

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Mathematiker Damian Stichel
aus Darmstadt

Tag der mündlichen Prüfung:
19.10.2015

Kollektive Migration von Lungenkrebszellen - Modellierung und Datenanalyse

Gutachter:
Prof. Dr. Ursula Kummer
Dr. Franziska Matthäus

Summary. In the healing of epithelial tissue wounds, a complex interplay between cellular differentiation, proliferation and migration is required. Typical attributes of cancer are perturbations and imbalances in activation, deactivation and maintenance of these processes. Due to this, tumors are often designated as “wounds that never heal“. Recent attempts in cancer therapy target signaling pathways by inhibitors. One example is the selective inhibition of the EGF/EGFR pathway. We are interested in the interplay between intracellular signaling and migratory behaviour in non-small cell lung cancer. For this we analyse experimental data from migration assays involving lung cancer cells under different growth factor stimulations and inhibitor treatments. We implemented a workflow for efficient and (in major parts) automated image analysis. We use most notably particle image velocimetry (PIV) and single cell tracking analysis to infer migratory characteristics, e.g. spatiotemporal speed distributions or correlation lengths and investigate how these change under different treatments. A collective cell migration model is used to simulate the migratory behaviour. The mechanical model describes random motility and cell-cell adhesion. Comparison between simulations and parameters inferred from data leads to the conclusion, that a term for directed self-propulsion is needed in the model. The extended model formulation is able to explain most of the observed dynamics. Agent-based model simulations reproduce migratory phenotypes observed in the experimental data. The stochasticity of the model prevents the possibility of a direct fit of the new model to data. However, we introduce a method to infer model parameters controlling intercellular forces directly from experimental data. The method was tested with simulated data and can be applied to experimental data to infer cell-specific parameters. The combination of data analysis and modeling thus leads to an extensive set of parameters and relations describing the collective migration of cells.

Zusammenfassung. Für die Wundheilung von Epithelgewebe ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen zellulärer Differenzierung, Proliferation und Migration erforderlich. Typische Kennzeichen von Krebserkrankungen sind Störungen und Unausgewogenheit in Aktivierung, Deaktivierung und Aufrechterhaltung dieser Prozesse. Deswegen werden Tumore oft als „Wunden, die niemals heilen“ beschrieben. Aktuelle Ansätze in der Krebstherapie fokussieren sich auf die Regulation von Signalübertragung, zum Beispiel die selektive Inhibierung des EGF/EGFR-Signalpfades. Unser Interesse liegt im Zusammenspiel zwischen intrazellulärer Signalübertragung und migratorischem Verhalten von nichtkleinzelligen Lungenkrebszellen (NSCLC). Wir analysieren experimentelle Daten aus Migrations-Assays mit Lungenkrebszellen nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, oder Inhibierung ausgewählter Signalpfade. Es wurde ein effizienter Arbeitsablauf mit großteils automatisierter Datenanalyse entwickelt und implementiert. Wir benutzen insbesondere Methoden der Particle Image Velocimetry (PIV) und Einzel-Zell-Tracking um migratorische Charakteristiken, wie zum Beispiel nach Zeit und Raum aufgelöste Geschwindigkeitsverteilungen oder Korrelationslängen zu berechnen und zu untersuchen, wie diese sich für unterschiedliche experimentelle Bedingungen verändern. Um das Migrationsverhalten zu simulieren verwenden wir ein Modell für kollektive Zellmigration, welches zufällige Motilität und Zell-Zell-Adhäsion beschreibt. Vergleiche zwischen Simulationen des Modells und Parametern, die aus der Datenanalyse inferiert werden können, führen zu der Schlussfolgerung, dass im Modell ein weiterer Term für gerichtete Zellbewegung benötigt wird. Das durch diesen Term erweiterte neue Modell ist in der Lage, die meisten in den Daten sichtbaren Dynamiken zu erklären. Agentenbasierte Simulationen des Modells reproduzieren migratorische Phänotypen, die in den experimentellen Daten auftreten. Durch die Stochastizität des Modells ist ein direkter Fit des erweiterten Modells an die Daten nicht möglich. Wir stellen allerdings eine Methode vor, mit der interzelluläre Parameter, die die Migration kontrollieren, direkt aus experimentellen Daten inferiert werden können. Die Methode wurde an simulierten Daten getestet und kann auf experimentelle Daten angewendet werden, um zellspezifische Parameter zu bestimmen. Die Kombination von Datenanalyse und Modellierung gewährt auf diese Weise Zugang zu einer umfangreichen Menge an Parametern, die die kollektive Migration von Zellen beschreiben.

Erklärung gemäß §8(3) b) und c) der Promotionsordnung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe, und ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Damian Stichel
Heidelberg, 2015

Teile der vorliegenden Arbeit wurden beziehungsweise werden publiziert in:

D. Stichel*, A. Middleton*, B. Müller, K. Breuhahn, F. Matthäus, An individual-based model for the collective migration of epithelial cancer cells explains speed dynamics and migration phenotype variability in response to growth factor treatment, in Vorbereitung, 2015.

A. Middleton, **D. Stichel**, B. Müller, K. Breuhahn, F. Matthäus, Solving the inverse problem: from collective migration to individual cell properties, in Vorbereitung, 2015.

B. Müller*, M. Bovet*, Y. Yin*, **D. Stichel***, M. Malz, A. Middleton, V. Ehemann, J. Schmitt, T. Muley, M. Meister, E. Herpel, S. Singer, A. Warth, P. Schirmacher, D. Drasdo, F. Matthäus, K. Breuhahn, Concomitant expression of far upstream element (FUSE) binding protein (FBP) interacting repressor (FIR) and its splice variants induce migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, J. Pathology, zur Veröffentlichung angenommen, 2015.

S. Schmitt, K. Safferling, K. Westphal, M. Hrabowski, U. Müller, P. Angel, B. Füssel, S. Holland-Cunz, W. Löffler, **D. Stichel**, G. Germann, F. Matthäus, P. Schirmacher, N. Grabe, K. Breuhahn, Stathmin regulates keratinocyte proliferation and migration during cutaneous regeneration, PloS ONE 8(9): e75075, doi: 10.1371/journal.pone.00750752013, 2013

*: Autoren haben in gleichem Umfang beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Summary	v
Zusammenfassung	vii
Inhaltsverzeichnis	xi
Abbildungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Biologische Grundlagen	3
1.1.1 Lungenkrebs	3
1.1.2 Zell-Zell-Adhäsion	5
1.1.3 Zellmigration	6
1.1.4 Signalverarbeitung	13
1.2 Ansätze zur Analyse kollektiver Zellmigration	16
1.2.1 Experimentelle Ansätze	16
1.2.2 Mathematische Modellierung von (kollektiver) Zellmigration	18
1.2.3 Plattformen zur Modellierung und Simulation	23
1.3 Beschreibung der experimentellen Daten	24
1.3.1 Relevante Lungenkrebs-Zelllinien	24
1.3.2 In-vitro-Migrations-Experimente	25
2 Material und Methoden	31
2.1 Verwendete Software	31
2.2 Analyse der Migrationsexperimente mit Methoden der Particle Image Velocimetry	32
2.2.1 Grundlagen der Particle Image Velocimetry (PIV)	32
2.2.2 Typische Fehler	42
2.3 Mathematische Modellierung der Zellmigration beim Wundschluss	45
2.3.1 Das einzelzellbasierte Modell	46
2.3.2 Entdimensionalisierung	48
2.3.3 Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen und eine kontinuierliche Version des Modells	49

2.3.4	Auflösen der Hierarchie in den Gleichungen	52
3	Ausgewählte Ergebnisse der Datenanalyse	55
3.1	Nachbearbeitung und Validierung der PIV-Ergebnisse	55
3.1.1	Filtern der Ergebnisse	55
3.1.2	Umrechnung der Einheiten	58
3.1.3	Validierung der errechneten Geschwindigkeitsfelder	59
3.1.4	Alternative zu PIV: Einzel-Zell-Tracking	59
3.2	Inferierte räumlich-zeitliche Parameter	63
3.3	Untersuchte Datenmenge	65
3.4	Der Einfluss von FIR auf Migration von CaLu-1-Zellen	65
3.4.1	Hintergrund	65
3.4.2	Ergebnisse	66
3.5	Geschwindigkeitsdynamik mit und ohne Zellteilung (Mitomycin-Experiment)	71
3.6	Einfluss von HGF auf die Migration von H1975-Zellen	72
3.7	Auswirkung von EGF und IGF auf die Migration von H1975-Zellen	74
3.7.1	Hintergrund	74
3.7.2	Ergebnisse	74
3.8	Einfluss von Stathmin auf die Migration von Keratinozyten in der Wundheilung	76
4	Ergebnisse der mathematischen Modellierung und Simulation der Zellbewegung	79
4.1	Fitting der Fisher-Gleichung an <i>Scratch-Assay</i> -Daten	79
4.1.1	Diskussion des Modellierungsansatzes mit Fisher-Gleichung	81
4.2	Fitting des kontinuierlichen Modells an experimentelle Daten	82
4.3	Erweiterung des adhäsionsbasierten Modells und Anpassung an Ergebnisse der Datenanalyse	86
4.3.1	Progressive Aktivierung der Zellbewegung bei kollektiver Zellmigration	87
4.3.2	Integration von persistenter gerichteter Bewegung	87
4.4	Beispiele für Simulationen des Modells	90
5	Modellbasierte Inferenz von Parametern	97
5.1	Korrelationsfunktionen	97
5.2	Integralgleichung für räumlich-lokal gemittelte Geschwindigkeitsvektoren	99
5.3	Rekonstruktion von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen und Geschwindigkeitsfeldern aus experimentellen Daten	101
5.4	Formulierung der Zielfunktion	104
5.5	Inferierbare Parameter	107

5.6 Fehlerquellen bei der Anwendung auf experimentelle Daten	108
5.7 Test der Methode an simulierten Daten	108
5.7.1 Inferierte Parameter bei Anwendung auf simulierte Daten .	108
6 Diskussion und Ausblick	111
Literaturverzeichnis	121
Danksagung	135

Abbildungsverzeichnis

1.1	Überblick über die Komponenten dieser Arbeit	2
1.2	Schritte bei der individuellen Zellmigration	8
1.3	Sheet Migration in 2D	10
1.4	Bildung von Fingern in experimentellen Daten	12
1.5	Insert für <i>Scratch-Assay</i>	17
1.6	Migrationsmodell von DiMilla et. al (1991)	19
1.7	Migrationsverhalten von H838 und H1975 nach Stimulation mit FCS	26
1.8	Beispiel für <i>Scratch-Assay</i> -Daten mit Hoechst-Staining	29
2.1	Prandtls Wasserkanal	33
2.2	Klassischer Versuchsaufbau und Funktionsweise der Particle Image Velocimetry	34
2.3	Zerlegung der Kreuzkorrelationsfunktion in drei Komponenten . .	39
2.4	Multipass-Methode	42
2.5	Veranschaulichung der PIV-Auswertung mit Kreuzkorrelation . .	43
2.6	Geschwindigkeitsfeld aus Particle Image Velocimetry	44
2.7	Typische Form der Kreuzkorrelationsmatrix	45
2.8	Peak-Locking-Effekt	46
2.9	Skizze zur Wirkung der interzellulären Kräfte	48
2.10	Morse-Potential	49
3.1	Fehler in Particle Image Velocimetry	56
3.2	Beispiel lokaler Filter	57
3.3	Beispiel für Fehler im Einzel-Zell-Tracking durch Segmentierungs- fehler	61
3.4	Vergleich von Geschwindigkeitsdynamik aus PIV und aus Einzel- Zell-Tracking	62
3.5	Visualisierung von Geschwindigkeitsfeldern aus der PIV für CaLu- 1-Zellen	67
3.6	Histogramme der Geschwindigkeitsvektoren bei Migration von CaLu- 1-Zellen	68
3.7	Charakteristika der Zellmigration von CaLu-1-Zellen	69

3.8	Heatmap für die x -Komponente der Geschwindigkeitsvektoren bei Migration von CaLu-1-Zellen.	69
3.9	Heatmap der Zelldichte bei Migration von CaLu-1-Zellen	70
3.10	Geschwindigkeitsdynamik von Zellen der Zelllinie H1975 nach Stimulation mit Mitomycin	72
3.11	Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Stimulation mit HGF	73
3.12	Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Stimulation mit EGF beziehungsweise IGF	75
3.13	Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Inhibierung von EGF-R und wahlweise Stimulation mit IGF	76
3.14	Ausschnitte aus den 2D-Migrations-Daten von konfluenten Keratinozyten	77
3.15	Charakteristika des Einflusses von Stathmin auf die Migration von Keratinozyten	77
3.16	Zeitlicher Verlauf der Zelldichte bei Migration von Keratinozyten	78
4.1	Fits der Fisher-Gleichung an eindimensionale Dichteprofile aus experimentellen <i>Scratch-Assay</i> -Daten	80
4.2	Vergleich zwischen Diffusionskoeffizienten aus Fit der Fisher-Gleichung und mittleren Geschwindigkeiten aus Einzel-Zell-Tracking	81
4.3	Visualisierung von eindimensionalen Dichteprofilen aus <i>Scratch-Assay</i> -Daten	82
4.4	Beispiel für Fits des kontinuierlichen Modells an eindimensionale Dichteprofile von <i>Scratch-Assay</i> -Daten	84
4.5	Beispiel für mit kontinuierlichem Modell gefittete Diffusionskoeffizienten	85
4.6	Typischer Geschwindigkeitsverlauf	86
4.7	Illustration der progressiven Aktivierung der kollektiven Zellbewegung	88
4.8	Vergleich des Geschwindigkeitsverlauf im Modell mit und ohne Gedächtnis	89
4.9	Simulationen des Modells	92
4.10	Bildung von Löchern im Gewebe in Experiment und Simulation	93
4.11	Vom Gewebe abgelöste Zellen in Experiment und Simulation	94
4.12	Bildung von <i>Leader</i> -Zellen in der Simulation	95
5.1	Skizze zu den Korrelationsfunktionen	98
5.2	Skizze zur Diskretisierung des Raumes	102
5.3	Gemessene und geschätzte Heatmaps der absoluten Geschwindigkeiten	109

Einleitung

Die Migration von eukaryotischen Zellen ist für alle Tiere ein grundlegender und in hohem Maße regulierter Prozess und wird auch als *crown achievement* der Biologie beschrieben. Sie weckt großes Forschungsinteresse und gilt als eines der am besten untersuchten biologischen Phänomene. Insbesondere fasziniert Zellmigration Wissenschaftler durch ihre Ästhetik und viele verschiedene Zellformen, die bei der Migration auftreten. Zellen migrieren um Gewebe zu formen, um Wunden zu schließen oder im Zusammenhang mit immunologischen Abwehrreaktionen.

Allerdings können auch Tumorzellen die Fähigkeit entwickeln zu migrieren, und Metastasen in entfernten Geweben bilden. Viele Arten von Tumorzellen bewegen sich hierbei individuell durch Ablösen von einzelnen Zellen aus dem Gewebe. Von einigen Typen von Tumorzellen, insbesondere von invasiven Lungenkrebszellen, ist jedoch bekannt, dass sie im Gewebeverband zusammen bleiben und sich kollektiv in locker oder fest verbundenen Gruppen bewegen.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die kollektive Migration von Zellen (insbesondere von Lungenkrebszellen) besser zu verstehen und die Vorgänge, die damit in Verbindung stehen, zu analysieren. Hiermit soll ein Beitrag geleistet werden, die frühe Metastasierung (*early spread*) von Lungenkrebs zu analysieren und beeinflussen zu können.

In der klinischen Anwendung ist es wichtig zu verstehen, auf welche Weise interne Regulation die Migration und somit die Bildung von Metastasen steuert. Um die Einwirkung von Hormonen/Wachstumsfaktoren auf das Migrationsverhalten zu verstehen, werden *in vitro*-Migrationsexperimente unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt und analysiert. Die vorliegende Arbeit ist in wesentlichen Teilen datenorientiert. Um quantitative Parameter auf Gewebeebene bestimmen zu können, wurden Methoden entwickelt, mit denen die experimentellen Daten schnell und effizient ausgewertet werden können.

Die wichtigste Methode, die zur Auswertung der Daten verwendet wird, berechnet lokale Geschwindigkeitsfelder basierend auf Methoden der Particle Image Velocimetry.

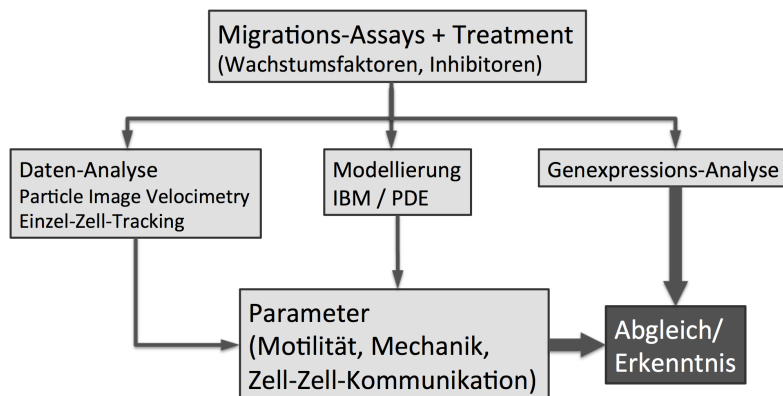


Abbildung 1.1: **Überblick über die Komponenten dieser Arbeit.** Um für die kollektive Migration spezifische Parameter zu ermitteln, werden Datenanalyse und ein Modellierungsansatz kombiniert. In einem weiteren Teilprojekt, das in dieser Arbeit nicht vorgestellt wird, werden Genexpressions-Daten ausgewertet, um die erhaltenen Ergebnisse zu validieren.

Die Datenanalyse wird mit einem Modellierungsansatz kombiniert. Um die Zellmigration zu simulieren, verwenden wir ein auf interzellulären Kräften basierendes Modell. Durch Wahl der Modellparameter können wir verschiedene Phänotypen der Migration *in silico* nachbilden und mit dem Verhalten der Zellen *in vitro* vergleichen, das durch die Datenanalyse charakterisiert wird. Mit Hilfe der Datenanalyse kann das Modell dann validiert werden. Zeigt das Modell andere Eigenschaften, als sich aus der Datenanalyse ergeben, so kann das Modell entsprechend angepasst und verbessert werden. Auf diese Weise entstehen ein iterativer Prozess und eine stetige Weiterentwicklung.

Mit Hilfe des Modells können schließlich unterschiedliche Migrationsverhalten der Zellen qualitativ erklärt werden. In der Simulation können mit entsprechender Parameterwahl die unterschiedlichen Migrationsverhalten qualitativ nachempfunden werden. Um dies zu erreichen, sind interzelluläre Kräfte (durch Adhäsion), mechanische Stimulation gerichteter Bewegung und zufällige Beweglichkeit ausreichend. Effekte durch Chemotaxis oder Proliferation finden nicht statt oder können vernachlässigt werden.

Zusätzlich zu den Parametern auf Gewebeebene, die mit der Datenanalyse ermittelt werden, stellen wir eine Methode vor, mit deren Hilfe aus experimentellen Daten Modellparameter direkt berechnet werden können. Durch synergistisches Zusammenwirken von Modellierung und Datenanalyse können somit zahlreiche für die Migration relevante Parameter bestimmt werden. Es wurde ein effizientes System von Arbeitsabläufen entwickelt, die auch auf weitere Datensätze und an-

dere Zelltypen angewendet werden können.

Der große datenorientierte Teil dieser Arbeit basiert auf intensiver Zusammenarbeit mit experimentellen Kollaborationspartnern und regelmäßiger gemeinsamer Diskussion der Experimente.

Aufbau der Arbeit. Die vorliegende Arbeit ist in sechs Kapitel unterteilt. In Kapitel 1 werden wichtige Grundlagen und Hintergründe der Thematik skizziert; in Abschnitt 1.1 biologische Grundlagen und in Abschnitt 1.2 Ansätze zur Analyse der Zellmigration. Da die Arbeit in hohem Maße datenorientiert ist, folgen in Kapitel 1.3 zunächst detaillierte Beschreibungen der vorliegenden Daten, insbesondere in Abschnitt 1.3.2.2 die Beschreibung von *Scratch-Assay*-Experimenten zur Untersuchung von Zellmigration *in vitro*. In Kapitel 2 werden das verwendete Material und grundlegende Methoden erläutert. Nach kurzer Beschreibung der verwendeten Software in Abschnitt 2.1 werden die Methoden beschrieben, mit denen experimentelle Daten quantitativ analysiert werden und in Abschnitt 2.3 die Grundlagen für unseren Modellierungsansatz skizziert.

