverhaltens in einem lebenden Tier widerspiegelt. Die Heterogenität umfasst oft wichtige Informationen über die Physiologie von Zellen in deren Lebendzustand und biologisch relevante Messungen müssen die Variabilität der Probe einschließen und dürfen diese nicht ausschließen. Lebende Zellen, die sich unabhängig voneinander verändern, müssen zu mehreren Zeiten gemessen werden und die Messungen müssen über die Zeit auf einer Zell-zu-Zell-Basis korreliert werden.

**[0005]** Ein richtiger kinetischer Assay behandelt Probleme, indem Messungen von einzelnen Zellen über die Zeit korreliert werden. Im Allgemeinen werden die Zellen anhand ihrer Position und durch andere Kennzeichen identifiziert, um eine Kontinuität der biologischen Messung auf Zellebene zu jeder Zeit sicherzustellen. Ein typisches Problem, das überwunden werden muss, ist die Unsicherheit bezüglich der Position der Zellen, die auf die Bewegung der Zellen oder des Messinstruments zurückzuführen ist. Die Fähigkeit, Zellen über die Zeit zu identifizieren, ermöglicht es dem Benutzer die Variabilität der Probe und das Verhalten der Subpopulation zu messen und zu bewerten. Die Antwort einer ganzen Population einer Probe ist oft auf die Aktivität von lediglich einer Subpopulation von Zellen zurückzuführen. Eine genaue kinetische Messung der Subpopulationen beinhaltet einen größeren Informationsgehalt bezüglich der physiologischen oder pharmakologischen Antwort einer biologischen Probe. Zellbasierte kinetische Messungen ermöglichen auch mehrere Messungen derselben Probe (multiparametrische Assays), welche auf der Zellebene korreliert werden, zusammenhängende Messungen von unterschiedlichen zellulären Funktionen und Mechanismen und liefern daher ein besseres mechanistisches Verständnis von Zellen und Arzneimitteln, welche diese beeinflussen.

**[0006]** Deshalb werden Verfahren zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen Zell-Screening-Assays auf dem Gebiet benötigt.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0007]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Software zum Verfolgen individueller Zellen während

eines kinetischen Zell-Screening-Assays, umfassend:

- a) Bereitstellen von Zellen, die mindestens ein erstes, mit Lumineszenz markiertes Reportermolekül besitzen, das von einer Zellstruktur berichtet;
- b) Erhalten eines Strukturabbilds von lumineszierenden Signalen von dem mindestens ersten, mit Lumineszenz markierten Reportermolekül in den Zellen in einem Bildfeld;
- c) Erstellen einer Strukturmaske für individuelle Zellen in dem Bildfeld;
- d) Definieren eines Referenzpunkts von jeder Strukturmaske;
- e) Festsetzen einer Zellidentifikation zu dem jedem Referenzpunkt in dem Bildfeld;
- f) Wiederholen der Schritte b) bis e) bei einem zweiten Zeitpunkt;
- g) Korrelieren der Zellidentifikation zwischen dem ersten Zeitpunkt und dem zweiten Zeitpunkt durch Berechnen eines Abstands zwischen den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt und
- h) Definieren einer Übereinstimmung der Zellidentifikation durch Identifizieren von Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt, die am nächsten zusammen sind.

**[0008]** In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Schritte f) bis h) mit einer gewünschten Anzahl von Zeitpunkten wiederholt, wobei das Bestimmen des Abstands zwischen den Referenzpunkten durch Bestimmen eines Abstands zwischen den Referenzpunkten in aufeinander folgenden Zeitpunkten durchgeführt wird und wobei das Definieren der nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation durch Definieren der nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation in aufeinander folgenden Zeitpunkten durchgeführt wird.

**[0009]** Weitere bevorzugte Ausführungsformen umfassen das Festlegen einer Qualitätskennzahl zu der Übereinstimmung der Zellidentifikation, basierend auf einem Abstand, der für eine zweite nächste Übereinstimmung der Zellidentifikation bestimmt wurde, und wobei eine Übereinstimmung der Zellidentifikation abgewiesen wird, wenn die Qualitätskennzahl unterhalb einer Benutzer-definierten Schwelle für eine Qualitätskennzahl ist.

**[0010]** Eine weitere bevorzugte Ausführungsform umfasst das Vergleichen weiterer Merkmale der individuellen Zellen zwischen aufeinander folgenden Zeitpunkten, um eine Zellidentifikation zu ermöglichen.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0011]** [Fig. 1](#) zeigt ein Flussdiagramm, das eine Ausführungsform des Verfahrens zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen Zell-Screening-Assays zeigt.

#### Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0012]** In kinetischen Assays können sich die Zellen umherbewegen, in das Feld eintreten oder es verlassen, wachsen, schrumpfen oder sich teilen; einzelne Zellen können sich ineinander bewegen oder den Kontakt untereinander lösen. Bei der Bestimmung von Merkmalen von individuellen Zellen über die Zeit ist es bevorzugt, eine korrekte Identifikation von individuellen Zellen von Zeitpunkt zu Zeitpunkt zu optimieren. Damit wird nach dem Sammeln der Daten für einen gegenwärtigen Zeitpunkt eine zweite Zellidentifikation gegen eine Zellidentifikation, die für den ersten Zeitpunkt in dem kinetischen Scan für die Vertiefung erhalten wurde, abgeglichen. Dies stellt sicher, dass die kinetischen Daten mit der richtigen Zelle für alle Zeitpunkte des kinetischen Scans korreliert werden. Nach dem Erhalten der Daten bezüglich der Zelle, des Felds, der Vertiefung und der Plattenebene für den aktuellen Zeitpunkt werden die kinetischen Daten mit beliebigen früheren kinetischen Daten integriert, um die kinetischen Merkmale für die individuellen Zellen zu bilden, aus denen die dazugehörigen Feld-basierten, Vertiefungs-basierten und/oder Platten-basierten kinetischen Merkmale für einen beliebigen erwünschten Zell-Screening-Assay abgeleitet werden können.

**[0013]** Verfahren zum Abstimmen einer Zellidentifikation über verschiedene Zeitpunkte sind hilfreich, um sicherzustellen, dass jede vorhandene Zelle dieselbe Identifikation von Bild zu Bild in der Bilderserie aufweist.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Software zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen Zell-Screening-Assays, umfassend:

- a) Bereitstellen von Zellen, die mindestens ein erstes, mit Lumineszenz markiertes Reportermolekül besitzen, das von einer Zellstruktur berichtet;
- b) Erhalten eines Strukturabbilds von lumineszierenden Signalen von dem mindestens ersten, mit Lumineszenz markierten Reportermolekül in den Zellen in einem Bildfeld;

- c) Erstellen einer Strukturmaske für individuelle Zellen in dem Bildfeld;
- d) Definieren eines Referenzpunkts von jeder Strukturmaske;
- e) Festsetzen einer Zellidentifikation zu jedem Referenzpunkt in dem Bildfeld;
- f) Wiederholen der Schritte b) bis e) bei einem zweiten Zeitpunkt;
- g) Korrelieren der Zellidentifikation zwischen dem ersten Zeitpunkt und dem zweiten Zeitpunkt durch Berechnen eines Abstands zwischen den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt und
- h) Definieren einer Übereinstimmung der Zellidentifikation durch Identifizieren von Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt, die am nächsten zusammen sind.

**[0015]** Wie hier verwendet, bezeichnet der Ausdruck „Abbild“ eine digitale Darstellung der optisch detektierbaren Signale von dem mindestens ersten, optisch detektierbaren Reportermolekül und benötigt keine spezifische Anordnung oder Anzeige der digitalen Darstellung. Abbilder sind paketweise Informationen, die sich von der Probe ableiten und die auf verschiedene Arten entsprechend dem Bedarf des Beobachters organisiert sind. In bevorzugten Ausführungsformen werden gut bekannte Formate von solchen „Abbildern“ eingesetzt, einschließlich, aber nicht beschränkt auf DIB, TIFF, BMP, Bildelement-(Pixel)-Maps, dreidimensionale Raum-anordnungen, zweidimensionale Oberflächen- oder Querschnittsanordnungen, eindimensionale Abbildungen eines Linien-Scans, Zeitspuren eines Oszilloskops, rechtwinklige Anordnungen von ganzen Zahlen, Angaben über die Pixelintensität, hexagonale Gitter von ganzen Zahlen, Gleitpunkt-Pixel und planare, kompakte oder Bayer-Muster-Anordnungen von multispektralen Pixel-Anordnungen. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform werden Bildelement-(Pixel)-Feldabbildungen verwendet, z. B. solche, die durch optische Kameras erzeugt werden, wo eine räumliche Lokalisierung in einer Ebene (X, Y) innerhalb der Probe durch eine räumliche Lokalisierung innerhalb des Feldes (x, y) dargestellt wird und die lumineszierende Probenintensität (I) wird durch die Signal-Amplitude oder -Wert (i) bei jedem Pixel dargestellt.

**[0016]** Das Bildfeld (FOV) stellt die abgebildete Fläche dar. Sie ist äquivalent zur Bildgröße. Die Abmessung des Bildfelds kann entweder in Mikrometer auf der Skala der Probenfläche oder in Pixel der Bildgröße ausgedrückt werden. Die Fläche der Zellprobe ist im Allgemeinen größer als das Bildfeld und entspricht in etwa dem eines Mediums oder eines hochauflösenden Abbilds einer Platte mit 96 oder 384 Vertiefungen.

**[0017]** Wie hier verwendet, bezeichnet ein „optisch detektierbares Reportermolekül“ ein Reportermolekül, das Licht emittieren, reflektieren oder absorbieren kann und umfasst, ist aber nicht beschränkt auf fluoreszierende, lumineszierende und chemilumineszierende Reportermoleküle. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein fluoreszierendes Reportermolekül verwendet.

**[0018]** Die Zellstruktur, über die durch das optisch detektierbare Reportermolekül berichtet wird, kann eine beliebige detektierbare Zellstruktur sein, einschließlich Zellkerne, intrazelluläre Organellen, zytosolische Marker und Plasmamembran-Marker. Im einfachsten Fall liegt die Zellstruktur als eine einzelne Einheit in der Zelle vor, wie z.B. der Zellkern.

**[0019]** Wie hier verwendet, „berichtet“ das Reportermolekül über die Zellstruktur durch Prozesse, welche entweder die direkte oder indirekte Bindung an die Zellstruktur einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind, und indem es in die Zellstruktur eingeschlossen oder darin enthalten ist.

**[0020]** Wie hier verwendet, bezeichnet der „Referenzpunkt“ einen einzelnen Punkt, der relativ zu der Zellstruktur definiert ist, einschließlich, aber nicht beschränkt auf ein Zentrum der Zellstruktur, ein Zentrum der Masse der Zellstruktur, der Schwerpunkt (definiert als ein geometrisches Zentrum) der Zellstruktur oder durch Zeichnen eines Rahmens um die Zellstruktur, wobei der Punkt z. B. definiert sein kann als Durchschnitt von beliebigen zwei Diagonalen innerhalb des Rahmens. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Schwerpunkt der Zellstruktur verwendet.