In Kapitel 3 werden exemplarisch Ergebnisse der Datenauswertungen vorgestellt, die Ergebnisse des Modellierungsansatzes werden in Kapitel 4 beschrieben und in Kapitel 5 eine Methode vorgestellt, mit deren Hilfe aus Daten auf Gewebeebene einzelzellbasierte Parameter, die die Zellbewegung beeinflussen, inferiert werden können. Den Schluss bildet Kapitel 6, in dem die Ergebnisse und Möglichkeiten zur Erweiterung und zukünftige Arbeitsschritte diskutiert werden.

1.1 Biologische Grundlagen

Dieses Kapitel dient als Einführung in die Thematik und beschreibt kurz die wesentlichen biologischen Grundlagen.

1.1.1 Lungenkrebs

In Wundheilungsprozessen der Haut und anderer Epithelgewebe ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen zellulärer Differenzierung, Proliferation und Zellmigration erforderlich. Typische Eigenschaften von Krebserkrankungen bestehen darin, dass Aktivierung, Deaktivierung und Aufrechterhaltung dieser Prozesse in ihrem typischen Ablauf gestört beziehungsweise aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Aus diesem Grund werden Tumore oftmals als „Wunden, die niemals heilen“ beschrieben [126].

Lungenkrebs entsteht (unter anderem) in Epithelgeweben der Lunge durch unkontrolliertes Wachstum und fehlgesteuerte Zellmigration. Die Anzahl der Todesfälle, die durch Lungenkrebs verursacht werden, ist viel höher als bei anderen Krebsarten. Durch Lungenkrebs sterben mehr Menschen, als durch Brust-, Prostata- und Darm-Krebs zusammen. Dies ist auf das asymptomatische Wachstum und

die schon in frühen Stadien auftretende Metastasierung (*early spread*) von Lungenkrebs zurückzuführen [60].

Die genauen Ursachen und Vorgänge bei der Entstehung von Lungenkreberkrankungen sind kompliziert und bisher nicht umfassend bekannt. Allerdings ist erwiesen, dass Raucher ein massiv erhöhtes Risiko haben, an Lungenkrebs zu erkranken, welches mit der Menge und der Dauer des inhalativen Tabak-Konsums ansteigt. Bei ungefähr 90 Prozent der Lungenkarzinome bei Männern und ungefähr 80 Prozent der Lungenkarzinome bei Frauen wird extensives Rauchen als Auslöser diagnostiziert [60].

Man unterscheidet verschiedene Arten von Tumoren. Eine wichtige Gruppe darunter sind Karzinome, die bösartige Neubildungen (maligne Neoplasie) von Epithelzellen sind. Der Begriff Karzinom leitet sich vom griechischen Wort *καρκινος* (=„Krebs“) ab, etwa 80 Prozent aller bösartigen Tumore sind Karzinome. Eine andere Gruppe bilden die mesenchymalen Tumore (Sarkome) [60].

Je nach Art der entarteten Epithelzellen werden Karzinome weiter in Untergruppen gegliedert, die größten Gruppen sind squamöse Karzinome und Adenokarzinome. Squamöse Karzinome gehen vom Plattenepithel aus und werden deshalb auch als Plattenepithelkarzinome bezeichnet. Adenokarzinome entstehen aus Drüsengewebe. Bei etwa 20 Prozent aller Lungenkreberkrankungen handelt es sich um Adenokarzinome.

Karzinome, die in der Lunge entstehen, werden primäre Lungenkarzinome genannt. Basierend auf dem Aussehen der Zellen unter dem Mikroskop, wird eine Unterscheidung zwischen kleinzelligen Karzinomen (SCLC für *small cell lung cancer*) und nichtkleinzelligen Karzinomen (NSCLC für *non-small cell lung cancer*) getroffen. Neben Brustkrebs und Prostatakrebs ist Lungenkrebs eine der drei häufigsten Tumorarten, die nichtkleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) bilden die größte Gruppe unter den Tumorerkrankungen. Mehr als 85 Prozent aller klinischen Lungenkrebsfälle gehören zu den nichtkleinzelligen Karzinomen.

Maligne Tumorerkrankungen werden basierend auf Kriterien, die von der Internationalen Vereinigung für das Studium von Lungenkrebs (IASLC) vorgeschlagen werden, in TNM-Stadien klassifiziert. In der Abkürzung TNM sind die wichtigsten Kriterien enthalten, nämlich Tumor (Klassifikation nach Verhalten und Aussehen des Primärtumors), Knoten (*Nodes*, Klassifikation nach Auftreten von Lymphknotenmetastasen) und Metastasen (Klassifikation nach Auftreten von (Fern-)Metastasen) [123].

In der aktuellen Medizin werden Karzinome mit verschiedenen Methoden behandelt. In frühen Stadien kann eine oberflächliche Abtragung erfolgen, alternativ kommen Behandlungen durch Strahlentherapie oder Chemotherapie in Frage, in vielen Fällen kann eine operative Entfernung sinnvoll sein. Weitere aktuelle

Therapieansätze haben das Ziel individuell auf Mutationen in Tumorzellen zu reagieren. Durch Weiterentwicklung der DNA-Sequenzierung wurden hierbei in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Die häufigsten in Adenokarzinomen anzutreffenden Mutationen betreffen EGFR, BRAF, KRAS und ALK [155]. Durch gezielte Inhibierung eines onkogenen Signalpfades mit BRAF-Mutation konnte beispielsweise bei einem Patienten mit Melanom zeitweise das Tumorstadium eingegrenzt werden [87].

Die Prognose von Tumorerkrankungen wird gewöhnlich als Fünf-Jahres-Überlebensrate angegeben, die den Anteil der erkrankten Patienten beschreibt, die fünf Jahre nach der Diagnose noch leben. Diese ist für verschiedene Arten von Tumoren unterschiedlich, für Lungenkrebs beträgt sie im Durchschnitt lediglich fünf Prozent. Zudem ist sie in hohem Maße abhängig vom Zeitpunkt der Diagnose und vom Stadium des Tumors bei Diagnose. Wenn ein Patient die ersten typischen Symptome erhält, ist es meistens schon zu spät für eine Behandlung. Etwa 56% der diagnostizierten Lungenkarzinome haben bis zu ihrer Entdeckung bereits Metastasen in anderen Körperregionen gebildet, was in diesem Fall zu einer Überlebensrate von nur 3.6% führt [60]. Wird Lungenkrebs allerdings in einem frühen Stadium, bevor Metastasen gebildet wurden, diagnostiziert, so steigt die Überlebensrate auf 47%. Heutzutage geschieht eine solche frühzeitige Entdeckung allerdings meistens zufällig. Die (zufällige) Entdeckung eines Lungenkarzinoms auf einem Röntgenbild in einem frühen Stadium (Stufe 1) ist schwierig, obwohl Röntgenaufnahmen der Lunge (mit 50% Anteil) die am häufigsten durchgeführten Röntgenuntersuchungen sind [60].

Einer der wichtigsten Prozesse bei der Entwicklung von Lungenkrebs ist die Metastasierung. Hierbei lösen sich einzelne Zellen oder Zellgruppen vom Zellverband ab und migrieren in das umliegende Gewebe. Unser Interesse in dieser Arbeit gilt insbesondere der Zellmigration und der Interaktion von Zellen innerhalb des Gewebes. In gesundem Gewebe sind die Zellen im Gewebeverband an andere Zellen gebunden und migrieren nicht (außer nach Verletzung). Wichtige Prozesse auf Zellebene sind dabei also die Adhäsion der Zellen untereinander und die Migration, die in den folgenden Abschnitten näher erklärt werden.

1.1.2 Zell-Zell-Adhäsion

Adhäsion bezeichnet die physikalische Interaktion zwischen zwei benachbarten Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) oder zwischen einer Zelle und der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion). Zell-Adhäsion entsteht durch das Wirken spezieller Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs). Dazu zählen Selektine, Integrine und Cadherine (abgeleitet vom englischen *calcium adhering*). Zell-Matrix-Adhäsion wird in erster Linie durch Integrine gesteuert [151]; Zell-Zell-Adhäsion hingegen durch Proteine aus der Cadherin-Familie [52]. Zell-Matrix-

Adhäsion kann inzwischen durch hochauflösende Bildgebungsverfahren (*high resolution imaging*) analysiert werden [57], Zell-Zell-Adhäsionskräfte sind allerdings experimentell nicht bestimmbar. Selektive Zell-Zell-Adhäsion bedeutet, dass Zellen eines ähnlichen Typs aneinander haften, während Zellen eines anderen Typs sich separieren.

Für die Bildung und Instandhaltung von Geweben sowie für Zellmigration ist Adhäsion grundlegend wichtig [152]. Bei der Bildung von Organen und Gewebe, die früh während der Embryonalentwicklung geschieht, bewirkt selektive Adhäsion, dass Zellen sich bewegen und zu Mustern formieren, die sich dann zu Geweben und Organen weiterentwickeln. Analog dazu ist selektive Adhäsion auch für den Abbau von Geweben verantwortlich. Die Veränderung der Zelladhäsion in mutierten Zellen ist ein Faktor, der für Invasion und Metastasierung von Tumorzellen wichtig ist [11].

1.1.3 Zellmigration

Die Motilität von Zellen ermöglicht Bildung und Instandhaltung von Organen und Gewebe, ist wichtig im Kampf gegen Krankheiten und der wichtigste Faktor in der Wundheilung [8]. Zellmigration kann aber auch negative Auswirkungen haben. Beispielsweise entsteht die Bildung von Metastasen von Tumoren durch die Fähigkeit der (Tumor-)Zellen vom Primärtumor (*Primarius*) in das Gefäßsystem oder Lymphsystem zu wandern und sich gegebenenfalls in anderen Regionen niederzulassen [36]. Das Migrationsverhalten der Zellen hängt vom Zelltyp ab, nicht alle Zellen haben die gleiche Grundmotilität. Beispielsweise gibt es Arten von Zellen des Immunsystems, die *in vivo* quasi ständig in Bewegung sind, wie durch intravitale Mikroskopie aufgezeigt werden konnte [53]. Dass eine ruhende Zelle beginnt sich zu bewegen, kann zahlreiche Gründe haben. Bei der Wundheilung wird Migration durch Kontaktinhibierung von benachbarten Zellen und durch mechanischen Stress angeregt, zusätzlich spielt Aktivierung über das Immunsystem eine Rolle. Migration kann aber auch durch Signalübertragung von Wachstumsfaktoren angeregt werden, siehe Abschnitt 1.1.4. Die offensichtlichste und am meisten untersuchte Art der Zellbewegung ist Chemotaxis. Hierbei haben Zellen die Fähigkeit Konzentrationsgefälle eines gelösten Signalstoffes wahrzunehmen und ihre Bewegung auszurichten. Es wird zwischen positiver Chemotaxis (Bewegung zu einem Lockstoff hin) und negativer Chemotaxis (Bewegung von einem Schreckstoff weg) unterschieden. Auf eine Änderung in der chemischen Zusammensetzung des Substrates folgt laut Experimenten eine sofortige migratorische Reaktion der Zellen [161]. Eine gesonderte Form der Chemotaxis ist die Nekrotaxis, bei der Migration zu Botenstoffen, die von apoptotischen (nekrotischen) Zellen ausgestoßen werden, geschieht. Bei der Haptotaxis kommt im Unterschied zur Chemotaxis Migration durch Konzentrationsgefälle eines strukturgebundenen Signalstoffes (Haptotaxin) anstelle eines gelösten Signalstoffes zustande. Zellmigration, die

durch die Steifheit des Substrates gesteuert wird, nennt man Mechanotaxis oder Durotaxis. Hierbei migrieren Zellen laut Experimenten bevorzugt von weichen zu harten Substraten (siehe zum Beispiel [86]). Ein weiterer Grund für Zellmigration ist beispielsweise Galvanotaxis beziehungsweise Elektrotaxis. Hierbei findet Bewegung zu einem der Pole in einem elektrischen Feld statt [160].

Obwohl Zellmigration der vermeintlich am leichtesten sichtbare Prozess ist, den eine lebende Zelle aufweisen kann, ist er sehr kompliziert. Bei der Migration ist praktisch die gesamte Zelle involviert, zahlreiche Makromoleküle und Organellen spielen eine Rolle und ein Zusammenspiel von vielen chemischen und mechanischen Aktivitäten ist erforderlich [156].

1.1.3.1 Das Zytoskelett

Die Migration kommt durch Umordnungsprozesse im mechanischen Zytoskelett der Zelle zustande. Weil das Zytoskelett eine wichtige Rolle spielt, wird es an dieser Stelle kurz beschrieben. Als Zytoskelett wird das aus Proteinen gebildete Netzwerk im Zytoplasma eukaryotischer Zellen bezeichnet. Es setzt sich aus Filamenten (dünnen, fadenförmigen Zellstrukturen) zusammen, die in drei Gruppen unterteilt werden: Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Mikrotubuli sind röhrenförmig und mit einem Durchmesser von ca. 20-30 nm die größten Filamente, Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von ca. 10 nm und Aktinfilamente einen Durchmesser von 6-7 nm. Mikrofilamente bestehen hauptsächlich aus dem Strukturprotein Aktin, weswegen sie auch Aktinfilamente genannt werden. Aktin kann von so gut wie allen eukaryotischen Zellen gebildet werden und liegt in der Zelle entweder als Monomer (G-Aktin beziehungsweise *globular actin*) oder als Kette von Aktinmonomeren (F-Aktin) vor. Bei der Polymerisierung zu dieser filamentösen Form wird ATP durch Abspaltung eines Phosphatrestes zu ADP umgewandelt. Dieser Prozess verbraucht also Energie. Die Polymerisierung von Aktin wird überwiegend von Rho-GTPasen wie RHO, RAC und CDC42 gesteuert [81] [122] [41]. Aktinfilamente sind polar, ihre beiden Enden haben also grundsätzlich verschiedene Eigenschaften. Typischerweise wachsen Aktinfilamente bevorzugt am sogenannten (+)-Ende (*barbed end*) und schrumpfen am (-)-Ende (*pointed end*) [5] [15].

1.1.3.2 Ablauf der (individuellen) Zellbewegung

Wenn eine einzelne Zelle eine gerichtete Bewegung ausführt, werden vier Schritte durchlaufen. Zunächst wird durch eine Kraft, die durch Polymerisierung von Aktin entsteht, ein Fortsatz (Vorstülpung, *protrusion*) des vorderen Zellpols gebildet. Im zweiten Schritt adhäriert diese an das freie Substrat (in der Richtung, in der die Bewegung stattfindet), woraufhin eine Kontraktion des Zellkörpers statt-

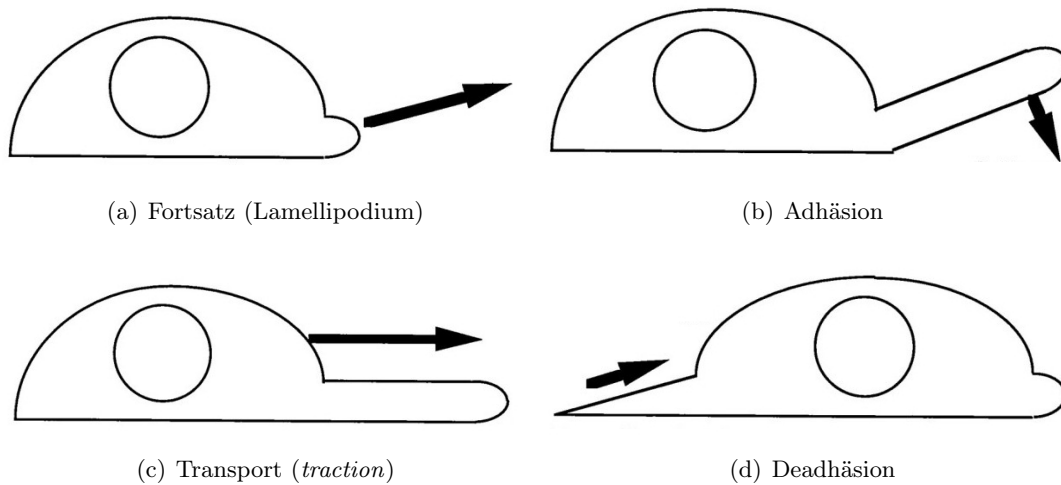


Abbildung 1.2: **Schritte bei der individuellen Zellmigration in 2D.** Die Darstellung hier basiert auf der Abbildung in [100].

findet (dritter Schritt). Diese führt im letzten Schritt dazu, dass sich der hintere Teil der Zelle vom dortigen Substrat löst (Deadhäsion), was zu einer Bewegung der Zelle führt [100]. Für diese Prozesse ist eine vorübergehende Polarisierung der Zelle erforderlich, in der eine Front mit Lamellipodium und stärkerer Adhäsion, sowie eine Rückseite mit schwächerer Adhäsion entstehen beziehungsweise koexistieren. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 1.2 illustriert. Die Abfolge dieser Schritte wird häufig als Motilitäts-Zyklus (*motility cycle*) bezeichnet.

Es gibt zahlreiche Literatur, die allgemein die Geschehnisse bei der Entstehung von Migration beschreibt (siehe zum Beispiel [59], [35], [83], [36]): für detaillierte Beschreibungen der Abläufe sei dorthin verwiesen. In dieser Arbeit interessieren wir uns speziell für kollektive Zellmigration, auf die wir im nächsten Abschnitt weiter eingehen.

1.1.3.3 Kollektive Zellmigration

Die bislang am umfassendsten studierte Art der Zellbewegung ist die individuelle Migration von Einzelzellen [125] [40]. Viele Zelltypen - insbesondere invasive Tumorzelllinien - bewegen sich aber nicht individuell, sondern führen unter bestimmten Bedingungen kollektive Migration durch. Migration wird als kollektiv bezeichnet, wenn Zellen sich in Gruppen gemeinsam bewegen und sich gegenseitig durch mechanische Kräfte und durch Signalverarbeitung in ihrem Migrationsverhalten beeinflussen. Ähnlich zu individueller Migration von Einzelzellen wird kollektive Migration durch Polarisierung, Polymerisierung von Aktin und Kontraktion gesteuert. Die vier oben beschriebenen einzelnen Schritte der individuellen

Migration bleiben bei kollektiver Migration erhalten. Der größte Unterschied im Vergleich zur individuellen Bewegung einzelner Zellen liegt darin, dass die Zellen durch Zell-Zell-Verbindungen sowohl an der Migrationsfront, als auch in dahinter liegenden Regionen des sich bewegenden Zellverbandes verbunden bleiben [127] [39].

Kollektive Migration kann in verschiedenen Situationen, insbesondere bei der Wundheilung auftreten. Sie kann ein Gewebe intakt halten oder ausbessern, oder durch Beeinflussung von migrierenden Zellen eine geeignete Zellverteilung erreichen und Gewebe formen. Des Weiteren können durch kollektive Migration mobiler Zellen immobile Zellarten mitgerissen werden und es können kollektive Entscheidungen getroffen werden, zum Beispiel die des Wundschlusses [38]. Kollektive Migration ist also ein Beispiel, dass ein multizellulärer Organismus nicht nur eine Gruppe von individuellen Zellen ist, sondern durch Zusammenwirken von voneinander abhängigen Zellen profitiert [128].

Prozesse, bei denen kollektive Migration eine wichtige Rolle spielt, sind *Sprouting*, *Branching* und Sheet-Migration. *Sprouting* bezeichnet die Formation eines multizellulären, sich bewegenden Auswuchses aus einer existierenden Zell-Struktur, wobei die Zelle an der Spitze (*tip cell*) mit den ihr folgenden Zellen in Kontakt bleibt [128]. Unter *Branching* versteht man das Wachstum und die Formation einer großen Gruppe von Zellen, wobei es im Gegensatz zum *Sprouting* nicht nur eine *tip cell* gibt. Hierdurch entstehen verzweigte, und teils recht komplizierte, Strukturen, wie beispielsweise Glomeruli in der Niere [128].

Die in unserer Anwendung relevante Art von kollektiver Migration ist Sheet Migration in 2D, also Migration einer Monolage von Zellen, die sich als Gewebe fortbewegen; siehe auch Abbildung 1.3, in der die Vorgänge der Sheet-Migration bei Wundheilung in 2D illustriert sind. Dabei weisen Zellen koordinierte Motilität mit Korrelation in Geschwindigkeit und Richtung auf, die über mehrere Zell-Durchmesser reichen kann [32] [154]. Wenn es freie Substratfläche gibt, findet gerichtete Bewegung in dieser Richtung statt. Die Zellen lösen sich nicht voneinander ab und es bildet sich eine klar abgrenzbare Front des sich bewegenden Gewebes. In einer Gruppe von sich bewegenden Epithelzellen wirken stärkere mechanische Kräfte als bei einer einzelnen Zelle [29]. Primärzellen und Zelllinien von Epithelzellen führen Sheet-Migration durch, wenn ein Spalt beziehungsweise eine künstliche Wunde in einer konfluenten Einzelzellschicht erzeugt wird, wie es in *Scratch-Assays* (siehe Abschnitt 1.3.2.2) praktiziert wird. Auf das Erzeugen einer künstlichen Wunde folgt eine instantane Reaktion auf die Verletzung der Zellen und die mechanische Stimulation. Die Zellen reagieren auf das Verschwinden der räumlichen Einengung durch plötzlich verfügbare freie (Substrat-)Fläche mit einem erhöhten Migrationsphänotyp [109] [118]. Letzteres ist Studien zufolge alleine ausreichend, um Sheet Migration hervorzurufen [118]. Zellproliferation kann in dieser Situation durchaus auftreten und eine Rolle spielen, jedoch ha-

ben verschiedene Studien gezeigt, dass Proliferation für den Spaltschluss nicht notwendig ist und experimentell davon getrennt werden kann [154] [118]. Um sicher zu gehen, dass keine Proliferationseffekte involviert sind, werden in manchen Experimenten die Zellen mit proliferationsinhibierenden Substanzen behandelt.

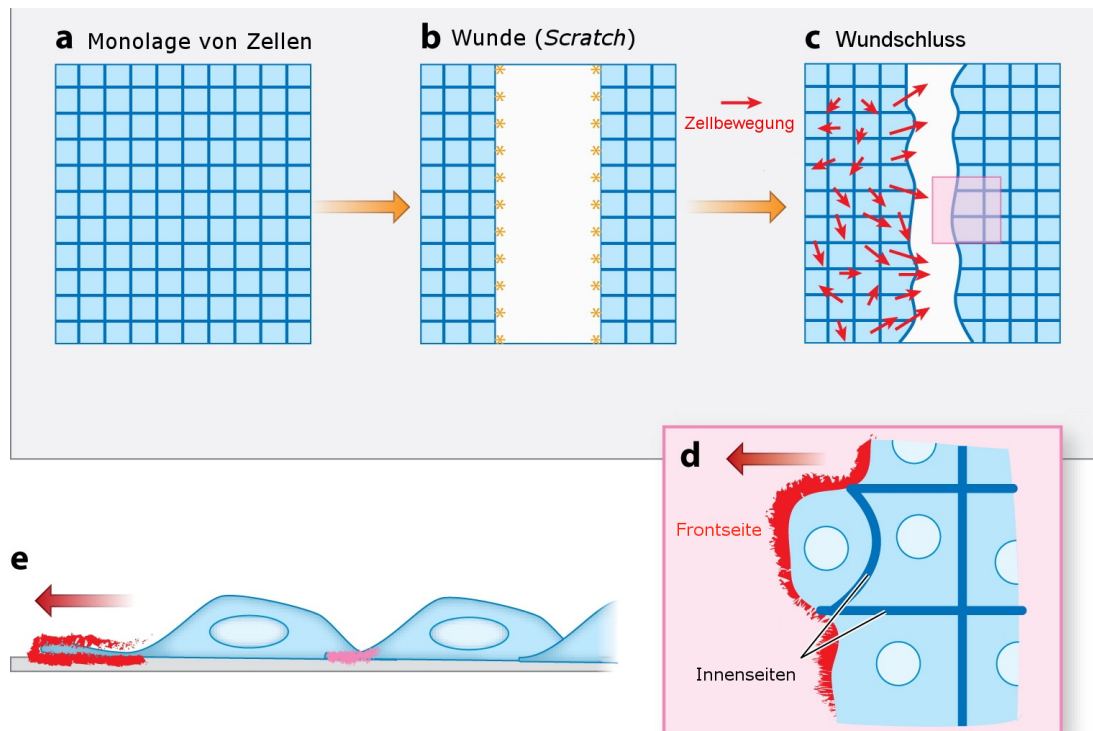


Abbildung 1.3: **Vorgänge bei der Sheet Migration in 2D.** a) Konfluente Monolage von Zellen; b) Künstliche Wunde, die in der Zellpopulation erzeugt wird; c) Wundschluss durch Sheet Migration, rote Pfeile indizieren die Bewegung einzelner Zellen; d) Vergrößerung des Bereiches an der Front; e) Seitenansicht der Zellen: Frontzellen bilden Lamellipodien in Richtung der freien Fläche, Zellen im Hintergrund können ebenfalls (kleinere) Lamellipodien bilden. Das Bild ist abgeändert nach [128].

1.1.3.4 Koordination und *Leader*-Zellen

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von kollektiver Migration ist die Koordination von benachbarten Zellen [118] [154]. In [154] findet sich eine hilfreiche Übersicht über die stattfindenden Prozesse, insbesondere über den Beitrag von individuellen Zellen zur Gesamtbewegung im Sheet. Signifikante mechanische Verbindungen zwischen den Zellen und starke Zell-Zell-Adhäsion führen zu Koordination, ohne dass dafür chemische Lockstoffe nötig sind. Dass die Koordination nicht immer „perfekt“ ist und die Geschwindigkeitsfelder der Zellen im Hintergrund

nicht gleichförmig sind, stützt die Beobachtung, dass jede Zelle einen individuellen Beitrag zur Migration leistet [32]. Geschwindigkeitskorrelationen erfordern nicht zwangsläufig feste Nachbarschaftsstrukturen der Zellen, die während der Migration in sich bestehen bleiben. In [154] wurde systematisch das Verhalten von Zellen bei kollektiver Migration von HUVEC-Endothel-Zellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) studiert, die mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) stimuliert wurden. Dort wurde beobachtet, dass es trotz eines vorherrschend kollektiven Migrationsphänotyps vorkommt, dass einzelne Zellen an anderen vorbeilaufen und sich also die Nachbarschaftsstrukturen ändern. Passend dazu wurde bei kollektiver Migration von *Madin-Darby canine kidney* (MDCK)-Zellen beobachtet, dass die Cadherin-Verbindungen dynamisch sind und relative Positionsänderungen der Zellen im Gewebe ermöglichen [66]. In [113] wurde ermittelt, dass trotz dynamischer Restrukturierungen die groben Nachbarschaftsstrukturen von MDCK-Zellen während der Migration typischerweise für zumindest 15 Stunden erhalten bleiben.

Wie kommt es nun dazu, dass Zellen sich gemeinsam und koordiniert bewegen? Die zwei am weitesten verbreiteten klassischen Annahmen dazu sind einerseits, dass die Erzeugung von Kräften auf die ersten wenigen Zellreihen an der Front beschränkt seien, und andererseits, dass alle Zellen in der Monolage einen gleichmäßigen mechanischen Selbstantrieb haben. Beide Szenarien können allerdings die Prozesse beim Spaltschluss nicht akkurat beschreiben, wie in [135] gezeigt wurde. Vielmehr spielt die Stimulation zur aktiven Bewegung durch mechanischen Zug [157] oder durch Platz [16] eine Rolle. Ein wichtiger Punkt ist die aktive gerichtete Bewegung jeder einzelnen Zelle. Durch Einzel-Zell-Tracking konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zellen an der Front, als auch die Zellen, die sich weiter hinten im *Sheet* befinden, aktiv beweglich sind. Zudem wurde festgestellt, dass auch Zellen im Hintergrund zelluläre Lamellipodien bilden, wenngleich weniger eindeutig als die Zellen an der Front [33] [32] [118] [154]. Zusätzlich zur Eigenbewegung der Zellen bedarf es der Kommunikation zwischen den Zellen um koordinierte Bewegung zu ermöglichen. Eine Komponente hierbei ist die mechanische Interaktion benachbarter Zellen. Es ist bekannt, dass durch mechanisches „Ziehen“ der Zellen an der Front, Zellen im Hintergrund als Reaktion auf mechanischen Stress polarisiert werden [76]. Darüber hinaus spielen hier chemische Komponenten eine Rolle, zum Beispiel Wellen von ERK-Aktivierung, siehe Abschnitt 1.1.4 für weitere Details.

Die intensivste Bildung von Lamellipodien und die höchste Bewegungs-Aktivität weisen die Zellen an der Front auf. Besonders aktive Front-Zellen werden als *Leader*-Zellen oder seltener auch als Pionier-Zellen deklariert [110] [118] [154]. In der Regel sind *Leader*-Zellen deutlich größer und länger als andere Zellen. Experimentelle Studien ergaben, dass *Leader*-Zellen tatsächlich mit Zellen im Hintergrund interagieren und deren Bewegung beeinflussen, und zwar über Distanzen von bis

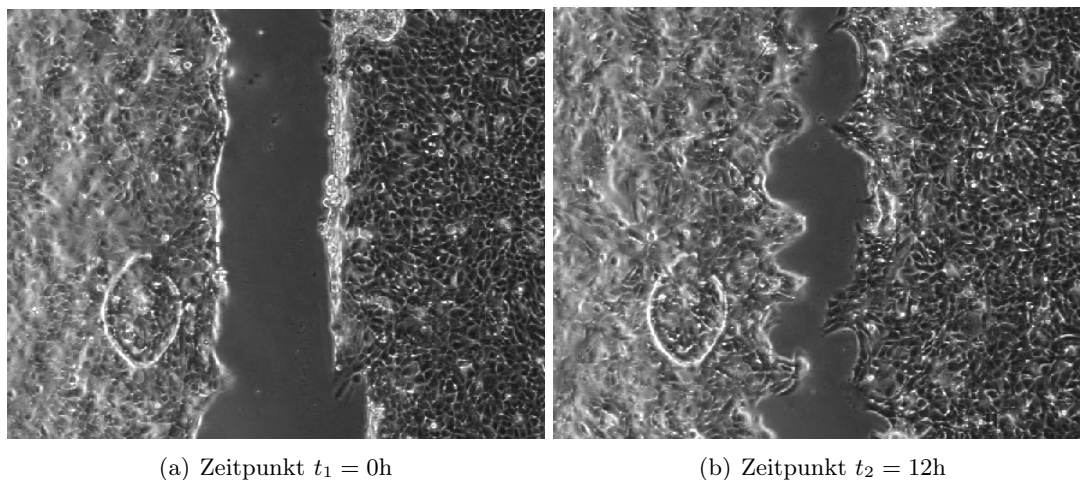


Abbildung 1.4: **Bildung von Fingern in experimentellen Daten.** Im Bild zu sehen sind Zellen der Zelllinie H1975 stimuliert mit insulinähnlichem Wachstumsfaktor (IGF).

zu $200\mu\text{m}$ [118]. Das bedeutet aber nicht, dass die folgenden Zellen komplett passiv sind. Die *Leader*-Zellen geben einen Stimulus und die Folgezellen bewegen sich daraufhin aktiv. Die Zugkraft, die von *Leader*-Zellen generiert wird, reicht aus, um Zellen fünf bis zehn Reihen hinter der Migrationsfront zu ziehen und ihre Persistenz zu koordinieren [154]. *Leader*-Zellen sind häufig an der Spitze von in Richtung des freien Substrates weisenden „Fingern“ auszumachen [113]. Bevor Zellen zu *Leader*-Zellen werden, sind sie nicht von anderen Zellen zu unterscheiden, das heißt sie gleichen anderen Zellen in Größe und (zufälliger) Bewegung. Ein Beispiel für die Bildung von „Fingern“ in unseren Daten ist in Abbildung 1.4 zu sehen. Weitere detaillierte Beschreibungen des typischen Phänotyps von *Leader*-Zellen finden sich beispielsweise in [118]. *Leader*-Zellen unterscheiden sich allerdings nicht nur äußerlich von anderen Zellen. In MDCK-Zellen wurde eine starke Aktivierung der kleinen GTPase RhoA festgestellt, wobei Inhibierung von Rho zwar die Bildung von Fingern verhinderte, aber nicht die Migration an sich [124].

Die Differenzierung zu einer *Leader*-Zelle wird durch extrazelluläre Einflüsse, insbesondere durch Wachstumsfaktoren und von ihnen ausgelöste Signalkaskaden eingeleitet [71]. In HUVEC-Zellen wurde beobachtet, dass durch Stimulation aller Zellen mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) einzelne Zellen an der Migrationsfront (durch Kombination von Wirkung des Wachstumsfaktors und exponierter Lage) zu *Leader*-Zellen wurden [154].

1.1.3.5 *Epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT)

Da kollektive Zellmigration mit intakten Zell-Zell-Kontakten assoziiert ist, spiegelt die Abgrenzung zwischen kollektiver und individueller Migration auch Unterschiede im Verhalten von Epithelzellen und mesenchymalen Zellen wider. Der Übergang vom Verhalten von Epithelzellen zum Verhalten von mesenchymalen Zellen wird als *Epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) bezeichnet [128]. Die Umkehrung davon wird *Mesenchymal-to-epithelial transition* (MET) genannt [38]. EMT bedeutet die Abtrennung von einzelnen Zellen von einer Epithelschicht, die durch Herunterregulation von Zell-Zell-Verbindungen entsteht. Vollständige EMT bewirkt folglich individuelle Migration, die zur Metastasierung von Tumoren führen kann. Unvollständige EMT resultiert in kollektiver Migration [128] [13]. Die Herunterregulierung der Zell-Zell-Verbindungen wird durch Verlust von E-Cadherin bewirkt, weswegen E-Cadherin als führender Regulator von kollektiven Zell-Zell-Interaktionen angesehen wird, wessen Verlust nicht durch andere Zell-Zell-Adhäsions-Signalfade ausgeglichen werden kann [38] [79] [146]. In Krebszellen wird diese Herunterregulierung von E-Cadherin durch Signalübertragung von Wachstumsfaktoren und den MAPK-Signalfad begünstigt [38] [79]. Der Phänotyp der EMT ist mit der Überlebensrate von Patienten assoziiert: Komplette EMT führt zu einer schlechten klinischen Prognose bei Patienten mit *small intestinal adenocarcinomas* (SICA) [72].

1.1.4 Signalverarbeitung

Bei Lungenkrebs sind Signalwege, die durch Enzym-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert werden, von großer Bedeutung. Viele extrazelluläre Signalproteine leiten ihre Signale über Rezeptortyrosinkinase weiter. An diese Rezeptoren können Wachstumsfaktoren binden, wodurch im inneren Teil der Zelle ein Tyrosinrest eines Proteins phosphoryliert und dadurch der Signalweg aktiviert wird. Wachstumsfaktoren regen das Zellwachstum an, indem sie die Synthese von Proteinen und anderen Makromolekülen unterstützen und gleichzeitig deren Abbau hemmen [5].

In den folgenden Abschnitten beschreiben wir kurz die für die in dieser Arbeit untersuchten Experimente relevanten Wachstumsfaktoren und Signalwege.

1.1.4.1 Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF)

Der Hepatozytenwachstumsfaktor (*Hepatocyte growth factor*, HGF), der auch unter dem Namen *Scatter Factor* (SF) bekannt ist, ist ein parakriner zellulärer Wachstumsfaktor, der Zellmigration und Proliferation anregt. Er wird von mesenchymalen Zellen gebildet. In MDCK-Zellen bewirkt HGF die Aufhebung von Zell-Zell-Adhäsion und erhöht die Zell-Motilität [20]. In Tumoren kann HGF zu aggressivem Wachstum und zur Bildung von Metastasen beitragen. Aus diesem

Grund wird in vielen Studien durch verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren untersucht, wie sich eine Blockade von HGF auf das Zellverhalten auswirkt [97] [139] [107].

Der HGF-Rezeptor Met löst eine Reihe von *Downstream*-Signalpfaden aus. Diese Signalpfade übertragen biochemische Informationen von der Zellmembran, an der sich Met befindet, zum Nukleus, wo die Regulierung von Gen-Expression geschieht. Im Folgenden beschreiben wir die wichtigsten Met-regulierten Signalpfade.

MAPK/ERK-Kinase-Signalpfad. Der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalpfad umfasst verschiedene mehrstufige Signaltransduktionswege, die auch in die Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes (Apoptose) involviert sind. Die Signalwege sind mindestens drei in Reihe geschaltete Kinasen: eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K oder MAP-KKK), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K oder MAP-KK) und eine MAP-Kinase (MAP-K), die in dieser Reihenfolge aktiviert (phosphoryliert) werden. Eine solche Abfolge von Ereignissen, bei denen ein Enzym ein anderes phosphoryliert, wird auch als Phosphorylierungskaskade bezeichnet.

MAPK-Signalpfad Der Signalpfad beginnt mit der Bindung eines Wachstumsfaktors (zum Beispiel HGF oder EGF) an einen Rezeptor aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Die Bindung führt zur Dimerisierung von zwei Untereinheiten einer Rezeptortyrosinkinase. Rezeptortyrosinkinasen haben einen enzymatisch aktiven Kinasebereich auf der Innenseite der Membran, der die Phosphorylierung (auch von der anderen Untereinheit) katalysiert.

Das Protein GRB2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein, Abkürzung für *growth factor receptor bound protein*) ist in der Lage, an den phosphorylierten Rezeptor zu binden. Zu diesem Protein bindet SOS, das nach seinem Homolog *Son-of-Sevenless* aus *Drosophila* benannt wurde. SOS kann dann an das membrangebundene Protein RAS binden. Dieses Protein trägt in seinem inaktiven Zustand das Nukleotid Guanosindiphosphat (GDP). SOS katalysiert nun den Austausch des RAS-gebundenen GDP gegen Guanosintriphosphat (GTP). Durch diesen Austausch wird das RAS-Protein aktiviert. Im aktiven GTP-gebundenen Zustand, kann Ras an seine Effektor-Proteine binden und diese aktivieren. Ein wichtiges Effektor-Protein ist die Kinase BRAF. Aktives BRAF phosphoryliert und aktiviert die Kinasen MEK1 und MEK2, die wiederum die Kinasen ERK1 und ERK2 phosphorylieren. Die Kaskade endet schließlich mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren JUN und FOS. Sobald sie aktiviert sind, migrieren JUN und FOS in den Nukleus, wo sie als Heterodimer an das AP1-Motiv binden. Diese Bindung wiederum aktiviert die Expression zahlreicher Gene, zum Beispiel

Wachstumsfaktoren, Zykline und Zytokine. Konsequenz hiervon ist die Aktivierung der Zellteilung.

Um eine permanente Aktivierung des MAPK-Signalpfades und beständige unkontrollierte Effekte zu verhindern, wird das aktive RasGTP-Protein durch das GTPase-activating protein (GAP) deaktiviert, das an RasGTP bindet.

Die Signalübertragung des MAPK-Signalpfades kann durch Ausübung mechanischen Stresses aktiviert werden, wie für Keratinozyten und Melanozyten gezeigt wurde [75] [73]. In MDCK-Zellen wurden sogar „Wellen“ von ERK-Aktivierung nachgewiesen, die an der Migrationsfront starten und durch die Zellschichten nach hinten transportiert werden [93]. Diese werden von $TGF\beta$ aktiviert [19].

Diese Wellen sind mit der Aktivierung von Migration verbunden. Inhibierung von MEK oder der Tyrosinkinase Src, die ERK1/ERK2-Signalübertragung einleiten, führt zu einer Reduktion der Migration. Inhibierung von Aktin hingegen, die die *Sheet*-Migration unterbindet, unterdrückte ebenfalls die Wellen von ERK-Aktivierung [93].

Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalpfad. Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) sind Enzyme, deren Aktivität in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und in einer Vielzahl von wichtigen zellulären Funktionen, einschließlich Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Adhäsion [84] [129]. Der PI3K/AKT-Signalpfad besteht aus zahlreichen Aktivatoren, Inhibitoren, Effektoren und *second messengern*. Die PI3-Kinase kann direkt durch MET oder indirekt durch RAS aktiviert werden. In der zweiten Phase des Signalwegs wird der *second messenger* Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3) gebildet, der anschließend die Serin-Threonin-Kinase AKT aktiviert. Die aktive PI3-Kinase bindet an der Innenseite der Zellmembran an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) [5]. Die PIP3-aktivierte Kinase AKT ist ein Proto-Onko-Protein, dessen bekanntester Effekt die Blockierung des programmierten Zelltodes (Apoptose) ist. AKT bindet an BAX und verhindert, dass dieses Protein Lücken in der äußeren Membran der Mitochondrien verursacht. Diese Lücken führen - in Abwesenheit von AKT - zur Apoptose. AKT hemmt Apoptose weiterhin durch Deaktivierung des pro-apoptischen Proteins *BCL-2-antagonist of cell death* (BAD) und durch Aktivierung der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase MDM2, die die Reduktion des pro-apoptischen Proteins p53 ermöglicht.