**[0021]** Die Bilder werden von dem mindestens ersten optisch detektierbaren Reportermolekül gesammelt und die Bilder können gegebenenfalls vorbearbeitet sein (Kontrast-korrigiert und geglättet). Für die Bilder wird dann eine Schwelle gesetzt (bevorzugt unter Verwendung eines automatischen Schwellenwertverfahrens), um eine Strukturmaske zu erstellen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Zellstruktur ein Zellkern, wobei das Strukturabbild ein nukleäres Abbild ist und wobei die Strukturmaske eine nukleäre Maske ist. Wie hier verwendet, bezeichnet der Ausdruck „Maske“ eine verarbeitete Version des Abbilds der Zellstruktur, um Löcher zu Pellen. Die Erzeugung einer Maske umfasst bevorzugt das Setzen eines Schwellenwertes für das Abbild, um relevante Bildbestandteile mit Werten (Position, Intensität) über den Background außerhalb der

Strukturen von Interesse auszuwählen.

**[0022]** Wie hier verwendet, werden die folgenden Begriffe wie unten definiert:

**[0023]** Eine Zelle, welche sich vollständig innerhalb des Bildfeldes befindet („FOV; Field of View“) wird als eine „FOV-Zelle“ bezeichnet. Das sind die Zellen, welche analysiert werden können.

**[0024]** Eine Zelle, welche sich vollständig außerhalb des Bildfeldes befindet, wird als eine „Nicht-FOV-Zelle“ bezeichnet. Diese Zellen werden nicht analysiert.

**[0025]** Eine Randzelle bezeichnet eine Zelle, welche den Rand des Bildfeldes berührt. Die meisten Merkmalsmessungen dieser Zellen würden unvollständig oder fehlerhaft sein und deshalb werden randständige Zellen vorzugsweise nicht gezählt. Jedoch kann eine Randzelle als ein Zwischenstadium angesehen werden, welches, wenn erwünscht, verfolgt werden kann.

**[0026]** Ein Austreten ist definiert als eine Zelle, die in ihrer Gesamtheit den Bildbereich von einer beliebigen Richtung verlässt. Die Zelle muss vollständig außerhalb des Bildbereichs sein, um als ausgetreten angesehen zu werden.

**[0027]** Zellen, die in Bewegung sind, können jederzeit in den Bildbereich ein- und austreten. Ein Eintreten ist definiert als eine Zelle, die in ihrer Gesamtheit von einer beliebigen Richtung in den Bildbereich eintritt. Die Zelle muss sich vollständig innerhalb des Bildbereiches befinden, um als eingetreten angesehen zu werden, da sie ansonsten eine unvollständige Randzelle darstellen würde, die im Allgemeinen nicht analysiert wird.

**[0028]** Das Eintreten und Austreten trägt zur Komplexität des Verfolgens bei, da sie eine komplexere Handhabung von den Zellen benötigen, welche im gesamten Verlauf des gesamten Films vorhanden sind. Wenn alle Zellen zu allen Zeitpunkten vorhanden sind, würde diese Handhabung eine einfache Anordnung sein, welche durch eine Analyse des ersten Zeitpunkts bewerkstelligt werden kann. Wenn die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nicht vorhanden sind, wird eine Analyse der vollständigen Bilderserie benötigt, um dessen Bestand und die aufwändigeren Datenverwaltung aufzubauen.

**[0029]** Ein Erzeugungereignis wird als eine Zelle definiert, die „aus dem Blauen“ irgendwo in dem Bildfeld, nicht aber am Rand erscheint. Zum Beispiel kann eine Zelle nicht genug Markierungsintensität aufweisen, um zuerst nachgewiesen zu werden, aber während des Verlaufs der Bilderserie eine Antwort zeigte und sichtbar wurde. Wenn eine Zelle am Rand erscheint, würde dies ein Eintreten darstellen. Ein Zerstörungereignis ist definiert als eine Zelle, die aus dem Bildbereich verschwindet, sich aber nicht im Sinne eines Austretens herausbewegt. Zum Beispiel kann eine Zelle absterben oder auf irgendeine Weise ihren Markierungsmarker verlieren.

**[0030]** Es gibt drei allgemeine Ausführungsformen der Verfahren und Software zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen erfindungsgemäßen Zell-Screening-Assays. Jedes Verfahren stellt eine Alternative zu dem Grundverfahren dar, wobei jedes eine zusätzlichere Verbesserung bezüglich der Rückweitung von weniger Zellen und eine größere Robustheit beinhaltet.

### 1. Einfaches Annäherungsverfahren

**[0031]** In einer Ausführungsform umfasst das Bestimmen einer Übereinstimmung einer Zellidentifikation das Identifizieren von Referenzpunkten in dem Bildfeld bei einem ersten Zeitpunkt und Referenzpunkten in dem Bildfeld bei einem zweiten Zeitpunkt, welche am nächsten zusammen sind, und das Festlegen der geeigneten Zellidentifikation auf die Zelle des späteren Zeitpunkts in der Bilderserie. Dies sollte dann erfolgreich sein, wenn sich die meisten oder alle Zellen langsam bewegen (unter Berücksichtigung der Bildfrequenz). Beliebige andere Daten, welche benötigt werden, um den Vergleich bei aufeinander folgenden Zeitpunkten in der Bilderserie durchzuführen, werden gespeichert, einschließlich, aber nicht beschränkt auf die Referenzpunkte von allen Zellen des unmittelbar davorliegenden Zeitpunkts, und die Zell-ID, welche für jede dieser Zellen festgelegt worden ist (ID-Zuordnungstabelle). In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Übereinstimmung der Zellidentifikation zurückgewiesen, wenn sie unterhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für eine Übereinstimmung der Zellidentifikation fällt. Zum Beispiel kann der Benutzer eine maximale annehmbare Distanz bestimmen, so dass sich die Zellen zwischen den Zeitpunkten bewegen können (d.h. eine maximale Bewegungsrate) oder es kann ein Schwellwert gesetzt werden, um relevante Bildbestandteile mit Werten (Position, Intensität) oberhalb des Hintergrunds und außerhalb der Strukturen von Interesse auszuwählen.

**[0032]** Die aufeinander folgenden Sätze von Referenzpunkten werden vorzugsweise wie folgt in Übereinstimmung gebracht. Für jede Zelle wird in dem aktuellen Satz der Abstand zu jedem Referenzpunkt und dem unmittelbar davor liegenden Zeitpunkt bestimmt. Es werden die zwei am nächsten vorhergehenden Zellen bestimmt. Die am nächsten vorhergehende Zelle wird als aktuelle Zelle festgelegt und eine Qualitätskennzahl (zwischen 0 und 10) wird der Übereinstimmung zugeordnet, welche erhöht, da sich der relative Abstand der zweitbesten Übereinstimmung sich erhöht. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Qualitätskennzahl gemäß der Formel berechnet:

$$\text{Qualität} = 100 * (\text{zweitbester Abstand} - \text{bester Abstand}) / \text{zweitbester Abstand}$$

**[0033]** Diese wird vorzugsweise verwendet, wenn die Strecken, in denen sich die Zellen bewegen, kurz genug sind, damit es zu keiner Verwechslung kommt, welche Zelle sich wohin bewegt. Der Grad der Übereinstimmung wird berechnet, um dies abzuschätzen. Der Grad der Übereinstimmung beträgt 100%, wenn es keine Verwechslung gibt und 0%, wenn eine gleiche Chance besteht, dass die Zelle eine Nachbarzelle hätte sein können. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine Übereinstimmung der Zellidentifikation zurückgewiesen, wenn die Qualitätskennzahl unterhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für eine Qualitätskennzahl ist. Die Schwelle auf verschiedene Arten definiert sein, wie jene, die oben beschrieben sind, oder falls eine spezifische experimentelle Situation für die Zellen gegeben ist, kann der Benutzer die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen entstehen oder zerstört werden, vorhersagen und die angemessene Qualitätskennzahl für die Übereinstimmung kann dementsprechend gesetzt werden. Zum Beispiel kann die Schwelle für einen annehmbaren Grad der Übereinstimmung niedriger gesetzt werden, wenn der Benutzer keine Entstehungs- und Zerstörungereignisse erwartet. Zellen/Artefakte werden von der Analyse ausgeschlossen, wenn sie sich nicht einheitlich einer Zell-ID zuordnen lassen können.

## 2. Minimierung des Gesamtabstandes

**[0034]** Wenn das einfache Annäherungsverfahren in unklare Übereinstimmungen resultiert (z.B. niedrige Qualitätskennzahlen aufgrund von zwei gleich entfernten Zellen), kann genauso eine globale Übereinstimmung durchgeführt werden. Somit umfasst in einer weiteren Ausführungsform das Verfahren weiter das Bestimmen einer Gesamtsumme aller Abstände oder Abstände im Quadrat für alle möglichen Übereinstimmungen der Zellidentifikation in aufeinander folgenden Zeitpunkten, wobei eine kleinste Gesamtsumme aller Abstände oder Abstände im Quadrat als eine nächste Gruppe von Übereinstimmungen der Zell-Identifikation definiert ist.

**[0035]** Es wird eine Matrix von Abständen von jeder aktuellen und jeder vorhergehenden Zelle berechnet. Jede mögliche Permutation der Zellen [es gibt  $N!$  Permutationen] wird durch Summierung der Abstände (oder der Quadrate der Abstände) für alle ihre Paare berechnet, wobei die niedrigste Gesamtsumme die beste Übereinstimmung der Zellidentifikation darstellt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der Berechnungsaufwand durch eine Vor-Paarung vermindert werden (unter Verwendung des einfachen Annäherungsverfahrens) von beliebigen Übereinstimmungen mit Qualitätskennzahlen, die sich oberhalb einer vorher festgesetzten Schwelle befinden und indem die Zellen in diesen Vorpaarungen von dem globalen Übereinstimmungsprozess ausgeschlossen werden. Diese letzte Anpassung funktioniert sehr gut, wenn die Zellen in der Bewegungshäufigkeit stark variieren. Alternativ kann das Verfahren den Berechnungsaufwand verringern, indem die Zellen bei der Vorpaarung von dem globalen Übereinstimmungsprozess ausgeschlossen werden, die unterhalb einer benutzerdefinierten Schwelle liegen.

**[0036]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfassen die Verfahren weiter das Festsetzen einer Qualitätskennzahl zu der Übereinstimmung der Zellidentifikation, basierend auf einer Summe von Abständen oder Abständen im Quadrat, bestimmt für eine zweite nächste Übereinstimmung der Zellidentifikation und wobei eine Übereinstimmung der Zellidentifikation abgewiesen wird, wenn die Qualitätskennzahl niedriger als eine benutzerdefinierte Schwelle für eine Qualitätskennzahl ist.

## 3. Minimierung des Gesamtabstandes und Merkmalsübereinstimmung

**[0037]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Definieren der Zellidentifikation weiter das Vergleichen anderer charakteristischer Merkmale der individuellen Zellen zwischen aufeinander folgenden Zeitpunkten umfassen, um Zellen zu identifizieren und die Messungen für jede vorgeschlagene Übereinstimmung zu vergleichen. Auf individuellen Zellen angewendet ist dies ein Weg, um individuelle Unklarheiten effizient zu lösen. Als Teil eines komplizierteren Verfahrens (z.B. als Nachfolge des Minimierungsverfahrens des Gesamtabstandes) sind die Merkmalssätze Bestandteil einer Matrix mit besseren Daten, die mit den Vektoren

für den vorhergehenden Zeitpunkt verglichen wird und minimiert die berücksichtigte Summe der Abstände (oder Abstände im Quadrat) als Messung der Übereinstimmung. Die Matrix würde dann besser als eine Konfusionsmatrix bezeichnet werden, in der jede Position eine zusammengesetzte Anzahl darstellt, welche den Abstand + jeden anderen Wert der Zellmerkmalsübereinstimmung enthält.

#### Grad der Zellübereinstimmung

**[0038]** Im Gegensatz zur Messung einer Qualitätskennzahl, die auf dem einfachen Annäherungsverfahren basiert, basiert eine Qualitätskennzahl für das Minimierungsverfahren des Gesamtabstandes und der Merkmalsübereinstimmung weiter auf dem Übereinstimmungsgrad, der auf ein oder mehrere einer beliebigen Anzahl von Zellmerkmalen basiert, einschließlich, aber nicht beschränkt auf a) tatsächlich verfügbare Merkmale der Zelle oder der subzellulären Strukturen, wie Fluoreszenzintensität, Zellfläche, Zellform, etc. und/oder b) zusätzlich erzeugte Merkmale der Zelle, wie exogene Tags (d.h. Tags, die mit der Zelle verbunden sind, mit dem Ziel der Zellverfolgung), wie z.B. „Strichcode-Markierungen“ (unten diskutiert). Der Algorithmus ist so entworfen, dass er mit einem beliebigen Satz und mit einer beliebigen Anzahl von Merkmalen, welche sich bei unterschiedlichen Assays, Zelltypen, etc. unterscheiden können, funktioniert.

**[0039]** Während die Analyse der Zellmerkmale bei der Bestimmung einer Qualitätskennzahl in das einfache Annäherungsverfahren eingebaut werden kann (z.B. durchgeführt für mögliche zu analysierende Übereinstimmungen der Zellidentifikation) ist es bevorzugt, Übereinstimmungen der Zellidentifikation über das einfache Annäherungsverfahren „vorzupassen“ und eine Merkmalsanalyse nur soweit notwendig bei jenen Übereinstimmungen der Zellidentifikation durchzuführen, die bei Verwendung des einfachen Annäherungsverfahrens unklar sind.

**[0040]** Da die Zelle ihre Form und andere Zellmerkmale über die Zeit verändern kann, ist die Qualitätskennzahl niemals absolut vollständig. Umgekehrt können unterschiedliche Zellen ähnliche Zellmerkmale besitzen und können somit eine relativ hohe Punktzahl bei der Qualitätskennzahl erzielen. Jedes Zellmerkmal kann einen unterschiedlichen Verteilungswert gegenüber der Übereinstimmungsaufgabe haben. Zellmerkmale, die eine größere Variation zwischen den Zellen aufweisen, wie eine Einheitsidentifizierung (nukleäre Struktur, Intensität oder Position bezüglich anderer Zellstrukturen, wie der perinukleäre Golgi-Apparat) sind vorzugsweise stärker gewichtet als jene, die eine geringere Variation zwischen den Zellen aufweisen, wie die Position des Referenzpunkts von ganzen Zellen im Vergleich zu einem Referenzpunkt des Zellkerns. Diese bevorzugte Ausführungsform umfasst dementsprechend einen Gewichtungsfaktor für jedes Zellmerkmal um die Qualitätskennzahl zu berechnen. In einer Ausführungsform stellt ein Benutzer diese Gewichtungsfaktoren zur Verfügung. In einer anderen Ausführungsform wird der Gewichtungsfaktor von Lernsätzen und durch Anwendung einer Bayes-Klassifizierung oder einer anderen Technik berechnet.

**[0041]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Qualitätskennzahl bestimmt, indem als erstes deren Reziprokwert berechnet wird, d.h. der Abstand zwischen den Zellen. Diese „fehlende Übereinstimmung“ (vorzugsweise gewichtet) stellt die Summe der Abstände zwischen den Zellmerkmalen dar. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die fehlende Übereinstimmung (Mismatch) zwischen einer Zelle 1 und einer Zelle 2 wie folgt dargestellt:

$$\text{Mismatch} = \sum \{W_a + \text{DIFF}(F_{a1}, F_{a2})\}$$

wobei

„a“

$W_a$

$F_{a1}$

jedes verwendete Zellmerkmal ist  
der Gewichtungsfaktor für das Merkmal a ist  
das berechnete Merkmal a für die Zelle 1 ist

**[0042]**  $\text{DIFF}(F_{a1}, F_{a2})$  die Differenzfunktion zwischen einem Zellmerkmal a berechnet für eine Zelle 1 und einem Zellmerkmal a berechnet für eine Zelle 2 ist.

**[0043]** Die DIFF()-Funktion kann z.B. definiert sein als:

$$\text{DIFF}(x, y) = \text{ABS}(x-y); \text{ (wobei „ABS“ die „absolute Anzahl“ bedeutet)}$$

oder

$$\text{DIFF}(x, y) = (x - y) + (x - Y)$$

**[0044]** Das Quadrat des Abstandes verhilft, die Funktion „steiler“ zu machen.

**[0045]** Zum Beispiel kann eines oder mehrere der folgenden Zellmerkmale festgesetzt werden:

- a) Zellgröße
- b) durchschnittliche Zellfluoreszenzintensität und
- c) Zell-P2A oder Formfaktor

**[0046]** Für diese Merkmale wird der Gewichtungsfaktor (Wa, Wb bzw. Wc) vorzugsweise auf 1.0 gesetzt. Zum Beispiel kann die Gewichtung für jedes Zellmerkmal durch Verwendung eines Gewichtungsfaktors, der ein Bruchteil zwischen 0 und 1 ist, verringert werden, während die Gewichtung von jedem Zellmerkmal unter Verwendung eines Gewichtungsfaktors, der größer als 1 ist, erhöht wird. Die Anordnung der Gewichtungsfaktoren wird als ein Input des Algorithmus' angegeben, so dass er leicht, je nach Bedarf, angepasst werden kann.

**[0047]** Die Qualitätskennzahl stellt einfach den Reziprokwert der fehlenden Übereinstimmung (MisMatch) dar:

$$\text{Qualitätskennzahl} = 1/\text{MisMatch}$$

**[0048]** Für eine „vollständige Übereinstimmung“ beträgt der MisMatch null und damit wäre die Qualitätskennzahl unendlich hoch.

#### Mögliche Beschränkungen der Qualitätskennzahl

**[0049]** In einigen Fällen können die Zellen zu wenig gemustert sein, um unterscheidungskräftige Zellmerkmale aus ihnen ableiten zu können. Zum Beispiel können sie alle ein kugelförmiges Aussehen ohne eine Struktur haben. Eine Möglichkeit dieses Problem zu vermindern ist es, so viel wie möglich eindeutige Zellmerkmale zu untersuchen. Zum Beispiel können mehrere Fluoreszenzkanäle analysiert werden um weitere Zellmerkmale zu erzeugen, beispielsweise durch das Markieren mehrerer Strukturen, wie den Zellkern und Golgi-Apparat. Im Allgemeinen umfassen die erwünschten Eigenschaften von Zellmerkmalen zum Identifizieren von Zellen die Unterscheidung von benachbarten Zellen und Konstanz über die Zeit.

**[0050]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein „Strichcodierungs-“ Schema ausgeführt, um noch mehr den Zellen zugeordnete ausgeprägte Merkmale zu erhalten. Im Allgemeinen umfassen die erwünschten Eigenschaften von Strichcodierungsteilen zum Identifizieren von Zellen die Unterscheidung untereinander, die Unterscheidung von Zelle zu Zelle und eine Konstanz über die Zeit. Teile für „Strichcodierungs-“-zellen sind als Mischformen von variierender Intensität, Farbe und Größe verfügbar (z. B. fluoreszierende Kugelchen von unterschiedlicher Größe und Intensität von Bangs Labs oder Sätze von multispektralen Quantenflecken, die innerhalb der Kugelchen enthalten sind), so dass die meisten Zellen mit einem Teil oder einem Satz von Teilen, welche eindeutige Merkmale aufweisen, assoziiert sein können, und dadurch zu den eindeutigen Zellmerkmalen gezählt werden können. Strichcodierungsteile können innerhalb der Zelle durch Zufallsverteilung an Zellen und natürliche Phagozytose der Teilchen enthalten sein. Alternative Verfahren können eingesetzt werden, um die Ausbeute von markierten Teilchen und die Einheitlichkeit der Markierung zu erhöhen, einschließlich einer physikalischen Abbildung oder Injektion von Teilchen oder durch Hinterlegen von Zellen in geordneten Reihen von Strichcodierungsteilen die auf Substraten hinterlegt wurden um die Anzahl und Verteilung der Teilchen, die an Zellen abgeliefert werden, zu kontrollieren. Strichcodierungsteile müssen nicht auf einer perfekten eins-zu-eins Basis mit den Zellen assoziiert sein um für eine Zellidentifikation wertvoll zu sein. Die hier beschriebenen Verfahren sind fehlertolerant und eine unvollständige Strichcodierung trägt auch zur Zellidentifikation bei, selbst wenn die Strichcodes nicht in jeder Zelle enthalten sind oder wenn die Strichcodes manchmal innerhalb des Bildes wiederholt werden. Strichcodeteile können sichtbar mit Zellen assoziiert sein, z. B. durch deren Nähe zu einem markierten Zellkern oder einer anderen Zellstruktur oder indem sie innerhalb der Zellperipherie enthalten sind. In diesen Fällen werden die „Strichcodierungs-Merkmale“ so wie jedes andere Zellmerkmal in der oben genannten Gleichung der Qualitätskennzahl behandelt. In bevorzugten Fällen ist eine Verteilung, Eigentümlichkeit und Universalität der Strichcodierungsteile ausreichend und es werden keine unterstützenden biologischen Strukturen benötigt um Teilchen mit eindeutigen Zellen zu assoziieren. Wenn die Strichcodierungstechnik eine sehr hohe Qualität bezüglich einer Mehrheit von Zellen, die eine eindeutige Strichcodierung enthalten, aufweist, kann der Gewichtungsfaktor für das Zellmerkmal der Strichcodierung sehr hoch sein was eine Markierung von endogenen Zellstrukturen überflüssig macht. Ein weniger strenges Strichcodierungsschema ergibt einen niedrigeren Gewichtungsfaktor und trägt einfach zu einem Teil zum Prozess

des Anpassens bei.