1.1.4.2 Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

Der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ist ein Wachstumsfaktor, der Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung stimuliert [17]. EGF agiert durch Bindung an den *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Durch diese Bindung wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die zu einer

Vielzahl von biochemischen Veränderungen in der Zelle führt, darunter ein Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels, erhöhte Glykolyse und Proteinsynthese und eine erhöhte Expression von bestimmten Genen, einschließlich des Gens für EGFR. Die biochemischen Veränderungen führen schließlich zur DNA-Synthese und Zellproliferation.

1.1.4.3 Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF)

Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) sind Proteine mit hoher Sequenzähnlichkeit zu Insulin und werden vorwiegend in Leberzellen gebildet. Die IGFs binden an den IGF-1-Rezeptor, den IGF-2-Rezeptor und möglicherweise an andere Rezeptoren. IGF1 hat Einfluss auf die Entwicklung von Krebserkrankungen, da es die Proliferation fördert und den Zelltod (Apoptose) hemmt [5] [140].

1.2 Ansätze zur Analyse kollektiver Zellmigration

1.2.1 Experimentelle Ansätze

Um die Vorgänge bei kollektiver Migration zu analysieren, existieren zahlreiche experimentelle Ansätze sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Ein weit verbreiteter experimenteller Ansatz *in vitro* ist der *Scratch-wound-assay* [21] [82]. Dieser ist ein Versuchsaufbau, der Analysen der kollektiven Bewegung von konfluenten Monolagen von Zellen in zwei Dimensionen ermöglicht. Hierbei wird in einer konfluent gezüchteten Monolage von Zellen eine künstliche Wunde erzeugt. Eine Möglichkeit, diese Wunde zu erzeugen, ist das Ziehen einer Pipettenspitze durch eine konfluente Monolage von Zellen, wobei in der Mitte ein zellfreier Spalt freigekratzt wird. Daher kommt der Name „*Scratch-Assay*“. Alternativ kann durch Einsetzen eines Inserts (siehe Abbildung 1.5) ein klar definierter Spalt zellfrei gehalten werden.

Ein Vorteil von *Scratch-wound-assays* gegenüber anderen Migrationsexperimenten ist, dass sie vom Aufbau her recht einfach und leicht reproduzierbar sind, sowie ohne chemische Lockstoffe auskommen. Sie erzeugen starke gerichtete Migration auch in Zelltypen, die stark adhärieren, und die in Einzel-Zell-Migrations-Experimenten keine robusten Reaktionen zeigen [21]. *Scratch-Assays* sind eine vergleichsweise günstige Methode, um Zellmigration *in vitro* zu studieren und sie sind vielfältig erprobt [82]. Insbesondere sind sie gut geeignet, um Einflüsse von Zell-Zell-Interaktionen und von der Zellmatrix zu studieren, da sie Zellmigration bei der Wundheilung *in vivo* imitieren [82]. Beispielsweise ist bekannt, dass durch Entfernen eines Teils des Endothels in Blutgefäßen, Migration von Endothelzellen in die frei gewordene Wundfläche beginnt [58]. Experimentelle Daten aus *Scratch-wound-assays* bilden die Grundlage für den datenorientierten Teil dieser Arbeit.



Abbildung 1.5: **Insert für *Scratch-Assay***. Das Bild wurde übernommen von [62].

Zellmigration in 3D kann *in vitro* untersucht werden, indem zum Beispiel Sphäroide in eine gelartige Matrix eingebettet werden, die der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix entspricht. Die vertikale und horizontale Invasion und Migration der Zellen kann dann analysiert und bestimmt werden [159] [42].

Um kollektive Zellmigration *in vivo* zu analysieren, können sich entwickelnde Embryonen verschiedener Spezies studiert werden, wobei verschiedene Formen von kollektiver Migration zu beobachten sind. Die meisten Erkenntnisse wurden hierbei bislang von *Drosophila melanogaster* und von Zebrafischen gewonnen [38]. Die kollektive Invasion von Tumorzellen konnte erstmals in einer Studie nachgewiesen werden, in der 3D-Sphäroide in die Dermis von Mäusen (*Mus musculus*) eingesetzt wurden und durch ein Sichtfenster (*window chamber*) beobachtet wurden [6].

Im Vergleich zu *in vitro*-Modellen bieten *in vivo*-Modelle realistischere Erkenntnisse in Bezug auf klinische Relevanz, aber (einfachere) *in vitro*-Modelle können leichter analysiert werden, zum Beispiel durch Analyse auf molekularer Ebene. Eine gute, detailliertere Übersicht über die experimentellen Ansätze zur Erforschung von kollektiver Migration findet sich beispielsweise in [38], Tabelle 1.

Bei kollektiver Migration werden von den Zellen Zugkräfte auf die Oberfläche ausgeübt. Diese können in einem experimentellen Verfahren namens *Traction Force Microscopy* (TFM) gemessen werden. Die Zugkräfte werden hierbei durch Messung von Verschiebungsfeldern des Substrates *in vitro* bestimmt. Auf diese Weise können auch Korrelationen berechnet werden, aber keine interzellulären Kräfte. Im Gegensatz zur weit verbreiteten Meinung, dass Zugkräfte nur in *Leader*-Zellen auftreten [39], [118], [47], [110], konnten Trepats *et al.* ([148]) durch *Traction Force*

Microscopy erstmals in MDCK-Zellen nachweisen, dass Zugkräfte nicht nur an der Front auftreten, sondern dass auch mehrere Zellreihen hinter der Front starke Zugkräfte auftreten und sich über große Gebiete erstrecken. Der lokale Durchschnitt der gemessenen Zugkräfte war an der Front am größten und nahm mit der Entfernung zur Front ab.

1.2.2 Mathematische Modellierung von (kollektiver) Zellmigration

Um den Prozess der Zellbewegung besser verstehen zu können, ist es hilfreich, mathematische Modelle zu dessen Beschreibung zu formulieren. Mit geeigneten Modellen ist es dann durch die Wahl von Parametern möglich, die Migration unter verschiedenen Bedingungen zu simulieren und die Ergebnisse zu studieren [35].

Das erste integrative Modell für Zellmigration wurde 1978 von M. Abercrombie in seiner *Croonian Lecture* vorgestellt und basierte auf vereinzelt experimentellen Beobachtungen [1] [24]. Es handelte sich nicht um ein mathematisches Modell, sondern beschrieb die Zellmigration als einen Ablauf von vier separaten aber miteinander verknüpften Prozessen (vgl. Abschnitt 1.1.3.2). Auf das Modell von Abercrombie folgte eine Reihe von mathematisch formulierten Modellen um die Dynamik der Bildung von Lamellipodien an der Vorderkante (*leading edge*) einer Zelle durch Polymerisierung von Aktin zu quantifizieren. Mit Hilfe dieser Modelle konnte zum Beispiel erforscht werden, auf welche Weise bei der Bildung von Lamellipodien Kräfte gegen die Zellmembran erzeugt werden. Die Fähigkeit einer Zelle ein Lamellipodium zu bilden, hängt laut Mogilner *et al.* direkt von der Anzahl von (+)-Enden an der Vorderkante einer Zelle ab [101]. Gibt es zu wenige polymerisierte Filamente an der Vorderkante, kann kein Lamellipodium gebildet werden, das stark genug ist, um ausreichend Kraft gegen die Zellmembran auszuüben. Gibt es andererseits zu viele polymerisierte Filamente an der Vorderkante, so wird die Geschwindigkeit der Bildung des Lamellipodiums durch einen Mangel an verfügbaren Aktinmonomeren verlangsamt [101]. Ein weiteres Ergebnis, das diese Modelle lieferten, ist, dass Filamente vorzugsweise in 35° (relativ zur Richtung des Lamellipodiums) wachsen [90]. Diese Modelle, die sich auf die Dynamik von Lamellipodien konzentrieren, sind gut geeignet, um die Dynamik innerhalb der Zelle und die Fortbewegung von einzelnen Zellen zu beschreiben. Allerdings können Interaktionen von Zellen durch Kräfte oder Dichteänderungen hier nur schwer erfasst werden. Dafür besser geeignet ist eine Klasse von Modellen, die die Migration ganzheitlicher betrachten. Deren Ziel ist also, eine vereinfachte Darstellung des gesamten Motilitäts-Zyklus in ein einziges Modell einzugliedern. Im Wesentlichen können diese in Migrationsmodelle, in denen einzelne Zellen als Agenten modelliert werden, und in kontinuierliche Modelle unterteilt werden.

Agentenbasierte Modelle. Modelle einer Zellpopulation, in denen jede Zelle als einzelnes Objekt beziehungsweise als „Agent“ modelliert wird, werden als Agentenmodelle beziehungsweise agentenbasierte Modelle (ABM) oder als *individual based models* (IBM) bezeichnet [35]. In einem ABM sind die Zellpositionen entweder auf diskrete Gitterpunkte beschränkt (*lattice-based models*) oder sie können beliebige Positionen in einem kontinuierlichen Raum einnehmen (*off-lattice models*). In einem gitterbasierten Modell wird in der Regel angenommen, dass sich an jedem Gitterpunkt jeweils nur eine Zelle gleichzeitig befinden kann. Zellbewegung wird dann durch die Übergangswahrscheinlichkeit charakterisiert, dass eine Zelle von einem Gitterpunkt zu einem anderen springt. In einem gitterbasierten Agentenmodell können Effekte von Zell-Zell-Adhäsion nachempfunden werden, indem angenommen wird, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle ihren Platz verlässt, sinkt, wenn benachbarte Gitterpunkte von weiteren adhären Zellen besetzt sind [137] [70]. Die Effekte, die Adhäsion und andere mechanische Eigenschaften der Zelle auf die Migration haben, wurden erstmals in einem Modell von DiMilla untersucht. Das Modell beschreibt eine Zelle als Kette von zusammenziehbaren und viskoelastischen Elementen, die ein adhäsives Lamellipodium an der Front-Seite und ein Uropodium an der Hinterseite verbinden [25]. Dies ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

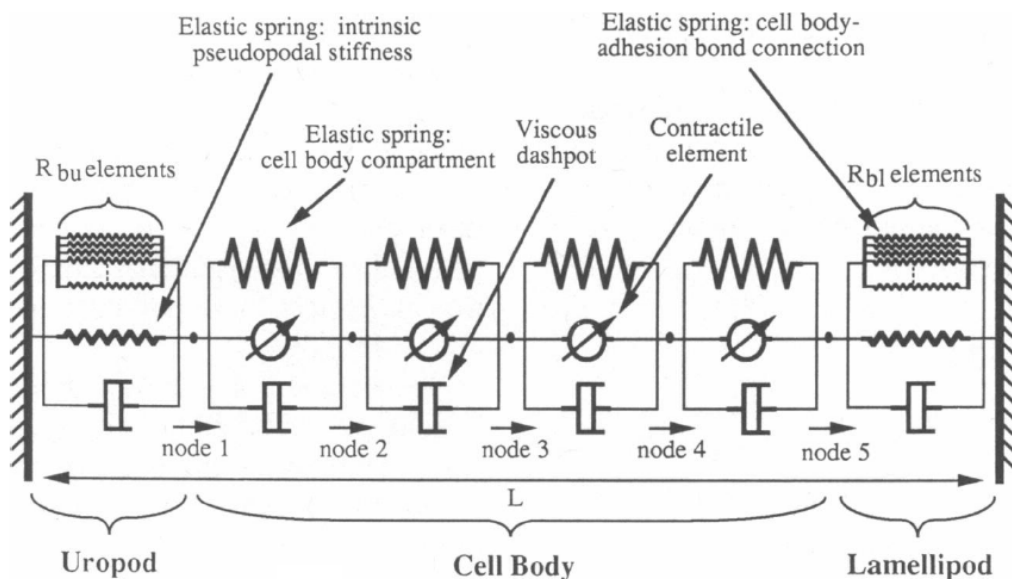


Abbildung 1.6: **Migrationsmodell von DiMilla *et al.* (1991):** Eine Zelle wird als Abfolge von Federn (*springs*), Dämpfern (*dashpot*) und kontraktiven Elementen modelliert [25].

In allen gitterbasierten Modellen, in denen jede Zelle als Punktmasse mit einem Gitterpunkt assoziiert ist, besteht eine gewisse Limitierung durch den Abstand der Gitterpunkte. Entspricht der Abstand zweier Gitterpunkte dem Zelldurchmesser, so können zwei beliebige Zellen sich entweder an zwei benachbarten Gitterpunkten befinden (also adhären) oder einen beziehungsweise mehrere Zelldurchmesser voneinander entfernt liegen. Allerdings können dadurch Korrelationen der Geschwindigkeiten und Bewegungsrichtungen von benachbarten Zellen nicht realistisch erfasst werden.

Dieses Problem existiert im *Cellular Potts Model* nicht, das ein weiterer bekannter gitterbasierter Ansatz zur Modellierung und Simulation kollektiver Zellbewegung ist. Dieses beruht auf dem Potts-Modell aus der statistischen Physik [48]. Im *Cellular Potts Model* wird in einer Population von N Zellen jede Zelle nicht mit einem einzelnen Gitterpunkt assoziiert, sondern entspricht einem Gebiet von Gitterpunkten. Hierfür werden die Abstände zwischen den Gitterpunkten recht klein gewählt. Das Gebiet, das einer Zelle entspricht, muss nicht notwendigerweise einfach wegzusammenhängend sein. Das Gitter wird zu jedem Zeitpunkt mittels probabilistischer Regeln aktualisiert. Zuerst werden ein zufälliger Gitterpunkt, der leer ist oder an dem sich eine Zelle σ befindet, und eine zufällige Zelle σ' ausgewählt. Ob die aktuelle Belegung dieses Gitterpunktes mit der zufällig ausgewählten Zelle überschrieben wird, wird gemäß einer Wahrscheinlichkeit der Form

$$P_{\sigma \rightarrow \sigma'} = \begin{cases} 1, & \Delta H < 0 \\ \exp(-\Delta H), & \Delta H > 0 \end{cases} \quad (1.1)$$

entschieden, wobei H eine Hamilton-Funktion (Energie-Gleichung) ist, welche die für diese Änderung benötigte Energie berechnet, ΔH bezeichnet die Energiedifferenz zwischen den zwei Zuständen. In der ersten Version wurde mit dem *Cellular Potts Model* ausschließlich *Cell Sorting* modelliert. Darunter versteht man das Verhalten von vielen Arten von Tierzellen, bei dem sie sich in Gruppen des gleichen Typs sortieren, nachdem sie vom Gewebe gelöst und vermischt wurden [147]. Seitdem wurden zahlreiche Varianten des CPM beziehungsweise der verwendeten Hamilton-Funktion präsentiert, mit denen verschiedene weitere Situationen modelliert wurden, die zum Beispiel mit Tumorwachstum [150] oder Adhäsion und Zellbewegung [149] in Verbindung stehen.

In *off-lattice*-Modellen werden Zellen als Punktmassen modelliert [108] [134], ihre Position ist aber nicht auf feste Gitterpunkte eingeschränkt. Die Zellbewegung kann in diesem Fall durch Systeme von gewöhnlichen Differentialgleichungen beschrieben werden. Falls Zufallsterme einbezogen werden, um zufällige Bewegung der Zellen in beliebige Richtung zu simulieren, ergeben sich stochastische Differentialgleichungen. Durch die Kontinuität des Raumes haben *off-lattice*-Modelle einen Vorteil gegenüber gitterbasierten Modellen, da mechanische Interaktionen

der Zellen realistischer beschrieben, und Zell-Zell-Korrelationen besser erfasst werden können.

Um zufällige Fluktuationen bei der Zellbewegung einzuschließen, basieren viele Modelle auf einer Langevin-Gleichung [43], also einer Gleichung der Form

$$\frac{dx}{dt} = \underbrace{-ax}_{\text{Reibung}} + \underbrace{F(x, t)}_{\text{Kraft}} + \underbrace{\xi(t)}_{\text{Zufallsvariable}}, \quad (1.2)$$

wobei x in der ursprünglichen physikalischen Anwendung die Geschwindigkeit eines Teilchens bezeichnet, welche durch Reibung (mit $a > 0$) abgebremst und zudem durch eine Kraftfunktion F und eine Zufallsgröße ξ beeinflusst wird. In Anwendung auf Zellen kann die einwirkende Kraft zum Beispiel äußere Einflüsse von Nachbarzellen oder Konzentrationsgefälle von Signalstoffen beschreiben.

Stochastische Differentialgleichungen dieser Form wurden in einigen Arbeiten zur Simulation von kollektiver Migration von Zellen verwendet, zum Beispiel in [108], in [145], in [135] (siehe unten) oder in den Arbeiten von Drasdo *et al.* ([27], [26]), die Monte-Carlo-Simulationen für multizelluläre Prozesse wie Wundheilung und Tumorwachstum entwickelt haben.

Mit einem *off-lattice*-Modell von Sepulveda *et al.*, in dem sich Zellen als Punktmassen einerseits stochastisch bewegen und andererseits ihre Bewegung an die ihrer Nachbarn anpassen, konnte im Vergleich mit experimentellen Daten die Bewegung von MDCK-Zellen qualitativ akkurat beschrieben werden, sowie Geschwindigkeitsverteilung und Korrelation der Zellen erfasst werden [134].

Im Modell von B. Szabó *et al.* ([145]) ist die Zellbewegung nicht rein zufällig, sondern geschieht in einer durch einen Einheitsvektor \mathbf{n}_i vorgegebenen Richtung, zusätzlich wird die Bewegung durch interzelluläre Kräfte von kurzer Reichweite beeinflusst. Die resultierende Modellgleichung lautet

$$\frac{d\mathbf{x}_i}{dt} = v_0 \mathbf{n}_i + \mu \sum_{j=0}^N \mathbf{F}(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j), \quad (1.3)$$

wobei v_0 ein Skalar ist, der die Stärke der gerichteten Bewegung in Richtung von \mathbf{n}_i angibt, μ die Motilität der Zellen bezeichnet, und $\mathbf{F}(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j)$ die interzellulären Kräfte zwischen zwei Zellen mit Position \mathbf{x}_i und \mathbf{x}_j modelliert. Die Richtung \mathbf{n}_i wird über die Zeit variiert und durch weißes Rauschen gestört. Mit diesem Modell wurde die kollektive Migration von großen Gruppen von Keratozyten untersucht. Der in Daten aus Langzeitvideomikroskopie beobachtete Effekt, dass mit höherer Dichte der migrierenden Zellen ein Übergang von zufälligen Bewegungsrichtungen zu kollektiv geordneter Bewegungsrichtung einhergeht, konnte in Simulationen dieses Modells reproduziert werden.

In [108] lautet die Gleichung (beziehungsweise das Gleichungssystem) für die Än-

derung der Zellpositionen

$$\dot{\mathbf{x}}_i = \xi_i + \alpha \nabla_i \phi - \sum_{j \neq i} \nabla_i F(|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j|), \quad (1.4)$$

wobei der mittlere Term Chemotaxis modelliert, und der rechte Term interzelluläre Kräfte von kurzer Reichweite gemäß eines Potentials F beschreibt. Der Gradient wird an der aktuellen Position von Zelle i ausgewertet. Auf diesem Modell basiert das Modell in [98], das die Grundlage für unsere Modellierungsansätze bietet, siehe Kapitel 2.3 für weitere Informationen.

Kontinuierliche Modelle. Im Gegensatz zu ABM werden in einem kontinuierlichen Modell in der Regel Eigenschaften einer großen Population von Zellen durch die Dynamik von örtlich gemittelten Parametern, wie zum Beispiel der Zelldichte oder der räumlichen Verteilung der Zellen, modelliert (*Top-Down-Ansatz*) [11] [89]. In diesen Modellen werden physikalische Massenerhaltungsgesetze benutzt, um die relevanten Gleichungen aufzustellen [105].