**[0051]** In anderen Fällen können die Zellen ihre Form und Zellmerkmale während sie von Zeitpunkt zu Zeitpunkt abgebildet werden so oft ändern, dass eine Identifikation zu verschiedenen Zeitpunkten für dieselbe Zelle schwierig ist. Dieses Problem wird durch ein ausreichend oft wiederholtes Abtasten (erhöhte Abtastrate) vermindert, um sicherzustellen, dass die Variabilität über die Zeit geringer ist als die Variabilität zwischen den Zellen.

**[0052]** Die Abtastrate bezeichnet die Anzahl der Bilderfassungen pro Minute. Eine nicht ausreichende Abtastrate reduziert die Fähigkeit, effektiv Zellen zu verfolgen oder schnelle zelluläre Ereignisse zu messen. Eine zu hohe Abtastrate kann die Zellen aufgrund von Phototoxizität beschädigen. Eine optimale Abtastrate wird daher von verschiedenen Faktoren abhängen, einschließlich Zellbewegung, Zelldichte, dem zu analysierenden zellulären Ereignis und den Wahrscheinlichkeiten des Eintretens (dem Bewegen in das Bildfeld), Austreten (dem Verlassen des Bildfelds) und Kollisionen mit anderen Zellen. Zum Beispiel können sehr schnelle Calciumveränderungen eine schnellere Abtastrate als es in den meisten Assays benötigt werden erforderlich machen, um dem Anspruch an das Verfolgen gerecht zu werden. Im Allgemeinen stellt eine optimale Abtastrate die Minimumrate dar, welche benötigt wird, um ein Signal mit einer beliebigen Präzision zu rekonstruieren (d.h. die Nyquist-Abtastrate). Ein Weg, um diese Rate herauszufinden, ist es, sich das Fourier-Spektrum des ursprünglichen Signals anzuschauen und den Teil der häufigsten Rate zu finden. Die Nyquist-Abtastrate entspricht dem Zweifachen dieser Rate. Eine Abtastung unterhalb der Nyquist-Rate kann keine Rekonstruktion der Teile mit höherer Rate des Signals ermöglichen und kann Artefakte, die auf einem Alias-Effekt beruhen, erzeugen.

**[0053]** Es ist auch wünschenswert, die „Ausbeute“ des kinetischen Assays zu optimieren. Die Ausbeute kann als absolute Zellzahl ausgedrückt werden, welche freie Bahn haben (d.h. keine Kollisionen), oder als der Prozentsatz dieser Zellen im Vergleich zu den Gesamtzellen. Die Wahrscheinlichkeit einer freien Bahn ist die Wahrscheinlichkeit einer Zelle, nicht an irgendwelchen Kollisionen beteiligt zu sein und während der vollständigen Bilderfassung nicht das Bildfeld zu betreten oder zu verlassen. Diese Wahrscheinlichkeit wird geringer werden, je länger kinetische Daten angefordert werden, da eine ausreichende Zellbewegung unter Umständen alle Zellen kollidieren oder aus dem Bildbereich bewegen lassen kann, und sie ist abhängig von der Zellbewegung und der Zelldichte.

**[0054]** Wenn eine bestimmte Zelldichte (d.h. Anzahl von Zellen pro Quadratfläche) gegeben ist, kann ein Benutzer den durchschnittlichen Abstand zwischen den Zellen berechnen. Wenn ein Bildbereich eine extrem hohe Zelldichte aufweist, hat er das Potential einer hohen Ausbeute, aber wahrscheinlich werden alle Zellen innerhalb der ersten paar Bilderfassungen kollidieren und so die Ausbeute auf null reduzieren. Somit ist es nützlich, eine optimale Zelldichte zu bestimmen, um eine optimale Ausbeute für einen gegebenen Satz von Zellverhaltensparametern zu erzeugen. Die optimale Zelldichte wird basierend auf all den verschiedenen, hier diskutierten Faktoren variieren und wird somit bevorzugt experimentell oder durch Computer-Simulation bestimmt. Zum Beispiel wird die optimale experimentelle Zelldichte von der zu messenden biologischen Funktion der Zellen und von dem statistischen Fehler, der für eine Messung der Probe erwünscht ist, abhängen.

**[0055]** Eine optimale Zelldichte, die für die biologischen Variablen berücksichtigt wird, beträgt zwischen 10 und 50% Konfluenz.

**[0056]** Der durchschnittliche Abstand zwischen den Zellen muss eventuell in Bezug auf die Zellkonfluenz (z.B. Prozentsatz von Zellen, welche andere Zellen berühren) oder Zellanhäufungen korrigiert werden. Bei einer durchschnittlichen Schätzung der Zellbewegungsgeschwindigkeit, können wir die maximale Abtastrate so setzen werden, dass sie dem „Nyquist“-Kriterium genügt. Die Geschwindigkeit der Zellbewegung wird vorzugsweise als eine pro Zeitpunkt bei der Bilderfassung zurückgelegte durchschnittliche Strecke ausgedrückt. Eine Zellbewegung kann auch durch Definieren ihrer Geschwindigkeit und das Beibehalten einer Richtung (direkte Bewegung) durch einen Diffusionskoeffizienten (Brownian-Bewegung) und/oder durch Definieren eines Affinitätsfaktors, der die Wirkung von sich nahe befindlichen Zellen auf die Bewegung einer Zelle widerspiegelt beschrieben werden.

#### Gleitender Durchschnitt der Qualitätskennzahl

**[0057]** Die Qualitätskennzahl kann über mehrere Zeitpunkte gemittelt werden und zu einem späteren Zeitpunkt als eine durchschnittliche Qualitätskennzahl eingesetzt werden. Dieser „gleitende Durchschnitt“ wird Teil des Merkmalvektors, der für jede Zelle zu jedem Zeitpunkt berechnet wird. Bei diesem Weg wird er während der Analyse von jeder Bilderfassung weiter gesetzt, ohne dass man die gesamte Bilderfassungsreihe erfassen

muss.

**[0058]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird dies zum Zeitpunkt t wie folgt definiert:

Durchschnittliche Qualitätskennzahl<sub>t</sub> = (1 – k) · durchschnittliche Qualitätskennzahl (t-1) + k · Qualitätskennzahl,

wobei k eine Konstante ist, um den Gewichtungsfaktor dieses geometrischen Mittels zu definieren. Der Wert von k kann experimentell durch Bereitstellung der besten Annäherung mit den tatsächlichen Daten einer Probe, bei der eine Zellidentifikation vorbestimmt ist, bestimmt werden. Die Wahl von k hängt von der Abtastrate relativ zu der Menge der Veränderung in den Zellen ab und von dem gewünschten Ausmaß der Abschwächung des Merkmals über die Zeit. Ein Wert von k in der Nähe von 1 wird eine geringe oder keine Abschwächung durchmachen, während ein Wert in der Nähe von null eine starke Abschwächung durchmachen wird. Der Wert der durchschnittlichen Qualitätskennzahl wird mit einem Wert gesetzt, der die Erwartung zu Beginn der Bildfassungsreihe widerspiegelt. Das Verfahren benötigt keine Kontroll- oder tatsächliche Daten, sondern es werden die Parameter, die verwendet werden, um das Verfahren für eine spezifische biologische Probe zu kalibrieren, vorzugsweise experimentell von Kontrolldaten abgeleitet, welche mit der experimentellen Probe bei den Messungen, die für die Zellidentifikation verwendet werden, übereinstimmen. Zum Beispiel können Kontrollexperimente ausgeführt werden, oder es kann eine vernünftige Erwartung für diesen Wert gegeben werden.

#### 4. Verringerung der Konfusionsmatrix

**[0059]** Der Rechenaufwand für das Gesamtabstands- & Merkmalsübereinstimmungs-Minimierungsverfahren und für eine vollständige Konfusionsmatrix kann ziemlich hoch sein und wird schnell mit der Anzahl von Zellen größer. Daher wird in einer bevorzugten Ausführungsform primär das berechnungsmäßig weniger aufwändige einfache Annäherungsverfahren verwendet und nur diejenigen Übereinstimmungen der Zellidentifikation, die unklar sind, werden, soweit notwendig, einer Konfusionsmatrixanalyse unterworfen.

**[0060]** Die Strategie sieht wie folgt aus:

- a) Versuch einer Anpassung von Zellen basierend auf einer einfachen Annäherung
- b) Identifizierung von Problemfeldern, in denen eine einfache Annäherung nicht funktioniert
- c) Berechnung von Konfusionsmatrices für diese Felder – für einen beschränkten Satz von Zellen
- d) Lösen der Konfusionsmatrices für die Problemfelder Beispiele Bestimmen, wann das einfache Annäherungsverfahren nicht ausreichend ist

**[0061]** Wie in der zuvor beschriebenen Version beschrieben, können wir zwei Beispiele in Erwägung ziehen. Dann fahren wir mit der Strategie fort, um das richtige Verfahren für diese Tätigkeit festzulegen.

##### 1. Sehr einfacher Fall

**[0062]** Drei Zellen (a, b und c), jede bewegt sich ein bißchen nach rechts und wird dann zu A, B und C in dem nächsten Zeitpunkt:

a      A  
       b      B  
       c      C

//Programm-Output ...

**[0063]** Test 1 ... 3 Zellen bewegen sich nach rechts

##### Vorhergehendes Bild

Markierung	Xcm	Ycm	Zell-ID
0	100	100	1
1	200	200	2
2	300	300	3

## Neues Bild

Markierung	Xcm	Ycm	Zell-ID	Qualität	Neu?	dY	dX	Abstand
0	120	100	1	100%	alt	20	0	20,00
1	225	200	2	100%	alt	25	0	25,00
2	330	300	3	100%	alt	30	0	30,00

## Abstandsmatrix

	0	1	2
0	20,00	128,06	269,07
1	160,08	25,00	125,00
2	304,80	164,01	30,00

## 2. Der schwierigere Fall

**[0064]** Drei Zellen, jede bewegt sich ein bißchen nach rechts. Dies klingt ähnlich wie in #1, aber nun macht die Annäherung der neuen Orte die Situation verwirrend:

a A b B  
c C

**[0065]** Diese Situation ist beinahe dieselbe wie in dem einfachen Beispiel, aber stellt ein Hauptverfolgungsproblem dar. Zum Beispiel: A und C sind näher an b als an a oder c. Unter Verwendung des einfachen Annäherungsverfahrens werden die folgenden Ergebnisse enthalten:

a ist verloren, b bewegte sich nach A oder C, B ist eine "neue Zelle" und c bewegte sich nach A.