In Wundheilungsexperimenten wurde in vielen Fällen beobachtet, dass sich die Zellen als Front mit konstanter Geschwindigkeit in die freie Fläche bewegen, wobei sich das Profil der Fronten kaum verändert. Solche Fronten beziehungsweise Wellen, die ihre Form beibehalten, während sie sich nach links oder rechts bewegen, werden *traveling waves* genannt. Es ist bekannt, dass die Fisher-Gleichung

$$\frac{\delta n}{\delta t} = r \cdot n \cdot \left(1 - \frac{n}{K}\right) + D \nabla^2 n \quad (1.5)$$

diese erzeugen kann. Hierbei bezeichnet n die Populationsdichte und D einen konstanten Diffusionskoeffizienten. Der Term $r \cdot n \cdot \left(1 - \frac{n}{K}\right)$ beschreibt logistisches Wachstum, wobei r eine lineare Reproduktionsrate ist und K die tragende Kapazität des Gebietes bezeichnet. Die Population wächst, solange sie unterhalb der tragenden Kapazität ist und wird vermindert, wenn sie darüber liegt. Diese Reaktions-Diffusions-Gleichung wird häufig auch *Fisher-Kolmogoroff-Gleichung* genannt, da sie im Jahre 1937 gleichzeitig unabhängig voneinander von Ronald A. Fisher und Andrei N. Kolmogoroff untersucht wurde. Die Fisher-Gleichung kann nicht analytisch gelöst werden, da der logistische Wachstumsterm nichtlinear ist [104] [23]. Im Modell von P. K. Maini *et al.* [89] werden Wundheilungsprozesse mit Hilfe der Fisher-Gleichung modelliert. Es wird gezeigt, dass mit diesem Modell *traveling waves* mit konstanter Frontgeschwindigkeit in Wundheilungsprozessen erzeugt werden können [89]. Auch für unsere Anwendungen bestand eine naheliegende und zunächst vielversprechende Möglichkeit, die Ereignisse beim Spaltschluss im *Scratch-Assay* zu modellieren, durch das Fitten der Fisher-Gleichung an eindimensionale Dichteprofile. Die Ergebnisse unseres Modellierungsansatzes

basierend auf der Fisher-Gleichung werden kurz in Abschnitt 4.1 diskutiert.

In einem kontinuierlichen Modell von N. J. Armstrong, K.J. Painter und J.A. Sherratt wird Zellmigration durch Adhäsionskräfte zwischen den Zellen gesteuert. Basierend auf einer Massenerhaltungsgleichung wird die Änderung der Populationsdichte $u(x, t)$ an der Position x zum Zeitpunkt t modelliert als

$$\frac{\delta u}{\delta t} = D \frac{\delta^2 u}{\delta x^2} - \frac{\delta}{\delta x} (u\phi F), \quad (1.6)$$

wobei ϕF den adhäsiven Fluss bezeichnet, der als proportional zur Zelldichte und zu den Kräften zwischen den Zellen angenommen wird. Der Faktor ϕ ist eine Proportionalitätskonstante, die Kraft F wird über die Zelldichte in der lokalen Umgebung integriert. Dieses Modell kann Aggregationsverhalten einer Population von adhäsiven Zellen, die vereinzelt ausgesät werden und im Laufe ihrer Bewegung Cluster bilden, erklären, sowie verschiedene Arten von *Cell Sorting* reproduzieren, die in experimentellen Daten von pigmentierten und nichtpigmentierten Netzhautzellen beobachtet wurden [11].

Im Vergleich zu ABM haben kontinuierliche Modelle gewisse Vorteile, aber auch Nachteile. Sie benötigen relativ wenig Parameter und können direkt an experimentelle Daten gefittet werden. Für stochastische ABM ist dies durch die Stochastizität nur schlecht möglich, da hierbei eine hohe Zahl an Simulationen erforderlich ist, die zu langen Rechenzeiten führt. Allerdings besteht in kontinuierlichen Modellen kaum die Möglichkeit, den Einfluss von Hormonen auf einzelne Zellen in das Modell zu integrieren. In vielen Fällen kann es daher hilfreich sein, eine Verbindung zwischen einem ABM und einem kontinuierlichen Modell herzustellen [106]. Liegt ein Modell als ABM-Modell und als kontinuierliche Version vor, so können die Vorteile beider genutzt werden.

Für Varianten des *Cellular Potts Models* ([4], [88]) und für andere gitterbasierte Modelle für Adhäsion und Migration ([65], [136]) wurden bereits Kontinuum-Approximationen erreicht. In [98] wurde eine Kontinuum-Approximation eines *Off-Lattice*-Modells erarbeitet. Das dort verwendete Modell liegt also als *off-lattice* ABM und als kontinuierliche Version vor. Eine detaillierte Beschreibung dieses Modells, auf dem unser Modellierungsansatz basiert, findet sich in Kapitel 2.3.

1.2.3 Plattformen zur Modellierung und Simulation

In den letzten Jahren wurden mehrere Modellierungs- und Simulationsplattformen vorgestellt und allgemein verfügbar gemacht, mit deren Hilfe die Konstruktion und die Simulation von Mehrskalensystemen vielzelliger Systeme ermöglicht wird. Darin enthalten sind Module zum wissenschaftlichen Rechnen, wie zum Bei-

spiel Löser für Differentialgleichungen.

Eine solche Plattform ist Chaste, was eine Abkürzung für *Cancer Heart And Soft Tissue Environment* ist. Chaste ist eine frei zugängliche C++-Bibliothek zur Simulation von mathematischen Modellen in Biologie und Physiologie. In Chaste wurden unter anderem Modelle für die Entstehung und das Wachstum von Tumoren entwickelt. Durch Zell-basierte Simulationen wurde beispielsweise die Rolle von Stammzellen in Kolorektal-Karzinomen untersucht [99].

Die EPISIM-Plattform enthält zwei Software-Tools, die ebenfalls frei zugänglich sind. Der *EPISIM Modeller* ermöglicht die grafische Multiskalenmodellierung von Zellverhalten in einem vielzelligen Zusammenhang unter Verwendung von Prozessdiagrammen. Die grafisch ausgewählten Modell-Komponenten werden automatisiert in ausführbaren Code übertragen, der mit dem *EPISIM-Simulator* simuliert wird. Es sind Simulationen für zwei- oder dreidimensionale Gewebe möglich. Eine Besonderheit liegt darin, dass subzelluläre Modelle importiert und integriert werden können, die im Datenaustauschformat SBML (*Systems biology markup language* [61] [34]) vorliegen. Darüber hinaus ist die Kombination von Modellen in diskreter und kontinuierlicher Zeit auf zellulärer oder subzellulärer Ebene möglich [143].

1.3 Beschreibung der experimentellen Daten

In diesem Unterkapitel werden die in dieser Arbeit untersuchten experimentellen Daten vorgestellt. Darüber hinaus werden die zugrunde liegenden experimentellen Techniken, die von Kollaborationspartnern durchgeführt wurden, sowie ein paar Schritte, die wir automatisiert zur Datenvorbehandlung durchführen, beschrieben.

1.3.1 Relevante Lungenkrebs-Zelllinien

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen Experimente von drei NSCLC-Zelllinien (H838, H1650, H1975) analysiert, die vom LungSys-Konsortium als Referenz-Zelllinien ausgewählt wurden. Bei allen handelt es sich um Epithelzellen, und zwar um nichtkleinzellige NSCLC-Lungenkrebszellen (Adenokarzinom, Stufe 3). Die Zelllinie H838 stammt von einem 59-jährigen männlichen weißen Patienten und wurde im Jahre 1984 aus einer Metastase im Lymphknoten gewonnen. Der Patient war Raucher. Die Zelllinie H1650 stammt von einem 27-jährigen männlichen weißen Patienten, der Raucher war und wurde im Mai 1987 aus einer Metastase (Pleuraerguss) gewonnen. Die Zelllinie H1975 stammt von einer weiblichen weißen Patientin, deren Alter nicht bekannt ist, und wurde aus einer Metastase im Lymphknoten gewonnen. Die Zelllinie wurde im Jahre 1988 etabliert, die Patientin, von der das Gewebe entnommen wurde, war Nichtraucherin [115].

Zellen der Zelllinie H838 interagieren nicht miteinander und bewegen sich indi-

Zelllinie:	H838	H1650	H1975	Calu-1
Eigenschaft:				
Klassifikation	NSCLC	NSCLC	NSCLC	NSCLC
Geschlecht	männlich	männlich	weiblich	weiblich
Alter	59 Jahre	27 Jahre	<i>nicht bekannt</i>	47 Jahre
Rauchstatus	Raucher	Raucher	Nichtraucher	<i>nicht bekannt</i>
Migrationsphänotyp	individuell	kollektiv	kollektiv	kollektiv

Tabelle 1.1: **Eigenschaften der untersuchten Zelllinien.**

viduell. Zellen der Zelllinie H1650 und H1975 hingegen sind durch physikalische Interaktionen und starke Zell-Zell-Adhäsion geprägt. Sie migrieren kollektiv und stoppen ihre Migration in der Regel, sobald sie konfluent sind.

In einer anderen Studie wurden Daten der Zelllinie CaLu-1 untersucht, die ebenfalls eine nichtkleinzellige (NSCLC) Lungenkrebs-Zelllinie (*epidermoid carcinoma*, Stufe 3) ist. Sie stammt von einer 47-jährigen weiblichen weißen Patientin. CaLu-1-Zellen migrieren ebenfalls adhärent [37] [18]. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der untersuchten Lungenkrebs-Zelllinien. Alle Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

In Abbildung 1.7 sind Ausschnitte aus Phasenkontrast-Aufnahmen der Zelllinien H838 und H1975 im *Scratch-Assay* abgebildet, die die Unterschiede deutlich machen. Bei H1975 bleiben die Zellen im Verband und es ist eine klar abgrenzbare Front auszumachen, während bei H838 einzelne Zellen unabhängig von ihren Nachbarzellen in den Spalt laufen. Aufgrund der Qualität der Migrationsergebnisse bei den verschiedenen Zellen, wurde bei den Zelllinien des LungSys-Konsortiums der Fokus im Laufe der Zeit auf das Studium der Zelllinie H1975 gerichtet. Die Zellen der Zelllinie H838 beispielsweise zeigten außer bei Stimulation mit FCS (*fetal calf serum*), das eine Positivkontrolle darstellt, kaum Migrationsverhalten.

1.3.2 In-vitro-Migrations-Experimente

1.3.2.1 Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man den Vorgang, bei dem Zellen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung im Labor kultiviert werden. Hierbei können sowohl Primärzellkulturen (also Zellen, die direkt aus Gewebe entnommen wurden), als auch sekundäre Zelllinien gezüchtet werden. Als Zelllinie bezeichnet man eine Population von Zellen, die aus einer einzelnen aus Gewebe entnommenen Zelle kultiviert wurde, und in der somit alle Zellen die gleichen genetischen Eigenschaften haben. Zelllinien haben den Vorteil, dass sie Konsistenz und Reproduzierbarkeit von

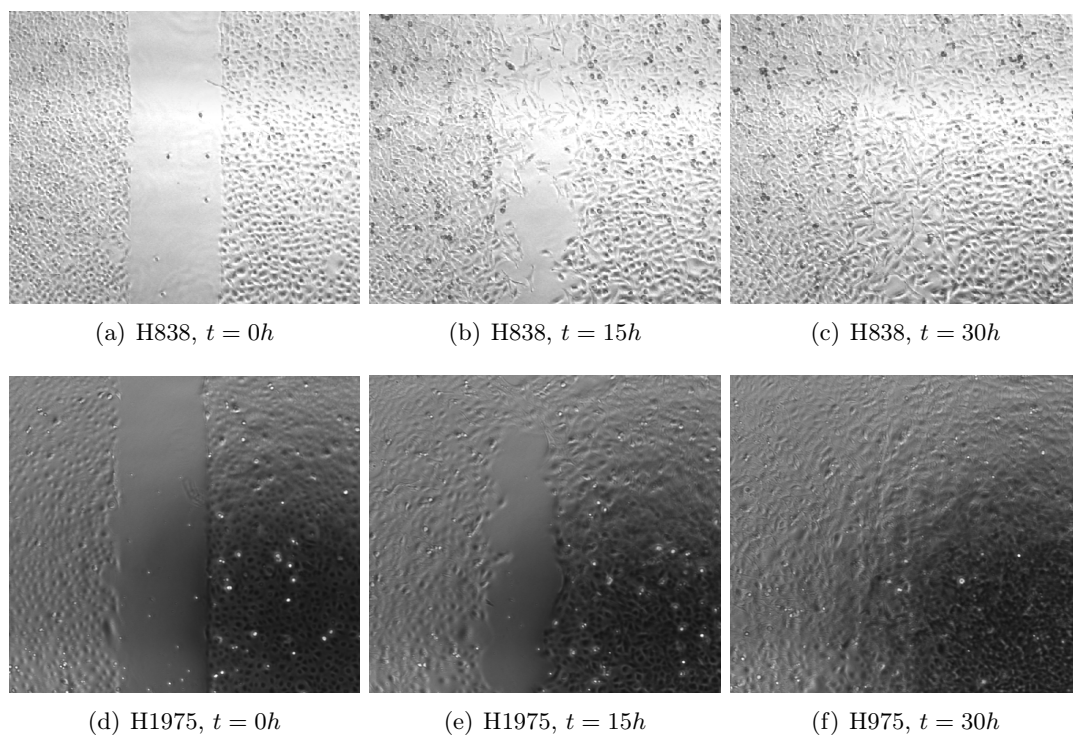


Abbildung 1.7: **Migrationsverhalten von H838 und H1975 nach Stimulation mit FCS.** H838 Zellen migrieren individuell, während H1975-Zellen Zellkontakte aufrecht erhalten.

experimentellen Ergebnissen versprechen, und werden deshalb häufig in der Forschung verwendet. Gewöhnliche Zellen haben eine maximale Anzahl an Zellteilungen (Hayflick-Grenze), bevor sie in Apoptose gehen. Diese kann in Zelllinien durch Infektion mit Viren aufgehoben werden. Auf diese Weise immortalisierte Zelllinien können quasi unendlich weitergezüchtet werden.

In unserem Fall handelt es sich stets um auf Oberflächen adhärierende Zellen. Wenn die Zellen zu dicht gewachsen sind, werden sie mittels einer Protease (zum Beispiel Trypsin), die den Zellverband aufrechterhaltende Proteine abbaut, von der Oberfläche gelöst. Anschließend werden sie in mehrere Aliquots aufgeteilt und eine bestimmte Zellzahl in Petrischalen ausgesät. Dieser Vorgang, der „Zell-Splitting“ genannt wird, ist je nach Zelllinie ein bis zwei Mal pro Woche erforderlich.

Das „Alter“ der Zellen wird als Anzahl der Splittings oder Zellpassage angegeben.

1.3.2.2 Scratch Assay

Aus Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kai Breuhahn (Allgemeine Pathologie, Universitätsklinikum Heidelberg) und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ursula Klingmüller (Lehrstuhl für Systembiologie der Signaltransduktion, DKFZ Heidelberg) stehen uns Daten aus *Scratch-Assay*-Experimenten zur Verfügung, siehe Abschnitt 1.2 für allgemeine Informationen zum *Scratch-Assay*.

Beim Erzeugen einer künstlichen Wunde mit einer Pipettenspitze wird häufig die Petrischale verkratzt, sodass für die Zellen unüberwindbare Stellen entstehen. Des Weiteren wird der Spalt zu Beginn des Experimentes oft ausgefranst und es entsteht keine gerade Kante wie bei der Verwendung eines Inserts. Durch das Ziehen mit der Pipettenspitze können Zellen verletzt werden und es wird mechanischer Stress auf die Zellen ausgeübt. Aus diesen Gründen haben wir mit den Experimentatoren abgestimmt, bei den Experimenten bevorzugt IBIDI-Inserts zur Erzeugung der Spaltgeometrie zu verwenden.

Zunächst wird in jedem Well einer 24-Well-Platte ein Insert, das einen Spalt von $500\mu\text{m}$ Breite erzeugt, platziert. Anschließend wird eine bestimmte Anzahl Zellen (in unserem Fall meist $1.5 \cdot 10^4$ Zellen) in die Wells pipettiert und über Nacht stehen gelassen, damit die Zellen ausreichend Zeit haben, um wieder an der Oberfläche adhärieren zu können. Vor Beginn des Experimentes werden die Zellen in einem von Wachstumsfaktoren freien Medium kultiviert („gehungert“). Die Zellkerne werden mit dem Farbstoff Hoechst 34580 (Invitrogen) gefärbt. Nach Erzeugen der künstlichen Wunde werden die zu untersuchenden Wachstumsfaktoren und/oder Inhibitoren bestimmter Signalfade hinzugefügt. Alternativ kann auf das Hungern der Zellen verzichtet werden und der Effekt von Inhibierung von einzelnen Komponenten untersucht werden.

Nach Erzeugen einer künstlichen Wunde polarisieren die Zellen am Rand der Wunde und migrieren dann in die freie Fläche. Somit wird die Wunde durch gerichtete Zellmigration senkrecht zum Wundrand (und unter Umständen durch Proliferation) geschlossen. Je nach Zelltyp können hierbei einzelne Zellen ausbrechen und sich individuell fortbewegen oder die Zellen adhären und bewegen sich als geschlossene Front.

Zu Beginn und in regelmäßigen zeitlichen Abständen, während des Wundschlussprozesses durch Migration, werden Bilder der Zellpopulation aufgenommen, üblicherweise über einen Gesamtzeitraum von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen. In Abbildung 1.8 sind Beispiele für Phänotypen des Spaltschluss in den verfügbaren Daten abgebildet.

1.3.2.3 Live Cell Imaging

Live Cell Imaging wurde mit einem *Olympus Cell[®] Live Cell Imaging System* mit einem IX81 motorisierten invertierten Mikroskop und einer Hamamatsu XXX Kamera durchgeführt. Die Bilder wurden mit der Olympus excellenceRT-Software (Firma Olympus, Hamburg, Deutschland) gewonnen. Anschließend wurden die Bilder weiter mit FIJI und ImageJ prozessiert und bearbeitet (siehe unten, Abschnitt 1.3.2.5).

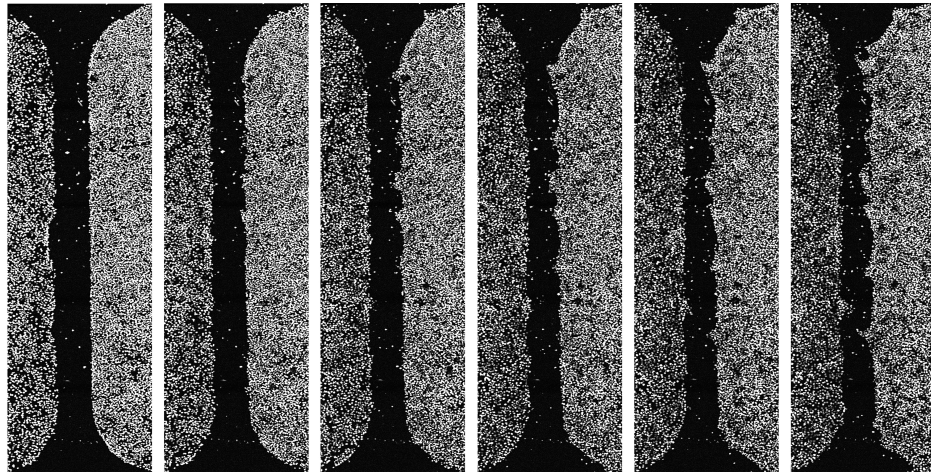
1.3.2.4 Problematiken in den Daten

Trotz der recht großen Zahl der Experimente und Replikate, die für die Analysen zur Verfügung stehen, traten einige Schwierigkeiten in der Auswertung und beim Vergleich von Datensätzen von verschiedenen Versuchstagen auf. In erster Linie ist hierbei zu erwähnen, dass die Zellen ihr Verhalten von einem Tag zum anderen leicht verändern. Ein Einflussfaktor, der hierbei eine Rolle spielen kann, ist die Handhabung der Zellen, die in Nuancen unterschiedlich sein kann. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass unterschiedliches Alter der Zellen (beziehungsweise unterschiedliche Passagenummer) das Verhalten beeinflusst. Im Vergleich vieler Experimente fiel zum Beispiel auf, dass jüngere Zellen in der Regel schneller migrieren als ältere.