**[0066]** Diese Situation benötigt eine komplexere Annäherungsmatrix und einen kompetitiven Übereinstimmungsteil des Algorithmus, um eine beste globale Anpassung für alle beteiligten Zellen hervorzubringen. Der Algorithmus kann dies verfolgen unter Verwendung der Abstandsminimierungsfunktion des Algorithmus (siehe unten).

```
// Programmoutput ...
```

**[0067]** Test 4 ... 3 Zellen bewegen sich nach rechts, aber sind zu nah beisammen für eine einfache Übereinstimmung

## Vorhergehendes Bild

Markierung	Xcm	Ycm	Zell-ID
0	100	100	1
1	125	100	2
2	105	105	3

## Einfaches Annäherungsverfahren

15

### Neues Bild:

Markierung	Xcm	Ycm	Zell-ID	Qualität	neu?	dX	dY	Abstand
0	120	100	2	100%	alt	-5	0	5,00
1	145	100	3	12%	alt	40	-5	40,00
2	125	105	1	100%	alt	2	5	25,00

## Fehlgeschlagenes einfaches Annäherungsverfahren

Nun genauere Betrachtungsweise der Abstandsmatrix

## Abstandsmatrix

	0	1	2
0	20,00	5,00	15,81
1	45,00	20,00	40,31
2	25,50	5,00	20,00

## Übereinstimmungspermutation

0 1 2

|||

0 1 2

0 2 1

1 0 2

1 2 0

2 1 0

2 0 1

## berechnete Gewichtung des Gesamtabstands

$$20,00 + 20,00 + 20,00 = 60,0$$

$$20,00 + 5,00 + 40,31 = 65,31$$

$$45,00 + 5,00 + 20,00 = 75,0$$

$$45,00 + 5,00 + 15,81 = 65,81$$

$$25,50 + 20,00 + 15,81 = 61,31$$

$$25,50 + 5,00 + 40,31 = 75,81$$

Somit ist 0 1 2 die beste Annäherungssequenz

## Gesamtabstandsminimierungsverfahren

## Neues Bild

	Xcm	Ycm	Zell-ID	Qualität	neu?	dX	dY	Abstand
0	120	100	0	100%	alt	20	0	20,00
1	145	100	1	12%	alt	20	0	20,00
2	125	105	2	10%	alt	20	0	20,00

Wie konnten wir wissen, ob wir es mit einem Beispiel 2 anstatt mit 1 zu tun haben?

**[0068]** Wenn es eine Vielzahl von nahen Objekten in dem Feld gibt, könnte man einfach annehmen, dass das einfache Annäherungsverfahren an dessen Grenzen stößt.

**[0069]** Zweitens könnten Erzeugungs- und Zerstörungs-Ereignisse das Vorkommen eines „Alias“-Effekts nahelegen. Es könnte schwierig sein, zwischen Erzeugungs- und Eintretungsergebnissen zu unterscheiden, wenn die Probenfrequenz zu niedrig ist, um eine genaue Bewertung vornehmen zu können. Bei einer niedrigen Probenfrequenz könnte eine Zelle, die plötzlich in der Nähe des Rands erscheint, eine Neubildung sein oder könnte sich einfach schnell als ein Eintretungsergebnis hineinbewegen haben. Dasselbe gilt für Zerstörungs- und Austretungsergebnisse. Es ist anzumerken, dass ein Eintreten auch vorkommen kann, wenn eine Zelle den Bildbereich „von oben“ betritt. Dies bedeutet, dass eine Zelle oberhalb der Feldtiefe fließt und in dem Bildbereich landet. Die meisten beobachteten Erzeugungs- und Zerstörungsergebnisse werden durch Artefakte verursacht, wie ein Fokus- oder ein Signal-zu-Hintergrund-Problem. Wenn das Problem in einem nachfolgenden Zeitpunkt korrigiert wird, wird dieselbe Zelle als ein Erzeugungsergebnis auftauchen.

**[0070]** Zum Beispiel:

a                    Ab                    B

**[0071]** Die einfache Schlussfolgerung würde sein:

a ist zerstört, b bewegt sich nach A und B ist eine Neuentstehung.

**[0072]** Zusätzlich zu den Erzeugungs- und Zerstörungsanhaltspunkten kann man einen Durchschnitts-Wert der zuletzt zurückgelegten Strecke verwenden, um einen „Einflussbereich“ zu definieren.

Zuletzt zurückgelegte Strecke

**[0073]** Um den Bewegungsgrad, der von einer individuellen Zelle erwartet wird zu bestimmen, kann die zurückgelegte Strecke von dem vorhergehenden Zeitpunkt aufgezeichnet werden. Obwohl ein zurückliegendes Verhalten keinen wirklichen Hinweis liefert, wie sich die Zelle im Verlauf bewegen wird, ist dieser Hinweis besser als überhaupt kein Hinweis.

**[0074]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird dies zum Zeitpunkt  $t$  wie folgt definiert:

$$\text{Zuletzt zurückgelegte Strecke} = \text{SQRT} (\text{posx}_{(t-2)} - \text{posx}_{(t-1)})^2 + (\text{posy}_{(t-2)} - \text{posy}_{(t-1)})^2$$

**[0075]** Dieser Wert muss mit einem Wert gesetzt werden, der zu Beginn des Bildaufzeichnungssatzes die Erwartung widerspiegelt. Zum Beispiel können Kontrollexperimente ausgeführt werden oder es kann eine angemessene Erwartung für diesen Wert gegeben werden.

Gleitender Durchschnitt der zuletzt zurückgelegten Strecke

**[0076]** Da die Bewegung einer Zelle zu schwanken scheint, ist es bevorzugt, ein paar Zeitpunkte zu mitteln statt einen einzelnen Zeitpunkt zu verwenden. Somit umfasst eine weitere bevorzugte Ausführungsform das Weiterführen eines gleitenden Durchschnitts einer zurückgelegten Strecke zu jedem neuen Zeitpunkt.

**[0077]** In einer bevorzugten Ausführungsform ist dies zum Zeitpunkt  $t$  wie folgt definiert:

$$\text{Durchschnittliche zuletzt zurückgelegte Strecke } t = (1 - k) \cdot \text{zuletzt zurückgelegte Strecke}_{(t-1)} + k \cdot \text{zurückgelegte Strecke}$$

**[0078]** Wobei  $k$  konstant ist, um den Gewichtungsfaktor für dieses geometrische Mittel zu definieren. Die Wahl von  $k$  hängt von der Probenrate relativ zu der Menge der Veränderung der Zellen und von dem gewünschten Abschwächungsgrad des Merkmals über die Zeit ab. Ein Wert von  $k$  in der Nähe von 1 bedeutet eine geringe oder keine Abschwächung, während ein Wert in der Nähe von null eine sehr hohe Abschwächung bedeutet. Der durchschnittliche Wert der zuletzt zurückgelegten Strecke muss mit einem Wert gesetzt werden, der eine Erwartung zum Zeitpunkt des Bilderfassungssatzes widerspiegelt. Zum Beispiel können Kontrollexperimente durchgeführt werden oder es kann eine angemessene Erwartung für diesen Wert gegeben sein.

**[0079]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Identifizieren von Zellen oder Gruppen von Zellen, welche eine Analyse anhand der Konfusionsmatrix benötigen:

1. Ermitteln der längsten durchschnittlichen Strecke der letzten Bewegung aller Zellen in diesem Feld. Dies ist ein guter Hinweis bezüglich der Beweglichkeit dieser Zellen. Diese Anzahl kann mit einem Sicherheitsfaktor multipliziert werden, z.B. mit 1,3, um z.B. eine 30% höhere Beweglichkeit als zuvor beobachtet, gewährleisten. Der einzige Aufwand, diese Zahl zu erhöhen, ist die Berechnungszeit.
2. Berechnen eines Einflussbereichs unter Verwendung dieser erhöhten durchschnittlichen Zahl der zuletzt zurückgelegten Strecke für jede Zelle. Die Absicht ist es, einen genügend großen Bereich zu erzeugen, um sicherzustellen, dass keine falsche Neuerscheinungs- und Zerstörungssereignisse erzeugt werden. Jedoch ist dieser Bereich klein genug (d.h. vorzugsweise 10 Zellen oder weniger), so dass die Konfusionsmatrix von allen Zellen innerhalb des Einflussbereichs nicht so groß wird, dass sie rechenmäßig zu aufwändig wird.
3. Verschmelzen von Bereichen durch Ausweitung bei Überlappung. Wenn z.B. zwei räumlich getrennte Haufen von Zellen sich nur eine Zelle teilen, welche nahe genug ist, um Teil eines solchen Haufens zu sein, müssen nur diese Haufen in eine verschmolzen werden.
4. Die Bereiche resultieren in Gruppen von Zellen, welche „etwas miteinander zu tun haben können“. Sie stellen nicht mehr wirkliche Bereiche zu dieser Zeit dar, sondern lediglich eine Liste von Zell-ID. Wenn sich zu einer Zeit mehr als ein Objekt in einem Bereich befindet, kann davon ausgegangen werden, dass das einfache Annäherungsverfahren nicht angemessen ist und dass die komplexeren Übereinstimmungsverfahren eingesetzt werden.

## Konfusionsmatrix

**[0080]** Wenn der vorherige Schritt den Bedarf einer komplexen Übereinstimmung notwendig macht, kann eine Konfusionsmatrix berechnet werden. In einer Ausführungsform wird die Konfusionsmatrix mit kleinen Gruppen von Zellen durchgeführt, vorzugsweise weniger als 20 Zellen und bevorzugter 15 Zellen oder weniger.

**[0081]** Zum Beispiel wird ein wie unten beschriebener Vektor erzeugt, wenn drei Zellen in der Gruppe vorhanden sind:

$$\begin{array}{ccc} \mathbf{MM}_{1,1} & \mathbf{MM}_{1,2} & \mathbf{MM}_{1,3} \\ \mathbf{MM}_{2,1} & \mathbf{MM}_{2,2} & \mathbf{MM}_{2,3} \\ \mathbf{MM}_{3,1} & \mathbf{MM}_{3,2} & \mathbf{MM}_{3,3} \end{array}$$

wobei  $\mathbf{MM}_{1,2}$  der MisMatch der Zelle 1 im Vergleich zur Zelle 2 ist, etc. Der berechnete Abstand zwischen den Zellen kann zu den MM-Matrixelementen an diesem Punkt hinzugefügt werden und in derselben Berechnung als ein weiteres Übereinstimmungsmerkmal verwendet werden.