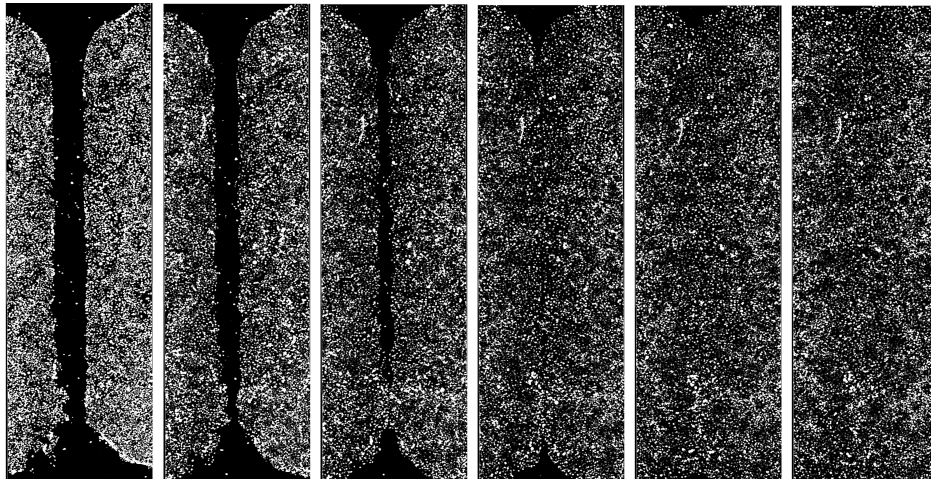
Es stellte sich heraus, dass die verwendeten Zelllinien (H838, H1650 und insbesondere H1975) derart mutiert sind, dass zum Beispiel der HGF-Signalpfad immer angeschaltet ist. Zusätzliche Stimulation mit HGF hatte also, anders als erwartet, keinen großen Einfluss auf das Verhalten der Zellen.

1.3.2.5 Datenvorbehandlung

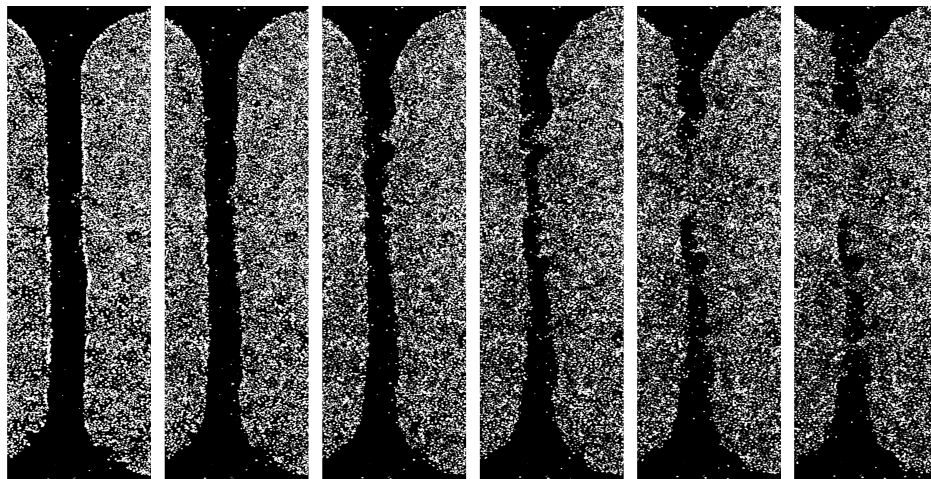
Um eine größere Aufnahmefläche zu erhalten, wird das Mikroskop so eingestellt, dass es nacheinander fünf aneinanderliegende Bereiche „abfährt“. Die fünf so erhaltenen Bilder werden anschließend mit Fiji (siehe Abschnitt 2.1) zu einem zu-



(a) Well 2: Kontrolle



(b) Well 5: FCS



(c) Well 9: IGF

Abbildung 1.8: **Beispiel für *Scratch-Assay*-Daten mit Hoechst-Staining** (Zelllinie H1975, Zeitpunkte 0, 6, 12, 18, 24, 30h). Die Zellen zeigen unterschiedliches charakteristisches Migrationsverhalten. a) Kein Spaltschluss, Bildung von kleinen Fingern (Kontrollexperiment ohne Behandlung der gehungerten Zellen); b) Migration als Front, nahezu kompletter Spaltschluss (Behandlung mit FCS (Positivkontrolle)); c) teilweiser Spaltschluss, Bildung von zellulären Brücken (Stimulation mit IGF).

sammengesetzt („gestitcht“).

Da die Kontraste auf den Originalbildern häufig schlecht sind, sodass einzelne Zellen schwer zu erkennen sind, werden zunächst die Kontraste verbessert. Hierfür wurde ein kleines Skript in der Software ImageJ (siehe Abschnitt 2.1) erstellt, das die Bilder automatisiert bearbeitet. Dabei kommt im Wesentlichen die ImageJ-Funktion *Enhance Contrast* zum Einsatz, die den Anteil der Pixel eines Bildes verändert, die gesättigt erscheinen. Wir verwenden standardmäßig einen Sättigungswert (*saturation pixel value*) von 0.35.

Material und Methoden

2.1 Verwendete Software

In diesem Abschnitt findet sich eine kurze Übersicht der wichtigsten Programme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Implementationen für diese Arbeit wurden überwiegend in Matlab (Version R2013a) ausgeführt, zur Bildverarbeitung wurden ImageJ (Version 1.45) beziehungsweise Fiji (Version 1.45b) und R (Version 3.0.2) verwendet.

Matlab

Matlab[®] ist eine Programmiersprache der Firma *The MathWorks*. Es handelt sich um eine kommerzielle Software. Matlab bietet unter anderem viele nützliche Funktionen zur Analyse von Daten und eignet sich zur numerischen Lösung von mathematischen Problemen und zur Entwicklung von Algorithmen, sowie zur Erstellung von Modellen für Anwendungen. Der Name „Matlab“ geht auf die Bezeichnung „**M**atrix **l**aboratory“ zurück, die darauf hinweist, dass Matlab ursprünglich in erster Linie für numerisches Rechnen unter Verwendung von Matrizen ausgelegt war [10].

R

R ist eine Programmiersprache und Umgebung für statistische Berechnungen und zur Erstellung von Grafiken. R bietet Implementation für eine Vielzahl von statistischen und graphischen Techniken. Die Software kann unter <http://www.r-project.org> kostenfrei heruntergeladen werden [120].

Toolbox EImage. EImage ist ein zu Bioconductor gehörendes Paket für R. Es stellt vielfältige Funktionen zum Einlesen, zur Verarbeitung und zur Analyse

von Bildern zur Verfügung. Im Kontext von Mikroskopie-Aufnahmen von Zellen bietet EBIImage zudem Werkzeuge, um einzelne Zellen zu segmentieren [31].

ImageJ

ImageJ ist ein kostenfreies Programm zur Anzeige, Bearbeitung und Verarbeitung von Bildern, das unter <http://imagej.nih.gov/ij/> heruntergeladen werden kann. Es ist in Java geschrieben und wurde von Wayne Rasband entwickelt. ImageJ wird häufig in der Wissenschaft benutzt, da es durch zahlreiche frei zugängliche zusätzliche Pakete viele Funktionen bietet, die in der wissenschaftlichen Bildanalyse hilfreich sind [133].

In ImageJ ist eine Skriptsprache integriert, die es ermöglicht Makros beziehungsweise Skripte zu schreiben, mit denen zahlreiche Bilder auf die gleiche Art und Weise automatisiert simultan bearbeitet werden können. Diese trägt den Namen *ImageJ Macro language* (IJM).

Fiji. Fiji ist eine Bildverarbeitungs-Software, die auf ImageJ basiert und weitere Plugins enthält [131].

2.2 Analyse der Migrationsexperimente mit Methoden der Particle Image Velocimetry

Um die Abläufe beim Spaltschluss in den *Scratch-Assay*-Experimenten besser zu verstehen und Parameter auf Gewebeebene (*tissue scale*) zu extrahieren, ermitteln wir Geschwindigkeitsfelder in der Monolage (*monolayer*) von Zellen, mit deren Hilfe wir die kollektive Zellmigration analysieren. Die Messung von Verschiebungsfeldern und damit Geschwindigkeitsfeldern wird in vielen Anwendungsbereichen durch Tracking einzelner Zellen über die Zeit durchgeführt [154]. Auch für die Auswertung der uns vorliegenden Daten ist Einzel-Zell-Tracking zunächst der offensichtliche und logische Ansatz. Zell-Tracking-Algorithmen automatisiert durchzuführen ist in den vorliegenden Daten allerdings schwierig, wie wir in Abschnitt 3.1.4 weiter diskutieren. Deshalb verwenden wir statt Einzel-Zell-Tracking eine weitere Methode zur Analyse von Geschwindigkeitsfeldern basierend auf Techniken der Particle Image Velocimetry, die wir in Abschnitt 2.2.1 vorstellen. Die Unterschiede zwischen Ergebnissen von Analysen von Einzel-Zell-Tracking-Daten und entsprechenden Ergebnisse aus Methoden der Particle Image Velocimetry werden in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben.

2.2.1 Grundlagen der Particle Image Velocimetry (PIV)

Die Particle Image Velocimetry (PIV) ist eine optische Methode zur Messung von Geschwindigkeitsfeldern von sich bewegenden Partikeln. Sie ermöglicht die

2.2. Analyse der Migrationsexperimente mit Methoden der Particle Image Velocimetry

Messung von vollständigen Geschwindigkeitsfeldern durch den Vergleich von zwei Bildern, die in kurzer zeitlicher Distanz voneinander aufgenommen wurden. Es werden also die Strecke und die Richtung, die (Gruppen von) Teilchen zurückgelegt haben, berechnet. Aus dem bekannten Zeitintervall zwischen den beiden Aufnahmen und der gemessenen Bewegung der Teilchen werden dann die Geschwindigkeiten ermittelt. Ursprünglich bezeichnet Particle Image Velocimetry einen kompletten Versuchsaufbau; wir interessieren uns allerdings in erster Linie für die Bildverarbeitung und die Auswertungsschritte und passen diese so an, dass wir Geschwindigkeitsfelder der Daten aus den *Scratch-Assay*-Experimenten berechnen können.

Die Particle Image Velocimetry hat eine lange Entstehungsgeschichte; im Folgenden beschreiben wir kurz die Geschichte und die ursprüngliche Funktionsweise dieser Technik. Anschließend wird erläutert, wie wir die PIV-Methoden modifizieren, um Daten aus den *Scratch-Assay*-Versuchen auszuwerten. Wir folgen dabei meist dem umfassenden Werk von Markus Raffel, Christian E. Willert und Jürgen Kompenhans ([121]). Weitere und detailliertere Beschreibungen, insbesondere über die mathematischen Grundlagen der statistischen Methoden zur PIV-Auswertung finden sich zum Beispiel in [3] und [68].

2.2.1.1 Geschichte der Particle Image Velocimetry

Bereits Leonardo da Vinci (1452-1519) interessierte sich für Strömungsmechaniken und beobachtete und skizzierte Strömungsfelder von in einem Bach schwimmenden Objekten. Große Fortschritte in der Erkundung von Strömungsmechanik

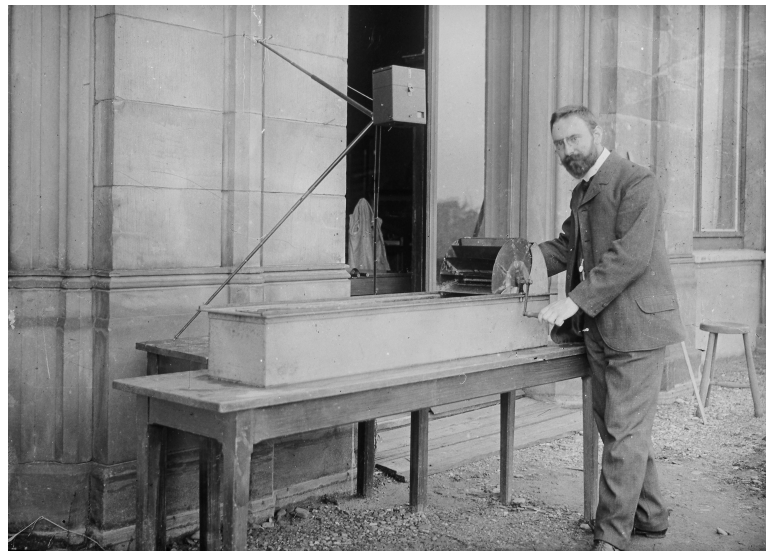


Abbildung 2.1: **Ludwig Prandtl vor seinem Wasserkanal**, Hannover 1904 [121].

wurden gemacht, als man passive Beobachtungen der Natur durch aktiv ausge-

fürte, geplante Experimente ersetzte. Die ersten Versuchsaufbauten zur Ermittlung des dynamischen Verhaltens in der Strömungsmechanik wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelt. Hierbei ist insbesondere Ludwig Prandtl zu nennen, der einen Wasserkanal (den später nach ihm benannten Prandtl-Kanal) baute, um Strömungsvorgänge zu visualisieren. Hierbei wurde Wasser in einer ca. 1,50 Meter langen Wanne durch ein per Hand betriebenes Schaufelrad in Bewegung gebracht. Um die so entstehende Strömung frei von Wirbeln zu halten, wurden Siebe und Umlenkschaufeln eingesetzt. Kurze Zeit später baute Prandtl 1908 den ersten Windkanal in Deutschland. In Abbildung 2.1 ist eine Fotografie aus dem Jahre 1904 zu sehen, die Ludwig Prandtl vor seinem Wasserkanal zeigt [121]. In der Folgezeit wurden verschiedene Methoden entwickelt, die Geschwindigkeitsfelder aufzuzeichnen und quantitativ auszuwerten, zum Beispiel mittels sogenannter *Laser-Speckles* (*Laser Speckle Velocimetry*). Der Begriff Particle Image Velocimetry taucht hierbei erstmals im Jahre 1984 in der Publikation von Pickering und Halliwell auf [116] [2]. Die Methoden wurden seitdem stetig verbessert, wobei die Weiterentwicklung der Particle Image Velocimetry während der letzten 20 Jahre vornehmlich dadurch gekennzeichnet ist, dass analoge Aufzeichnungs- und Auswertungs-Techniken zunehmend durch digitale Techniken ersetzt werden konnten.

2.2.1.2 Aufbau und Funktionsweise

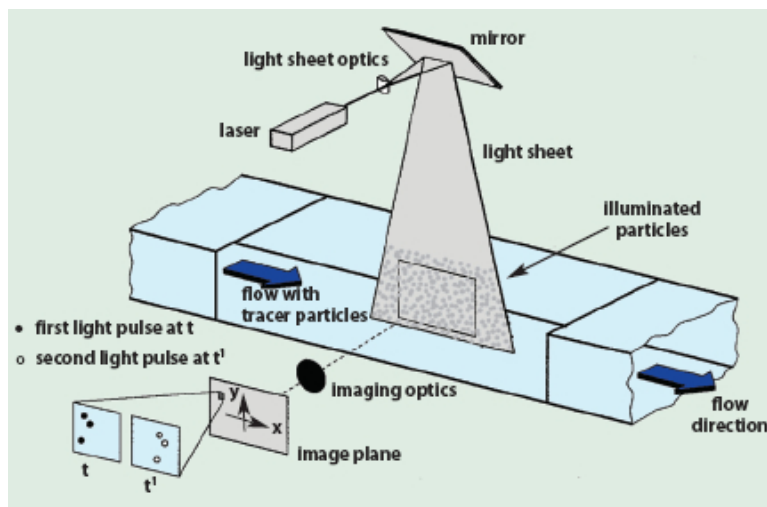


Abbildung 2.2: **Klassischer Versuchsaufbau und Funktionsweise der Particle Image Velocimetry.** Das Bild ist aus dem Buch von Raffel *et al.* ([121]) übernommen.

Die Particle Image Velocimetry basiert in der Regel auf einem umfangreichen Versuchsaufbau, der sich in mehrere kleine Systeme aufteilt, wie in Abbildung 2.2 zu

sehen ist. An erster Stelle steht eine Maschine, die eine Strömung erzeugt (wie zum Beispiel ein Windtunnel) und gegebenenfalls weitere Komponenten, die dafür sorgen, dass die Strömung gleichmäßig ist oder den Druck im Tunnel kontrollieren. Der Strömung werden dann kleine Teilchen (sogenannte Tracer-Teilchen beziehungsweise *tracer particles*) zugesetzt. Diese werden durch einen Doppelpuls beleuchtet, also durch einen ersten Lichtpuls zum Zeitpunkt t und einen zweiten Lichtpuls zum Zeitpunkt t' , wobei die Zeitpunkte t und t' in einem kurzen Zeitintervall liegen. Das Streulicht der Tracer-Teilchen in einem Lichtschnitt wird fotografisch aufgezeichnet; durch den Lichtschnitt ist sichergestellt, dass nur die Partikel in einer definierten Ebene sichtbar sind. Aus den somit erhaltenen Bildpaaren kann man durch Berechnung der Kreuzkorrelation (siehe unten) anschließend die Richtung und den Betrag der Bewegung der Teilchen berechnen und erhält zweidimensionale Geschwindigkeitsvektoren [121] [46].

Wir verwenden Techniken der in der PIV verwendeten Algorithmen zur Bestimmung von Geschwindigkeitsfeldern für die Versuchsergebnisse der *Scratch-Assay*-Experimente.

2.2.1.3 Intensitätsfeld des Bildes

In diesem Abschnitt werden kurz die Grundlagen der Auswertung von PIV-Bildern nach klassischem Versuchsaufbau vorgestellt. Dafür betrachten wir zunächst ein einzelnes Bild. Dieses besteht aus N Partikeln (beziehungsweise in unserer Anwendung Zellen), die zufällig auf dem Bild verteilt sind. Unter Verwendung der Bezeichnungen aus [121] seien die Positionen aller Partikel auf diesem Bild in einem dreidimensionalen Raum gegeben durch

$$\Gamma = \begin{pmatrix} \mathbf{X}_1 \\ \mathbf{X}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{X}_N \end{pmatrix}, \quad \text{wobei } \mathbf{X}_i = \begin{pmatrix} X_i \\ Y_i \\ Z_i \end{pmatrix} \text{ für alle } i \in \{1, \dots, N\}. \quad (2.1)$$

Der Vektor Γ beschreibt also die Position aller Teilchen zu einem Zeitpunkt t und \mathbf{X}_i den Positionsvektor eines Partikels zum Zeitpunkt t . Die Positionen in der zweidimensionalen Fläche, die auf dem Bild aufgezeichnet wird, werden mit Kleinbuchstaben bezeichnet, also

$$\mathbf{x} = \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}. \quad (2.2)$$

Im Weiteren wird, wie in der Literatur üblich, angenommen, dass die Position der Partikel im Raum und ihre Bildposition in linearem Zusammenhang durch

einen Vergrößerungsfaktor M stehen, also

$$\mathbf{X}_i = \frac{\mathbf{x}_i}{M} \quad \text{und} \quad \mathbf{Y}_i = \frac{\mathbf{y}_i}{M}. \quad (2.3)$$

Um das Intensitätsfeld eines Bildes angeben zu können, brauchen wir den Begriff der Punktantwort (auch Punkt-Bild-Funktion beziehungsweise *point-spread-function*, PSF), welche angibt wie ein idealisiertes punktförmiges Objekt durch das System abgebildet werden würde. Gemäß der Argumentation in [69] wird die Punktantwort $\tau(x)$ der bildgebenden Linse als normalverteilt angenommen. In der Regel wird sie als

$$\tau(x) = \frac{8\tau_0}{\pi d_r^2} \cdot \exp\left(-\frac{8|\mathbf{x}|^2}{d_r^2}\right) \quad (2.4)$$

approximiert [69]. Mathematisch entspricht der Aufbau eines Bildes durch Summierung der Punktantworten eines zerlegten Objekts einer Faltung. Das Bild eines Partikels an Position \mathbf{X}_i wird also durch das Faltungsprodukt von $\tau(\mathbf{x})$ mit dem geometrischen Bild des Tracer-Partikels an Position \mathbf{x}_i beschrieben. Um den geometrischen Teil eines Bildes mit (kleinen) Partikeln zu beschreiben, kann eine um \mathbf{x}_i verschobene Dirac-Delta-Funktion verwendet werden. Hieraus erhält man (unter der Annahme, dass die aufgezeichneten Partikel unendlich klein sind) schließlich das Intensitätsfeld einer Aufnahme als

$$I(x, \Gamma) = \tau(\mathbf{x}) * \sum_{i=1}^N V_0(\mathbf{X}_i) \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i), \quad (2.5)$$

wobei $*$ das Faltungsprodukt bezeichnet und $V_0(\mathbf{X}_i)$ die Transferfunktion für die Lichtenergie des Partikels \mathbf{X}_i ist. Für eine beliebige reellwertige Funktion $f(\mathbf{x})$ und einen Vektor \mathbf{x}_i gilt

$$f(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) = f(\mathbf{x}) * \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i); \quad (2.6)$$

womit Gleichung 2.5 zu

$$I(\mathbf{x}, \Gamma) = \sum_{i=1}^N V_0(\mathbf{X}_i) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \quad (2.7)$$

umgeschrieben werden kann.