## Tatsächliche Eintretungs-/Austretungs- und Neubildungs-/Zerstörungs-Ereignisse

**[0082]** Bei Verwendung der oben genannten Matrix wird immer eine Übereinstimmung erzeugt werden, selbst wenn es Eintretungs-/Austretungs- und Neubildungs/Zerstörungs-Ereignisse gibt.

**[0083]** Es ist bevorzugt, dass es eine Grenze gibt, bei der eine Übereinstimmung zurückgewiesen wird und bei der bei diesem Punkt ein Neubildungs- und/oder ein Zerstörungereignis vorliegt. Die durchschnittliche Qualitätskennzahl kann für diesen Zweck verwendet werden. Diese Zahl kann durch einen Bewilligungsfaktor multipliziert werden, um einen Schwellenwert hervorzubringen. Der „Bewilligungsfaktor“ wird vorzugsweise ermittelt durch den Abgleich der Wahrscheinlichkeit eines Neubildungs-/Zerstörungereignisses mit der Performance der Verfolgungspräzision. Die Schwelle kann auch extern gesetzt werden, wenn ausreichende Lern-Datensätze, von spezifischen für die Zelltypen und -assays, erzeugt worden sind, mit denen eine geeignete Schwelle etabliert wird.

## Reduktion der Konfusionsmatrix

**[0084]** Es kann schwierig werden, die Konfusionsmatrix zu lösen, wenn die Zahl von Zellen in einem Konfusionshaufen größer als ungefähr 10–20 Zellen beträgt. Die Anzahl der Permutationen, die ermittelt werden müssen, ist proportional zur Fakultät der Anzahl von Zellen in dem Haufen. Dies kann vermieden werden, indem der maximale angemessene Abstand zwischen den Zellen niedrig genug gesetzt wird und durch Verwendung einer zur Herstellung geeigneten Probenrate basierend auf vorhergehenden Testdaten und dem Festsetzen neuer Standards und Assay-Parameter. Die Verwendung dieses „Matrixreduktionsverfahrens“ ermöglicht den Umgang mit größeren Konfusionsmatrizes von z.B. 20–40 Zellen bei einem Bruchteil der Berechnungszeit.

**[0085]** Alternativ kann die Effizienz des Lösens der Konfusionsmatrix erhöht werden unter Verwendung der Abstandsmatrix, um die Konfusionsmatrixelemente „vorzumustern“. Dieses Verfahren beinhaltet das Ausschließen von Übereinstimmungen der Zellidentifikation mit einer Qualitätskennzahl bei oder oberhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für Qualitätskennzahlen (wie bestimmt durch die Abstandsmatrix) von der Konfusionsmatrix.

**[0086]** Die hier beschriebenen Zellverfolgungsverfahren liefern Informationen bezüglich der Kontinuität der Zellidentifikation von Zeitpunkt zu Zeitpunkt in einem kinetischen Zell-Screening-Assay. Um die Informationen in einen Zell-Screening-Assay(s) zu integrieren, werden die Ergebnisse von den Zellverfolgungsverfahren bevorzugt verwaltet, so dass Zell- und Vertiefungsmerkmale, und kinetische Output-Merkmale mit den richtigen Zellen assoziiert werden können. Das Beziehen von Output-Merkmalen eines Assays auf die Zellübereinstimmung benötigt eine zusätzliche Datenverwaltung. Die optimale Berechnung von kinetischen Merkmalen (Zell-basierend oder Vertiefungs-basierend) hängt von einem Zelldaten-Verwaltungsalgorithmus ([Fig. 1](#)) ab, der in Verbindung mit dem Zellverfolgungsmodul arbeitet. Die Datenverwaltung dient drei wichtigen Zwecken: (1) um die Liste der Output-Merkmale und der Zell-ID untereinander dynamisch in Beziehung zu setzen; (2) um eine Modifikation der Output-Daten eines Assays durch die Ergebnisse der Zellverfolgung zu ermöglichen;

(3) um das richtige Sortieren der Datensätze, die von mehreren Bildern gewonnen wurden, zu ermöglichen. Zum Beispiel können Assay-Daten für ungültige Zellen ausgeschlossen werden. Zellen können als ungültig markiert werden, wenn sie z.B. bei einigen Zeitpunkten vorhanden und bei anderen Zeitpunkten nicht vorhanden sind.

**[0087]** Zu jedem Zeitpunkt müssen die Zelldaten entsprechend der aktuellen Zell-ID (kinetische Zell-ID) neu angeordnet werden, so dass die kinetischen Zelldaten berechnet werden können. Dann müssen die kinetischen Daten mit der Zell-ID für die zu berechnenden Vertiefungsstatistiken wieder neu abgeglichen werden. Statistiken können von allen Zellen in einer Vertiefung oder nur von zu Ende verfolgten Zellen, in Abhängigkeit von den Bedürfnissen des Benutzers erzeugt werden. Der Algorithmus der Datenverwaltung beinhaltet die Verfolgung von allen neu identifizierten Zellen (bei jedem aktuellen Zeitpunkt) und ermöglicht damit dem Benutzer das Zeitintervall (Startzeitpunkt und Endzeitpunkt), in dem jede Zelle verfolgt worden ist, zu bestimmen. Dies wiederum macht es möglich, die Zellen zu markieren, welche die ganze Zeit vollständig von dem Beginn des Experiments bis zu dessen Ende verfolgt worden sind. Die Fähigkeit, die Zellen auszuwählen, die bestimmte Zell-ID-Kriterien erfüllen, ist für die Erstellung von optimalen kinetischen Daten auf der Zellebene äußerst wertvoll. Während die durchschnittlichen Daten einer Population minimal durch den Verlust oder den Gewinn von ein paar Zellen beeinflusst sein können, können die kinetischen Daten auf der Zellebene dramatisch durch eine Falschidentifikation beeinflusst werden oder durch Zellen, die während des gesamten Experiments nicht nachweisbar sind. In einem weiteren Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung ein Computer-lesbares Speichermedium, umfassend ein Programm, das einen Satz von Instruktionen enthält, um ein Zell-Screening-System zu veranlassen, Prozeduren zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen Zell-Screening-Assays auszuführen, wobei die Prozeduren die verschiedenen erfindungsgemäßen Verfahrensschritte umfassen. Das Computer-lesbare Speichermedium umfasst, ist aber nicht beschränkt auf magnetische Disketten, optische Disketten, organische Speicher und jedes andere flüchtige (z.B. Random Access Memory („RAM“) oder nicht-flüchtige (z.B. Read-Only memory („ROM“)) Massenspeichersystem, das von der CPU lesbar ist. Das Computerlesbare Medium schließt das Kooperieren eines zusammengeschalteten Computerlesbaren Mediums ein, welches ausschließlich auf dem Verarbeitungssystem vorhanden ist oder auf mehreren zusammengeschalteten Verarbeitungssystemen, die sich lokal oder entfernt vom Verarbeitungssystem angeordnet sein können, verteilt sein kann.

**[0088]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Zell-Screening-System ein optisches Fluoreszenzsystem mit einer Plattform, die angepasst ist, um Zellen zu tragen, und ein Mittel zur Bewegung der Plattform, eine Digitalkamera, eine Lichtquelle zum Empfangen und Verarbeiten der digitalen Daten von der Digitalkamera und ein Computermittel zum Empfangen und Verarbeiten der digitalen Daten von der Digitalkamera. Dieser Aspekt der Erfindung umfasst Programme, die das Zell-Screening-System anweisen, die Organisation des/der zellulären Bestandteile) von Interesse in individuellen Zellen unter Verwendung der hier offenbarten Verfahren festzulegen.

**[0089]** Die erfindungsgemäßen Verfahren können in Verbindung mit jedem beliebigen zellbasierten Screening-Assay verwendet werden, einschließlich multiparametrischer Assays, die sich die kinetischen Analysen zu Nutzen machen. Eine Reihe von biologisch wichtigen Metaboliten, regulatorischen Molekülen und Organellen (wie jene, die in Tabelle I gezeigt sind) können mit Fluorophoren gefärbt werden und die Aktivität oder Konzentrationen können durch Messungen der Intensitätsänderungen über die Zeit bestimmt werden. Die Mehrheit dieser Indikatoren benötigt intakte, lebende Zellen, die sich über die Zeit inhärent verändern. Deshalb werden einzelne zelluläre kinetische Intensitätsmessungen für Informationen mit hohem Gehalt von diesen Indikatoren benötigt. Die meisten der kleinen Molekülindikatoren, die in Tabelle I aufgelistet sind (einschließlich Marken-Indikatoren) sind von Molecular Probes erhältlich.

Tabelle I

<b>Intensitäts-basierte Indikatoren einer biomolekularen Aktivität</b>	
<b>Ziel</b>	<b>Fluoreszierender Indikator</b>
Ca <sup>2+</sup>	Fluo4, FLIPR, Indol, Fura-2
Mg <sup>2+</sup>	Mg-Fura-2
Na <sup>+</sup>	SBFI
K <sup>+</sup>	PBFI
Cl <sup>-</sup>	SPQ
Metall-Ionen: Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Ni <sup>+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , As <sup>3+</sup> , Tb <sup>3+</sup> , La <sup>2+</sup>	Calcein, Calcium-Green-1, BTC-5N, FITC_Gly, -His, TCCP, TSPP, APTRA-BTC
pH	BCECF, SNARF, SNAFL, NERF
Genexpression	GFP-cDNA-Chimere mit einem Gen der Wahl
Proliferation und DNA-Gehalt	Hoechst, DAPI
Lebensfähigkeit	Lebend-/Matt-Farbstoffe, wie CMFDA oder Kalzein-(lebend)/Propidium-Iodid (matt)
Membranpotential	DiBAC
Zelluläre Organellen	MITOTRACKER™, JC-1, LYSOTRACKER™, Fluoreszein-Dextran, Carbocyanin und Ceramid-Farbstoffe

Stickstoffoxid-/reaktive Sauerstoffspezies	Chlor-Fluorescein
Phosphoinositide	Bodipy-Inositol
Zyklisch AMP	PKA-Chimere und kovalent markierte Proteine
Multi-Drug-Resistenz-Transporter	Doxorubicin, Rhodamin-123
Protease-Aktivität	Amino-Coumarin-Substrat-Peptide
Zelloberflächen- und intrazelluläre Rezeptoren	Verschiedene fluoreszierende Liganden

## Ligandenbindung

**[0090]** Liganden für zelluläre Oberflächen-Rezeptoren binden spezifische extrazelluläre Liganden. Einige natürliche Liganden induzieren eine molekulare Funktion, während andere, exogene Moleküle, wie Arzneimittel Teile in subzelluläre Kompartimente binden und eine Biomolekülfunktion modulieren. Liganden, die fluoreszierend markiert sind, können auf eine Bindung an die Zelle beobachtet werden. Eine fluoreszierende EGF-Bindung an den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors findet innerhalb weniger Minuten statt und aktiviert den Rezeptor. Nach der Oberflächenbindung internalisiert der EGF-Rezeptorkomplex in endosomale Kompartimente, was eine Herunterregulation und ein Abbruch des Signals anzeigt. Eine Bindung und Internalisierung kann unter Verwendung der erfindungsgemäßen kinetischen Verfahren nachgewiesen werden.