2.2.1.4 Mittelwert der Bild-Intensität und Autokorrelation

In diesem Abschnitt beschäftigen wir uns mit (räumlichen) Schätzern für den Mittelwert und die Varianz der Intensitätsverteilung eines Bildes sowie der Au-

tokorrelation. Wir folgen dabei [111], beziehungsweise [112] und [121]. Um die Autokorrelation eines Bildes zu berechnen, werden die Bilder in kleine Quadrate aufgeteilt, die wir als Abfrageregionen bezeichnen.

Ab sofort bezeichne a_I eine Abfrageregion und $A(a_I)$ die Fläche der Abfrage-region. Der (räumliche) Mittelwert des Bild-Intensitäts-Feldes ist dann gegeben als

$$\mu_I := \langle I(\mathbf{x}, \Gamma) \rangle = \frac{1}{A(a_I)} \int_{a_I} I(\mathbf{x}, \Gamma) d\mathbf{x}, \quad (2.8)$$

beziehungsweise lautet unter Verwendung von Gleichung 2.7

$$\mu_I = \frac{1}{A(a_I)} \sum_{i=1}^N V_0(\mathbf{X}_i) \int_{a_I} \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) d\mathbf{x}. \quad (2.9)$$

Wir bezeichnen nun mit $\mathbf{s} = \begin{pmatrix} s_x \\ s_y \end{pmatrix}$ einen Verschiebungsvektor in der Bildbene, in der die Korrelation ausgewertet wird, und können nun die Autokorrelation eines Bildes in jeder Abfrageregion a_I für jeden Vektor \mathbf{s} als

$$\begin{aligned} R_I(\mathbf{s}, \Gamma) &= \langle I(\mathbf{x}, \Gamma) I(\mathbf{x} + \mathbf{s}, \Gamma) \rangle \\ &= \frac{1}{A(a_I)} \int_{a_I} \sum_{i=1}^N V_0(\mathbf{X}_i) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \sum_{j=1}^N V_0(\mathbf{X}_j) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j + \mathbf{s}) d\mathbf{x} \\ &= \frac{1}{A(a_I)} \sum_{i \neq j}^N V_0(\mathbf{X}_i) V_0(\mathbf{X}_j) \int_{a_I} \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j + \mathbf{s}) d\mathbf{x} \\ &\quad + \frac{1}{A(a_I)} \sum_{i=j}^N V_0^2(\mathbf{X}_i) \int_{a_I} \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j + \mathbf{s}) d\mathbf{x} \end{aligned} \quad (2.10)$$

berechnen.

2.2.1.5 Kreuzkorrelation

Die am häufigsten verwendete Methode zur Auswertung von PIV-Aufnahmen ist die Berechnung der lokalen Kreuzkorrelation von zwei Bildern, die in kurzer Zeit nacheinander aufgenommen wurden. Wie bei der Berechnung der Autokorrelation werden, um die Kreuzkorrelationen zwischen zwei Bildern zu bestimmen, die Bilder in kleine Quadrate beziehungsweise Abfrageregionen unterteilt. Für jede Abfrageregion wird dann das entsprechende Quadrat auf dem folgenden Bild untersucht und bis zu einer festgelegten Distanz in alle Richtungen pixelweise verschoben. Wir nehmen an, dass sich alle Partikel (beziehungsweise Zellen) in

einer Abfrageregion auf Bild 1 zum Zeitpunkt t_1 gleichmäßig in eine Richtung bewegen, sodass ihre Position zum Zeitpunkt $t_2 = t_1 + \Delta t$ durch

$$\mathbf{X}'_i = \mathbf{X}_i + \mathbf{D} = \begin{pmatrix} X_i + D_X \\ Y_i + D_Y \\ Z_i + D_Z \end{pmatrix} \quad (2.11)$$

gegeben ist, wobei $\mathbf{D} = \begin{pmatrix} D_X \\ D_Y \\ D_Z \end{pmatrix}$ die konstante Verschiebung bezeichnet. In den späteren Anwendungen für Migrationsbilder erscheint diese Annahme sinnvoll, da die zu untersuchenden Zellen stark adhären und kollektiv migrieren. Innerhalb der zweidimensionalen Bildebene ergibt sich als Vereinfachung von Gleichung 2.11 damit eine Verschiebung

$$\mathbf{d} = \begin{pmatrix} MD_X \\ MD_Y \end{pmatrix} \quad (2.12)$$

der Partikel in der Bildebene. Die Gleichung des Intensitätsfeldes von Bild 2 lautet nun (vergleiche Gleichung 2.7)

$$I'(\mathbf{x}, \Gamma) = \sum_{j=1}^N V'_0(\mathbf{X}_j + \mathbf{D}) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j - \mathbf{d}). \quad (2.13)$$

Die Kreuzkorrelation von zwei Abfrageregionen auf zwei aufeinanderfolgenden Bildern kann somit als

$$\begin{aligned} R_{II}(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D}) &= \frac{1}{A(a_I)} \sum_{i,j} V_0(\mathbf{X}_i) V'_0(\mathbf{X}_j + \mathbf{D}) \\ &\cdot \int_{a_I} \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \tau(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j + \mathbf{s} - \mathbf{d}) d\mathbf{x} \end{aligned} \quad (2.14)$$

geschrieben werden. Nach [69] kann $R_{II}(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})$ in drei Komponenten aufgespalten werden. Der Term $R_C(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})$ entsteht aus der Faltung der mittleren Intensitäten der beiden Bilder, der Term $R_F(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})$ beschreibt die Korrelation aus (zufälligen) Fluktuationen und der Term $R_D(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})$ beschreibt die durch den Verschiebungsvektor erzeugte Korrelation:

$$R_{II}(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D}) = \underbrace{R_C(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})}_{\text{Faltung}} + \underbrace{R_F(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})}_{\text{Fluktuation}} + \underbrace{R_D(\mathbf{s}, \Gamma, \mathbf{D})}_{\text{Verschiebungsvektor } \mathbf{D}}. \quad (2.15)$$

Diese Zerlegung der Kreuzkorrelationsfunktion in die Komponenten wird *Adrian-Zerlegung* genannt und ist beispielhaft in Abbildung 2.3 dargestellt.

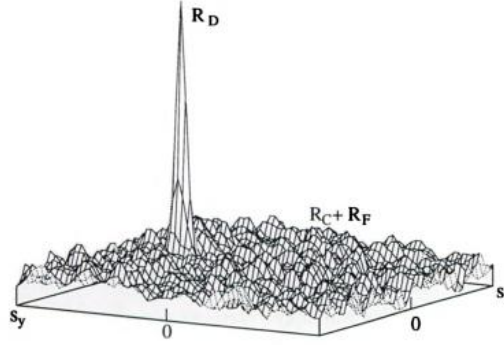


Abbildung 2.3: **Zerlegung der Kreuzkorrelationsfunktion in drei Komponenten.** (Bild übernommen aus [121], Seite 69).

2.2.1.6 Diskrete Kreuzkorrelationsfunktion

Die Kreuzkorrelationsfunktion (Gleichung 2.14) analytisch zu lösen, ist in höchstem Maße kompliziert. Um die Verschiebung der Zellen zu bestimmen, berechnen wir deshalb mit Hilfe numerischer Methoden die Übereinstimmung zwischen den Bildern. Dafür wird eine diskrete Version der Kreuzkorrelationsfunktion benutzt, die wir im Folgenden vorstellen. Bezeichne nun I_1 die Intensitätsverteilung auf Bild 1 und I_2 die Intensitätsverteilung auf Bild 2. Nach Unterteilung der Bilder in Abfrageregionen bezeichnen wir mit $I_1^{i,j}$ das Teilbild „in Zeile i und Spalte j “ auf dem ersten Bild, sowie mit $I_2^{i,j}$ die entsprechende Region auf dem zweiten Bild. Für jede um Δx in x -Richtung und um Δy in y -Richtung verschobene Abfrageregion, wird nun der (diskrete) Kreuzkorrelationsfaktor $R(\Delta x, \Delta y)$ berechnet als

$$R(\Delta x, \Delta y) = \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} I_1^{i,j}(k, l) \cdot I_2^{i,j}(k + \Delta x, l + \Delta y). \quad (2.16)$$

Bei Anwendung dieser Operation auf einen Verschiebungsbereich ($-M \leq \Delta x \leq M, -N \leq \Delta y \leq N$) entsteht eine Korrelationsmatrix der Größe $(2M + 1) \times (2N + 1)$. Die Korrelationsfunktion in Gleichung 2.16 ist nicht normiert und abhängig von der Intensität der Partikel in der Abfrageregion. Will man die Werte für Abfrageregionen mit unterschiedlicher Intensität besser vergleichbar machen, kann daraus ein Korrelationskoeffizient berechnet werden, der die Kreuzkorrelationsfunktion (Gleichung 2.16) auf den Wertebereich $[-1, 1]$ normiert. Wenn sich alle Zellen „gleichmäßig“ bewegen - eine Verschiebung der Abfrageregion auf dem zweiten Bild also exakt mit der ursprünglichen übereinstimmt -, dann wären hier sehr große Werte (nahe 1) zu erwarten. In der Realität verschieben sich die Zellen

trotz intakter Zell-Zell-Verbindungen aber leicht untereinander.

Aus Gründen der Vollständigkeit erwähnen wir, dass bei der Berechnung von $R(\Delta x, \Delta y)$ natürlich nur solche Verschiebungen $(\Delta x, \Delta y)$ zugelassen sind und eingehen, bei denen das Quadrat nicht über den Rand des gesamten zweiten Bildes hinaus verschoben wird.

Der Verschiebungsvektor $\Delta x^*, \Delta y^*$, für den die zweidimensionale Kreuzkorrelationsmatrix $R(\Delta x, \Delta y)$ einen Maximalwert erreicht, beschreibt die Dislokation, für die die Intensitätszustände I_1 und I_2 die größte Übereinstimmung haben. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 2.7 die typische Form der Kreuzkorrelationsmatrix zu sehen. Um Genauigkeit sogar auf Sub-Pixel-Niveau zu erlangen, fitten wir eine zweidimensionale Gaußverteilung an die Kreuzkorrelationsfunktion und bestimmen deren Maximum.

Zusammen mit der Zeitdifferenz, die zwischen zwei Aufnahmen lag, sowie dem Verhältnis, wie viele Pixel auf den Bildern einem Mikrometer entsprechen, kann dann die momentane Strömungsgeschwindigkeit in der Einheit $[\frac{\mu m}{h}]$ an jeder einzelnen Position berechnet werden.

2.2.1.7 Alternative Ansätze zur Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion

Korrelation bezgl. euklidischer Distanz. Statt der Kreuzkorrelation wie oben definiert, könnte man intuitiv auch die euklidische Distanz zwischen zwei Teilbildern berechnen. Diese ist definiert als

$$D_{\text{euklid}}(\Delta x, \Delta y) = \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} [I_1^{i,j}(k, l) - I_2^{i,j}(k - \Delta x, l - \Delta y)]^2, \quad (2.17)$$

das heißt, für jede mögliche Überdeckung der Teilbilder wird die Summe der quadrierten Differenz der beiden gebildet. In Gleichung 2.17 können wir nun die große Klammer auf der rechten Seite mit der binomischen Formel auflösen; diese wird dann zu

$$\begin{aligned} D_{\text{euklid}}(\Delta x, \Delta y) = & \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} I_1^{i,j}(k, l)^2 - 2 \cdot I_1^{i,j}(k, l) \cdot I_2^{i,j}(k - \Delta x, l - \Delta y) \\ & + I_2^{i,j}(k - \Delta x, l - \Delta y)^2. \end{aligned} \quad (2.18)$$

Der erste Term auf der rechten Seite dieser Gleichung $I_1^{i,j}(k, l)^2$ hängt weder von Δx noch von Δy ab, ist also ein konstanter Term. Der letzte Term hängt zwar sehr wohl von Δx und Δy ab, allerdings gehen nur Werte des zweiten Bildes ein. Um Unterschiede zwischen den Bildern festzustellen, ist er also auch ohne Bedeutung. Ausschlaggebend ist nur der mittlere Term, in den als einzigen Werte aus beiden Bildern einfließen. Der Faktor 2 bewirkt lediglich eine Skalierung. Wenn wir diesen Faktor und den ersten und dritten Term der Gleichung vernachlässigen, sowie

das negative Vorzeichen umkehren, erhalten wir exakt die Kreuzkorrelationsfunktion nach obiger Definition. (Hierbei muss man annehmen, dass die Intensität I_2 gleichmäßig verteilt ist, sodass die Summe über $I_2^{i,j}(k-\Delta x, l-\Delta y)^2$ bei Änderung von Δx und Δy nicht variiert.)

Normalisierte Korrelation. In vielen Anwendungen wird ein anderer Ansatz verwendet, der der Möglichkeit gerecht wird, dass der letzte Term in Gleichung 2.18 nicht konstant ist. In diesem Fall wird die bezüglich der Bildintensität in der Abfrageregion normalisierte Korrelation berechnet. Diese ist durch

$$R_{\text{norm}}(\Delta x, \Delta y) = \frac{\sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} I_1^{i,j}(k, l) \cdot I_2^{i,j}(k - \Delta x, l - \Delta y)}{\sqrt{\sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} I_1^{i,j}(k, l)^2 \cdot \sum_{k=0}^{K-1} \sum_{l=0}^{L-1} I_2^{i,j}(k - \Delta x, l - \Delta y)^2}}$$

gegeben.

Für die Anwendung der Particle Image Velocimetry auf *Scratch-Assay*-Daten haben wir entschieden, die Kreuzkorrelation gemäß Gleichung 2.16 zu berechnen. Diese kann in den Implementationen mit Nutzung von schnellen Fourier-Transformations-Algorithmen (*fast Fourier transform*, FFT) berechnet werden, was zu einer vergleichsweise niedrigen Laufzeit der Algorithmen führt.

2.2.1.8 Multipass-Methode

Die Genauigkeit der Geschwindigkeitsfelder kann durch Multipass-Methoden verbessert werden. Die Idee ist, die lokale Verschiebung jeder Abfrageregion basierend auf einem vorhergesagten Strömungsprofil zu berechnen. Das Prinzip wird in Abbildung 2.4 veranschaulicht. Die vorhergesagte Verschiebung wird in einem vorigen Durchlauf des Algorithmus für zwei aufeinanderfolgende Bilder bestimmt, daher ist ein iteriertes Ausführen notwendig. Im ersten Schritt ist keine Information über die Flussrichtung verfügbar und der Prädiktor wird auf null gesetzt. Nach dem ersten Durchlauf (mit großen Abfrageregionen) wird das grobe Resultat (durchgezogene Linien in Abbildung 2.4 (a)) als Prädiktor für den nächsten Durchlauf verwendet. Wird im nächsten Schritt die Größe der Abfrageregionen verkleinert (halbiert) so wird ein feinerer Prädiktor interpoliert. Wurde im vorigen Durchlauf für eine Abfrageregion ein Prädiktor $\delta = (\delta x, \delta y)$ als Verschiebung im Zeitintervall Δt vorausgesagt, so wird die Abfrageregion auf dem zweiten Bild, die als Ausgangspunkt für die Berechnung der Kreuzkorrelation genommen wird, mit entsprechender Verschiebung ausgewählt (siehe Abbildung 2.4 (b)). Die Partikel/Zellen, die positiv zum Signalpeak beitragen, liegen in der grau schraffierten Fläche. Die Verschiebung der Abfrageregion gemäß Prädiktor führt also zu einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis und zu höherer Genauigkeit.

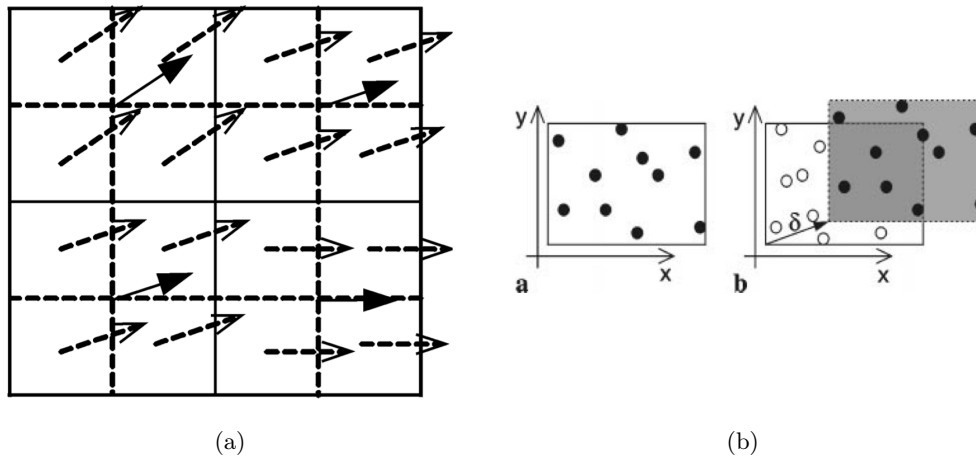


Abbildung 2.4: **Multipass-Methode.** a) Anwendung von PIV-Resultat zur Erstellung eines Prädiktors für die nächste Iteration, b) Prinzip der Bildverschiebung um Prädiktor δ . Die Bilder sind übernommen aus [130].

2.2.1.9 Implementierung

Unsere Programme basieren auf den Implementierungen der Matlab-Toolbox MatPIV [144], die wir an manchen Stellen weiterentwickelt beziehungsweise angepasst haben. Um höhere Genauigkeit zu erzielen, lassen wir die Abfrageregionen überlappen, und zwar so, dass jede Abfrageregion zu 50 Prozent mit der vorigen übereinstimmt. Insbesondere um die Gefahr des *Peak-Locking*-Effektes (siehe unten in Abschnitt 2.2.2.1) zu reduzieren, führen wir die PIV für alle Bilder in vier Iterationsschritten aus, wobei wir nach jedem Iterationsschritt die Größe der Abfrageregionen verkleinern.

Durch die Particle Image Velocimetry erhalten wir für jeden Zeitpunkt Matrizen X und Y , die die x - und y -Koordinaten der Mittelpunkte der Abfrageregionen in der PIV angeben, sowie eine Matrix U , die die Verschiebungen in x -Richtung, sowie eine Matrix V , die die Verschiebungen in y -Richtung enthält.

2.2.2 Typische Fehler

Die Methode zur Bestimmung der Verschiebung der Partikel kann aus verschiedenen Gründen immer wieder zu falschen Vektoren führen. In diesem Abschnitt diskutieren wir verschiedene Fehlerquellen und ihre Auswirkungen, sowie Methoden um diese herauszufiltern.