## Zell-Lebensfähigkeit

**[0091]** Intakte Plasmamembranen können durch Einführung von Indikatoren nachgewiesen werden, welche durch intakte Zellmembranen hindurchgehen können und intrazellulär durch enzymatisches Entfernen der Seitenketten, die für die Membran-Permeabilität benötigt werden, eingeschlossen bleiben. Die Farbstoffe bleiben eingeschlossen und markieren dadurch Zellen, bis die Plasmamembran zerreiht und die internalisierten Farbstoffe freigesetzt. Acetoxymethyl-ester-Derivate von Calcein funktionieren als Indikator von intakten Zellmembranen und lebensfähigen Zellen sehr gut. Eine weitergehende Lebensfähigkeit der Zellen kann in Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen kinetischen Verfahren beobachtet werden.

## GFP-Expression

**[0092]** Die erfindungsgemäßen kinetischen Verfahren können verwendet werden, um die Expression von Proteinen über die Zeit zu beobachten. Viele Proteine können fluoreszierend markiert sein, ohne die Funktion der Herstellung von DNA-Konstrukten des Proteins von Interesse, welches einen zusätzlichen Code für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) enthält, zu beeinträchtigen. Diese Bio-Reporter werden in Zellen exprimiert, um ein mit Fluoreszenz markiertes funktionelles Protein, herzustellen. Diese Sonden würden nützlich sein als i) ein Zielvalidierungswerkzeug, mit dem die Spiegel der potentiellen therapeutischen Ziele, die in kinetisch veränderten Zellen exprimiert werden, beobachtet werden könnten oder ii) ein Screening-Werkzeug, mit dem die Wirkungen von Verbindungen auf den Ebenen von GFP-[Promotor von Interesse]-Fusionsproteinen beobachtet werden könnten. Die Antwortzeit liegt im Bereich von Stunden bis Tagen.

## Stickstoffoxid/reaktive Sauerstoffspezies

**[0093]** Stickstoffoxid ist ein wichtiges Signalmolekül in Neuronen und in Endothel-Zellen und kontrolliert den Gefäßtonus und die Zellkommunikation. Die Anwendung könnte als ein Screening-Werkzeug verwendet werden oder als ein Zytotoxizitäts-Werkzeug, um die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies aufzuzeichnen. Diese Moleküle sind wichtige pharmakologische Ziele für Apoplexie, Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit und kongestive Herzinsuffizienz. Die Antwortzeit liegt im Bereich von 1–10 Minuten und könnte sich somit

unter Verwendung der erfindungsgemäßen kinetischen Verfahren entwickeln.

#### Multiple Arzneimittelresistenz (MDR)

**[0094]** Diese Anwendung kann verwendet werden, um die Aktivität des Zelloberflächentransporters, P-Glycoprotein, aufzuzeichnen. Dieser ist eine molekulare Pumpe, welche in der Zytosplasmamembran verankert ist und Antikrebs-Arzneimittel aus den Zellen pumpt und so eine Zellresistenz gegenüber einer Vielzahl von therapeutischen Agenzien herstellt. Die Antwortzeit für diesen Assay liegt im Bereich von Minuten und könnte sich daher unter Verwendung der erfindungsgemäßen kinetischen Verfahren entwickeln. Dieser Assay würde für Antikrebs-Therapien anwendbar sein.

#### Lysomaler pH

**[0095]** Fluoreszein-markierte Dextrane werden in die Zelle durch Endozytose aufgenommen und gelangen in lysosomale Kompartimente, in denen die Dextrane abgebaut werden. Die Intensität von Fluoreszein ist pH-abhängig und deshalb ist die Messintensität über die Zeit ausreichend, um Veränderungen bei der lysosomalen Aktivität, die durch Arzneimittel, wie die Proton-Ionophore, Monesin, induziert wurde, nachzuweisen.

**[0096]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Verwendung der erfindungsgemäßen kinetischen Verfahren in Verbindung mit einem Zell-Screening-Assay werden Zellen durch Inkontaktbringen der Zellen mit einem nukleären Marker unter Verwendung der Information aus dem nukleären Kanal aufgeteilt. Bilder von dem nukleären Kanal können gegebenenfalls vorbearbeitet sein (farbkorrigiert und geglättet) und es kann eine Schwelle gesetzt werden (unter Verwendung eines automatischen Schwellenlensetzerfahrens), wobei eine nukleäre Maske erzeugt wird. Durch Zeichnen von Linien, die gleich weit zu den Kernrändern entfernt sind (Wasserscheiden-Verfahren), werden nukleäre Einflussbereiche (nicht-berührende zelluläre Domänenmasken) identifiziert und die Maske der Domänen wird erzeugt. Für jede nukleäre Maske wird eine erweiterte nukleäre Maske erzeugt (eine nukleäre Maske wird ein paar Mal verlängert in Abhängigkeit vom Zelltyp- und -größe). Das logische „AND“ der Maske mit entsprechender zellulärer Domäne resultiert in einer Endmaske, welche auf den zweiten Kanal übertragen wird, um die Fluoreszenzintensität des relevanten Fluoreszenzmarkers unter der Maske zu messen. Zellkerne sind maskiert und Zellen werden durch Definieren von Domänen außerhalb jedes Kerns mit einer Wasserscheiden-Verfahrensweise aufgeteilt. Kinetische Merkmale werden dann basierend auf den Intensitätsveränderungen in individuellen Zellen von einer Messung zu der nächsten, wie oben beschrieben, bestimmt.

**[0097]** Durch Bestimmen der Fluoreszenzintensität, welche durch die Marker in individuellen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ausgesendet wird, stellt das Verfahren zellbasierte, kinetische Messungen für ein oder mehrere der folgenden Anwendungen zur Verfügung:

Dynamische Veränderungen bei der Intensität über die Zeit

Heterogenität der Intensität unter Zellen

Wiederkehrende Schwingungen in der Intensität

Wellen von Intensitätsveränderungen über verbundene Zellen

Subpopulationen von antwortenden Zellen

Aufeinander folgende Aktivierung von Signalmolekülen

**[0098]** In einer bevorzugten Ausführungsform stellt das Verfahren eine messbare Antwort von Zellen bereit (d.h. Prozent von antwortenden Zellen mit einer Intensität oberhalb eines Schwellenwertes), welche den Wert des vorliegenden Assays über solche Assays, die lediglich die Rohamplitude der Antwort messen, erhöht. Die Schwelle, die für einen bestimmten Parameter verwendet wird, kann für jeden Zeitpunkt bestimmt werden und der Wert der Schwellen kann vor dem Durchmustern als ein Assay-Input-Parameter gesetzt werden oder kann während der Datenanalyse zurückgesetzt werden.

**[0099]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die kinetische Messung modifiziert, sortiert und/oder ausgeschlossen in Abhängigkeit von der Qualitätskennzahl der Übereinstimmung der Zellidentifikation für jede Zelle. Das Sortieren schließt das Poolen von Daten von allen Zellen aus einer Gruppe ein, so wie schnelle Zellen, Zellen im 5. Bildsatz, Zellen mit Rot-Markern und Subpopulationen von großen Zellen.

**[0100]** In Falle von Calcium-Assays können die zu bestimmenden kinetischen Merkmale folgende einschließen, sind aber nicht beschränkt darauf: Zell-basierte kinetische Merkmale:

– Intensität – durchschnittliche Fluoreszenzintensität von Zellen, gemittelt über die Zeit

– vorstimulatorische Intensität – Die Grundwertintensität vor der Stimulation durch einen Agonisten (Durch-

schnittswert über alle vorstimulierten Punkte)

- Spitzenintensität – Spitzenintensitätswert (höchster Punkt oder Kurve, die angeglichen ist, um den Umkehrpunkt zu finden)
- Relativer Spitzenintensitätswert – Spitzenintensität/vorstimulatorische Intensität.
- Zeit für die Spitzenintensität
- Intensität des Plateaus
- Relative Intensität des Plateaus
- Integrierte Intensität der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung
- Schwingungsfrequenz
- Schwingungsfortdauer
- Schwingungsamplitude

#### Vertiefungsbasierte kinetische Merkmale

- durchschnittliche Fluoreszenzintensität
- durchschnittliche Grundlinienintensität
- durchschnittliche Spitzenintensität
- durchschnittliche relative Spitzenintensität
- durchschnittliche Zeit für die Spitzenintensität
- durchschnittliche Intensität zum Plateau und Asymptote
- durchschnittliche relative Intensität des Plateaus
- durchschnittliche integrierte Intensität der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung
- durchschnittliche Schwingungsfrequenz
- durchschnittliche Schwingungsfortdauer
- durchschnittliche Schwingungsamplitude

#### Patentansprüche

1. Ein Verfahren zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen Zell-Screening-Assays, umfassend:

- a) Bereitstellen von Zellen, die mindestens ein erstes mit Lumineszenz markiertes Reportermolekül besitzen, das von einer Zellstruktur berichtet;
- b) Erhalten eines Strukturabilds von lumineszierenden Signalen von dem mindestens ersten mit Lumineszenz markierten Reportermolekül in den Zellen in einem Bildfeld;
- c) Erstellen einer Strukturmaske für individuelle Zellen in dem Bildfeld;
- d) Definieren eines Referenzpunkts von jeder Strukturmaske;
- e) Festsetzen einer Zellidentifikation zu jedem Referenzpunkt in dem Bildfeld;
- f) Wiederholen der Schritte b) bis e) bei einem zweiten Zeitpunkt;
- g) Korrelieren der Zellidentifikation zwischen dem ersten Zeitpunkt und dem zweiten Zeitpunkt durch Berechnen eines Abstands zwischen den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt und
- h) Definieren einer Übereinstimmung der Zellidentifikation durch Identifizieren von Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt, die am nächsten zusammen sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend das Wiederholen der Schritte f) bis h) mit einer gewünschten Anzahl von Zeitpunkten, wobei das Bestimmen des Abstands zwischen Referenzpunkten durchgeführt wird durch Bestimmen eines Abstands zwischen Referenzpunkten in aufeinander folgenden Zeitpunkten und wobei das Definieren der nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation durchgeführt wird durch Definieren der nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation in aufeinander folgenden Zeitpunkten.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine Übereinstimmung der Zellidentifikation abgewiesen wird, wenn die Zellen, die als eine Übereinstimmung der Zellidentifikation identifiziert worden sind, weiter auseinander liegen als ein benutzerdefinierter Grenzbereich.

4. Verfahren nach Anspruch 3, weiter umfassend das Festlegen einer Qualitätskennzahl zu der Übereinstimmung der Zellidentifikation, basierend auf einem Abstand, der für eine zweite nächste Übereinstimmung der Zellidentifikation bestimmt wurde, und wobei eine Übereinstimmung der Zellidentifikation abgewiesen wird, wenn die Qualitätskennzahl unterhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für eine Qualitätskennzahl ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Qualitätskennzahl berechnet wird durch ein Verfahren, umfassend das Teilen der Differenz zwischen dem Abstand zwischen Referenzpunkten in der nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation von dem Abstand zwischen Referenzpunkten in der zweiten nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation durch den Abstand zwischen den Referenzpunkten in der zweiten nächsten Übereinstimmung der Zellidentifikation.

6. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend das Bestimmen einer Gesamtsumme aller Abstände oder Abstände im Quadrat für alle möglichen Übereinstimmungen der Zellidentifikation in aufeinander folgenden Zeitpunkten, wobei eine kleinste Gesamtsumme aller Abstände oder Abstände im Quadrat als eine nächste Gruppe von Übereinstimmungen der Zellidentifikation definiert ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, weiter umfassend das Festsetzen einer Qualitätskennzahl zu der Übereinstimmung der Zellidentifikation, basierend auf einer Summe von Abständen oder Abständen im Quadrat bestimmt für eine zweite nächste Übereinstimmung der Zellidentifikation und wobei eine Übereinstimmung der Zellidentifikation abgewiesen wird, wenn die Qualitätskennzahl niedriger als eine benutzerdefinierte Schwelle für eine Qualitätskennzahl ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, weiter umfassend das Ausschließen von der Bestimmung einer Gesamtsumme aller Abstände oder Abstände im Quadrat für alle möglichen Übereinstimmungen der Zellidentifikation in aufeinander folgenden Zeitpunkten beliebiger Übereinstimmungen der Zellidentifikation mit einer Qualitätskennzahl bei oder oberhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für Qualitätskennzahlen.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Definieren der Übereinstimmung der Zellidentifikation weiter das Vergleichen anderer Merkmale der individuellen Zellen zwischen aufeinander folgenden Zeitpunkten umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Merkmale ein oder mehrere der Merkmale, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fläche, Form, Größe und lumineszierende Intensität von Zell- oder subzellulären Strukturen und exogene Markierungen, die mit Zell- oder subzellulären Strukturen assoziiert sind, umfassen.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Merkmal eine exogene Markierung umfasst und wobei die exogene Markierung eine Strichcodierung umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 10, weiter umfassend das Ausschließen von beliebigen Übereinstimmungen der Zellidentifikation mit einer Qualitätskennzahl bei oder oberhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für Qualitätskennzahlen von dem Vergleichen anderer charakteristischer Merkmale der individuellen Zellen zwischen aufeinander folgenden Zeitpunkten.

13. Verfahren nach Anspruch 10, weiter umfassend das Ausschließen jeder Übereinstimmungen der Zellidentifikation mit einer Qualitätskennzahl unterhalb einer benutzerdefinierten Schwelle für Qualitätskennzahlen von dem Vergleichen anderer charakteristischer Merkmale der individuellen Zellen zwischen aufeinander folgenden Zeitpunkten.

14. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Qualitätskennzahl ein Durchschnitt über mehrere Zeitpunkte ist und zu einem späteren Zeitpunkt als eine durchschnittliche Qualitätskennzahl angewendet wird.

15. Verfahren nach Anspruch 7, weiter umfassend das Bestimmen eines Abstands, der durch die individuelle Zelle in aufeinander folgenden Zeitpunkten bewegt wurde.

16. Verfahren nach Anspruch 15, weiter umfassend das Bestimmen eines durchschnittlichen Abstands, der durch eine individuelle Zelle über mehrere Zeitpunkte bewegt wurde.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellstruktur ein Nukleus ist, wobei das Strukturabbild ein nukleäres Abbild ist und wobei die Strukturmaske eine nukleäre Maske ist.

18. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Zell-Screening-Assay ein oder mehrere Assays für die kinetische Analyse eines Zellparameters umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus ionische Konzentration, pH, Genexpression, DNA-Proliferation, DNA-Gehalt, Zellviabilität, Membranpotential, Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies, Enzymaktivität, Rezeptoraktivierung, Ligandenbindung und Transporteraktivität.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Zellen weiter mindestens ein zweites mit Lumineszenz mar-

kiertes Reportermolekül besitzen, das von dem Zellparameter berichtet und wobei das Verfahren weiter umfasst das Erhalten von lumineszierenden Signalen von dem zweiten mit Lumineszenz markierten Reportermolekül und das Berechnen einer kinetischen Messung der lumineszierenden Signale von dem zweiten mit Lumineszenz markierten Reportermolekül in individuellen Zellen, wobei die Kinetikmessung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus dynamischen Veränderungen bei der Intensität über die Zeit, Heterogenität der Intensität unter Zellen, Schwankungen der Intensität, Wellen von Intensitätsänderungen durch verbundene Zellen, Subpopulation von antwortenden Zellen und sequenzielle Aktivierung von signalisierenden Molekülen.

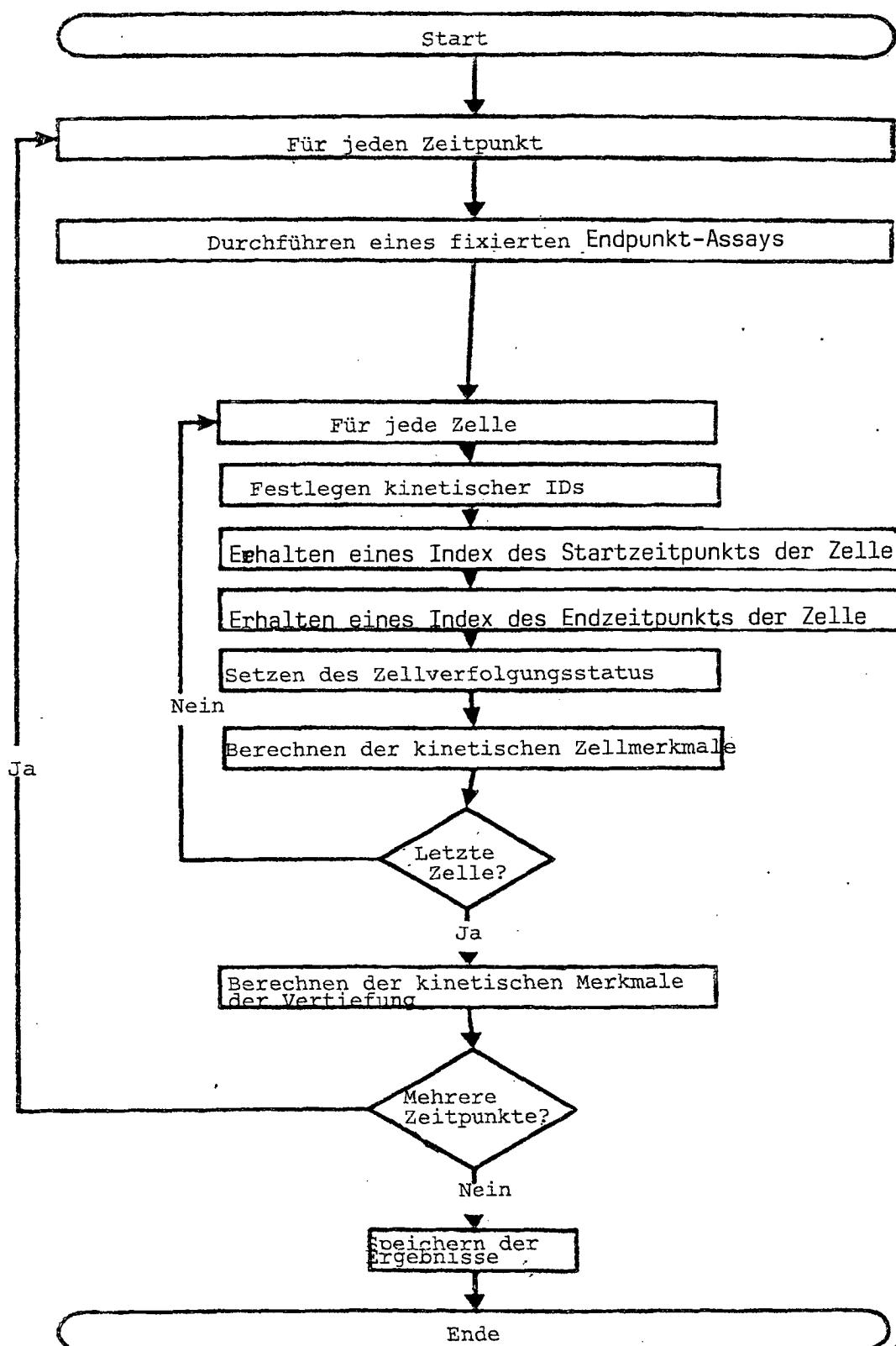
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die kinetische Messung modifiziert, sortiert und/oder ausgeschlossen ist in Abhängigkeit von einer Qualitätskennzahl für die Übereinstimmung der Zellidentifikation für jede Zelle.

21. Ein computerlesbares Speichermedium, umfassend ein Programm, das eine Gruppe von Instruktionen enthält, um ein Zell-Screening-System zu veranlassen, Verfahren zum Verfolgen individueller Zellen während eines kinetischen Zell-Screening-Assays auszuführen, wobei die Verfahren umfassen

- a) Bereitstellen von Zellen, die mindestens ein erstes mit Lumineszenz markiertes Reportermolekül besitzen, das von einer Zellstruktur berichtet;
- b) Erhalten eines Strukturabilds von lumineszierenden Signalen von dem mindestens ersten mit Lumineszenz markierten Reportermolekül in den Zellen in einem Bildfeld;
- c) Erstellen einer Strukturmaske für individuelle Zellen in dem Bildfeld;
- d) Definieren eines Referenzpunkts von jeder Strukturmaske;
- e) Festsetzen einer Zellidentifikation zu jedem Referenzpunkt in dem Bildfeld;
- f) Wiederholen der Schritte b) bis e) bei einem zweiten Zeitpunkt;
- g) Korrelieren der Zellidentifikation zwischen dem ersten Zeitpunkt und dem zweiten Zeitpunkt durch Berechnen eines Abstands zwischen den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt und
- h) Definieren einer Übereinstimmung der Zellidentifikation durch Identifizieren von Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem ersten Zeitpunkt und den Referenzpunkten in dem Bildfeld bei dem zweiten Zeitpunkt, die am nächsten zusammen sind.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Figur 1