Falls zum Beispiel die Partikel auf dem zweiten Bild dichter sind als auf dem ersten, kann die Kreuzkorrelationsfunktion „verwaschen“ sein und das Maximum kann nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Eine weitere problematische Situa-

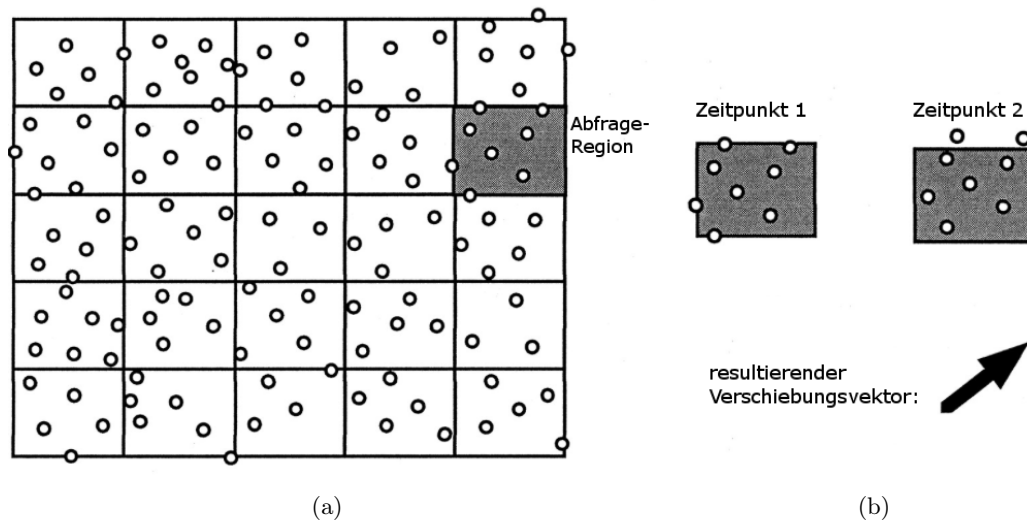


Abbildung 2.5: **Veranschaulichung der PIV-Auswertung mit Kreuzkorrelation.**

a) Illustration eines Bildausschnittes zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die kleinen Kreise symbolisieren sich bewegende Partikel beziehungsweise in unserem Fall Zellnuklei. b) Vergleich einer ausgewählten Abfrage-region mit der gleichen Region auf dem Bild im folgenden Zeitpunkt. Die Partikel sind nach rechts oben verschoben, aus der Kreuzkorrelation wird für diese Region also der abgebildete Verschiebungsvektor berechnet. Diese Abbildung ist der Darstellung in [78] nachempfunden.

tion ergibt sich, wenn ein gut belichtetes Bild mit einem weniger gut belichteten Bild verglichen wird, was in den vorliegenden Daten manchmal der Fall ist. Vereinzelt können auch Fremdpartikel in den Aufnahmen sein, die ebenfalls zu Fehlern in der Analyse führen. Diese Fehler tauchen aber nur ab und zu auf und zeichnen sich meist durch eine enorme Abweichung der errechneten Verschiebung von den umliegenden Bereichen sowohl in Länge als auch Richtung aus, sodass sie leicht zu erkennen sind. Selbstverständlich wollen wir die Ergebnisse von solchen Vektoren, die offensichtlich falsch sind, befreien. Aus diesem Grund bezeichnen wir zum Beispiel einen Vektor als „fehlerhaft“ und ersetzen ihn durch den Durchschnitt der umliegenden Vektoren, falls er in „nicht-akzeptabler Weise“ von den umliegenden abweicht. In den Abschnitten globaler Mittelwerttest (3.1.1.1) und lokaler Mittelwerttest (3.1.1.2) weiter unten finden sich weitere Details hierzu. Weniger einfach zu lösen sind Fehler, die systematisch auftreten, wie der *Peak-Locking*-Effekt.

2.2.2.1 Peak locking-Effekt

Als *Peak locking*-Effekt bezeichnen wir einen systematischen Fehler, der aus verschiedenen Gründen bei der Berechnung der Verschiebungen auf Sub-Pixel-Ge-

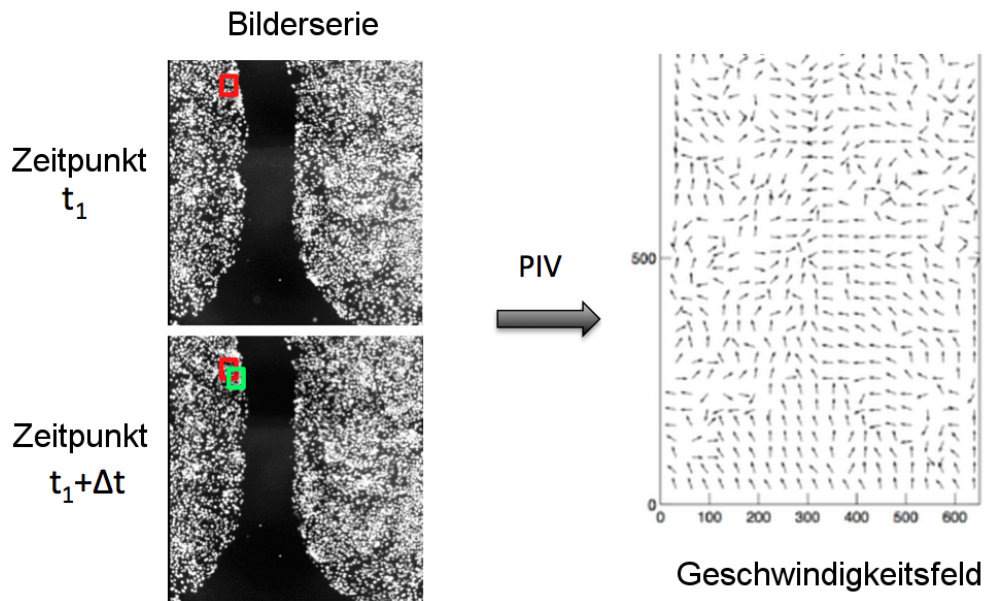


Abbildung 2.6: **Geschwindigkeitsfeld aus Particle Image Velocimetry.** Ein Bild zum Zeitpunkt t_1 wird in kleine Boxen zerlegt (zum Beispiel rote Box). Mittels Kreuzkorrelation wird auf dem zweiten Bild die Box gesucht, die die höchste Übereinstimmung mit dieser hat (grüne Box). Insgesamt erhält man hieraus Geschwindigkeitsfelder.

naugigkeit auftreten kann. Die errechneten Verschiebungen der Zellen liegen dann bevorzugt in der Nähe von ganzzahligen Pixel-Werten. In der Literatur wird der *Peak-Locking*-Effekt häufig auch als *bias error* bezeichnet [119]. Die Abbildung 2.8 (übernommen von [121], Seite 139) zeigt ein Histogramm von Verschiebungen, die mittels PIV berechnet wurden, welches den *Peak-Locking*-Effekt veranschaulicht. Der *Peak-Locking*-Effekt kann durch iteriertes Ausführen der PIV-Algorithmen mit sukzessive verkleinerten Abfrageregionen reduziert werden (siehe [121], Kapitel 5.5 für detaillierte Erläuterungen), da bei dieser Multipass-Methode die Genauigkeit der Geschwindigkeitsfelder verbessert wird. Wie oben beschrieben, nutzen wir dies aus und führen die PIV vier mal mit nach und nach verkleinerten Abfrageregionen durch.

2.2.2.2 Fehler durch vielfache lokale Maxima in der Kreuzkorrelationsmatrix

Eine weitere problematische, aber wesentlich seltenere, Fehlerquelle ist das Auftreten vieler lokaler Minima in der Kreuzkorrelationsmatrix. Dies passiert, wenn zufällig die Bildausschnitte in anderen Verschiebungsrichtungen als der richtigen ebenfalls gut mit der Abfrageregion korrelieren. Die zusätzlichen Peaks werden in

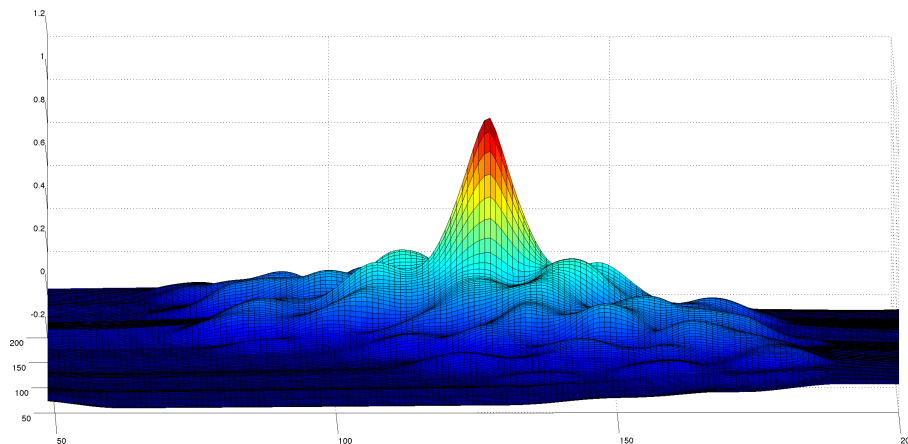


Abbildung 2.7: Typische Form der Kreuzkorrelationsmatrix $R(\Delta x, \Delta y)$.

der Literatur häufig als Störpeaks bezeichnet. Wenn mehrere Störpeaks auftreten, ist es wahrscheinlich, dass durch das Fitten der Gaußkurve an die Kreuzkorrelationsfunktion nicht die optimale (richtige) Verschiebung berechnet wird. Um die Anzahl solcher Fehler zu verringern, wird ein Signal-Rausch-Verhältnis-Filter (siehe unten, Abschnitt 3.1.1.3) verwendet.

2.2.2.3 Effekt von Inhomogenität in Bildkorrelationsverfahren

Für Bildkorrelationsverfahren ist es normalerweise wichtig, dass eine homogene Punktverteilung vorliegt, die keine scharfen Übergänge hat. In unseren *Scratch-Assay*-Daten gibt es an der Front (zwischen Zellen und Spalt) Inhomogenitäten. Diese können zu Fehlern führen: Es ist zum Beispiel möglich, dass eine Abfrageregion im Spalt liegt und an einer Seite genau an der Zellenfront abschließt. Wenn nun auf dem nächsten Bild Zellen von der Front in diese Abfrageregion migriert sind, kann dies zur Folge haben, dass die Korrelation hier zu einem gänzlich falschen Vektor führt.

Solche Fehler tauchen aber nur vereinzelt (und direkt an den inhomogenen Übergängen) auf; es kann davon ausgegangen werden, dass die umliegenden Vektoren korrekt sind. Fehler dieser Art können also problemlos durch einen lokalen Filter (siehe unten, Abschnitt 3.1.1.2) gefunden und korrigiert werden.

2.3 Mathematische Modellierung der Zellmigration beim Wundschluss

Dieses Kapitel widmet sich der mathematischen Modellierung von kollektiver Zellmigration im *Scratch-Assay*. Ein naheliegender logischer Ansatz zur Modellierung

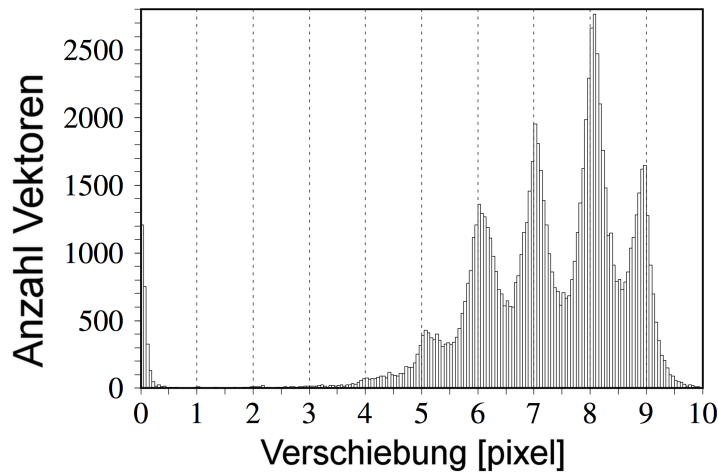


Abbildung 2.8: **Peak-Locking-Effekt**. Die Grafik zeigt ein Beispiel eines Histogramms der Verschiebung in x -Richtung, bei dem in der Optimierung der Kreuzkorrelationsfunktion bevorzugt ganzzahlige Pixel-Werte angenommen wurden [121].

ergibt sich durch das Fitten der Fisher-Gleichung an eindimensionale Dichteprofile. Da sich im Laufe der Arbeit herausstellte, dass - trotz zunächst scheinbar guter Ergebnisse - die biologischen Grundlagen zur Anwendung dieses Modells nicht gegeben sind, haben wir einen weiteren Modellierungsansatz gewählt. In diesem wird kollektive Migration durch mechanische Kräfte zwischen benachbarten Zellen und zufällige Eigenbewegung gesteuert. Die wichtigsten Grundlagen dieses Modells werden in diesem Abschnitt vorgestellt.

Das auf Zell-Zell-Adhäsion und zufälliger Bewegung basierende Migrations-Modell, das wir im Folgenden benutzen und erweitern werden, beruht auf der Arbeit von R. Newman und T. J. Grima über chemotaktische Zell-Zell-Interaktionen [108] und wurde in [98] weiterentwickelt. Bei der Beschreibung des Modells in diesem Abschnitt folgen wir der Darstellung in [98] und übernehmen im Wesentlichen auch die dort verwendete Notation.

2.3.1 Das einzelzellbasierte Modell

Im Folgenden wird stets angenommen, dass jede Zelle als Punktmasse gegeben ist. Zunächst werden Bezeichnungen für die grundlegenden Eigenschaften einer Zelle Z_i eingeführt. Die Position einer Zelle wird als $\mathbf{x}_i = (x_i, y_i)$ beschrieben, ξ_i ist ein Rauschterm beziehungsweise eine stochastische Kraft, die die eigene Antriebskraft (*self-propulsion*) der Zelle Z_i wiedergibt und F bezeichnet die Kraft, die durch Interaktion zwischen Zelle Z_i und einer benachbarten Zelle Z_j entsteht.

Zellbewegung wird modelliert als

$$\frac{d\mathbf{x}_i}{dt} = F_0 \sum_{k, k \neq i} F(\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_k\|) \frac{\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_k}{\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_k\|} + \xi_i. \quad (2.19)$$

Hierbei ist F_0 eine Proportionalitätskonstante und F eine dimensionslose Skalarfunktion der Separierung von zwei Zellen. Ist eine Zelle von Nachbarzellen isoliert, bewegt sie sich also rein zufällig. Die Bewegung der Zellen, die in direktem physikalischen Kontakt zu anderen Zellen stehen, wird allerdings von den mechanischen Interaktionen mit den Nachbarzellen beeinflusst. Der Einfachheit halber wird der Rausch-Term ξ_i , der für die zufällige Bewegung der Zelle gemäß einer symmetrischen Irrfahrt verantwortlich ist, durch eine Normalverteilung mit Mittelwert

$$\langle \xi(t) \rangle = 0 \quad (2.20)$$

erzeugt. Die spitzen Klammern bedeuten, dass über das Rauschen gemittelt wird. Die Kovarianz ist gegeben durch

$$\langle \xi_i(t) \xi_j(t') \rangle = 2 \cdot D \delta_{i,j} \delta(t - t'). \quad (2.21)$$

Die Konstante D entspricht hierbei dem makroskopischen Diffusionskoeffizienten der Zellen [43]. Gleichung 2.19 kann ausgehend von Newtons zweitem Gesetz hergeleitet werden, welches besagt, dass die Änderung der Bewegung proportional zu der Einwirkung der bewegendenden Kraft ist. Hierbei werden vereinfachende Annahmen getroffen. Zum einen werden Trägheitskräfte vernachlässigt, was sinnvoll ist [14], da die Reynolds-Zahl (eine nach dem Physiker Osborne Reynolds benannte dimensionslose Kennzahl für das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften) in der in den Anwendungen für Zellen relevanten Längenskala einen sehr kleinen Wert annimmt. Ferner wird angenommen, dass die viskose Kraft, die auf Zelle Z_i einwirkt und durch Ziehen zwischen der Zelle und dem Medium entsteht, proportional zur Geschwindigkeit (*velocity*) der Zelle ist.

Für die Wahl der Kraftfunktion F gibt es viele Möglichkeiten. Die einfachste Methode ist die Verwendung von linearen Funktionen (wie zum Beispiel in [95]). Lineare Potentialfunktionen können die Resistenz gegen Deformation, die die Zellen ausüben, allerdings nicht akkurat widerspiegeln. Deshalb wird das Morse-Potential verwendet, das in nachfolgender Definition 2.3.1 beschrieben wird.

Definition 2.3.1. (*Morse-Potential*) Sei r_c der natürliche Radius einer Zelle, r die Distanz zwischen zwei Zellen und σ eine Konstante, die die maximale Distanz angibt, über die zwei Zellen interagieren (als Vielfaches des natürlichen Radius

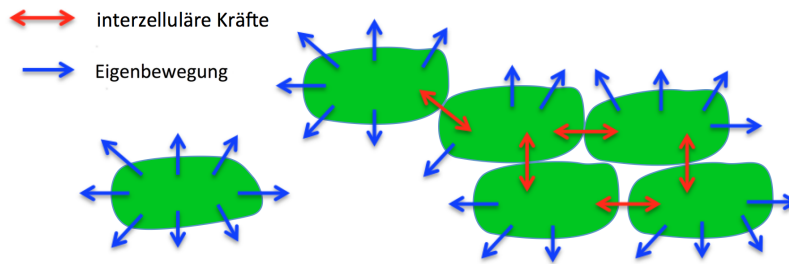


Abbildung 2.9: **Skizze zur Wirkung der interzellulären Kräfte:** Benachbarte Zellen üben interzelluläre Kräfte aufeinander aus (skizziert durch rote Pfeile), zudem kann sich eine Zelle in jeder freien Richtung zufällig bewegen (skizziert durch blaue Pfeile).

r_c) und a ein variabler Parameter. Das Morse-Potential ist dann gegeben durch

$$F(r) = \begin{cases} 2(e^{-2a(r-r_c)} - e^{-a(r-r_c)}), & r < \sigma r_c \\ 0, & r \geq \sigma r_c. \end{cases} \quad (2.22)$$

Wenn (die Punktmassen von) zwei Zellen dicht beieinander sind (dichter als ein kritischer Abstand r_c), so nimmt das Morse-Potential einen positiven Wert an, es beschreibt also eine repulsive abstoßende Kraft, da die Zellen Kontakt vermeiden wollen, wenn sie zu dicht beieinander sind. Bei Abständen, die leicht größer sind als die kritische Distanz, wird die Kraft negativ und wirkt anziehend. Für weitere Entfernungen geht die Kraft allmählich gegen 0, das heißt, dass Zellen, die weit voneinander entfernt sind, keine Kraft mehr aufeinander ausüben. Das Morse-Potential ist für verschiedene Parameter in Abbildung 2.10 illustriert.

2.3.2 Entdimensionalisierung

Schreibt man komplexe Gleichungen in dimensionsloser Form, so bietet dies einige Vorteile. In erster Linie reduziert es die Anzahl der Schritte, in denen die Gleichungen numerisch gelöst werden müssen und erleichtert die Anwendung bekannter mathematischer Techniken. Es gibt zudem besseren Aufschluss, welche kleinen Parameter, die wenig Einfluss haben, ignoriert oder approximiert werden könnten. Im Folgenden wird also eine dimensionslose Variante des Modells verwendet, die durch Setzen von $\tilde{x} := \frac{x}{L}$, $\tilde{t} := \frac{t}{L^2/D}$, $\tilde{F}_0 := \frac{F_0 L}{D}$, $\tilde{r}_c := \frac{r_c}{L}$ sowie $\tilde{a} := a \cdot r_c$ erzeugt wird, wobei L die Länge des Definitionsbereiches ist; auf das Schreiben der kennzeichnenden Tilde wird verzichtet.

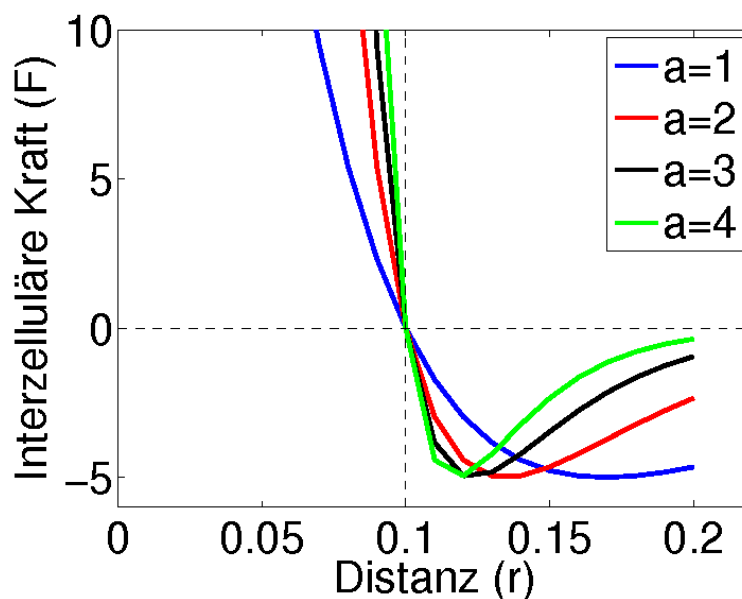


Abbildung 2.10: **Morse-Potential** für verschiedene Werte von a mit natürlichem Zellradius $r_c = 0.1$ und $\sigma = 2$.

2.3.3 Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen und eine kontinuierliche Version des Modells

Das Verhalten des entdimensionalisierten einzelzellbasierten Modells kann mit Hilfe von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (WDF, englisch: *probability density functions*) beschrieben werden. Wir berechnen die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Zelle Z_i zum Zeitpunkt t an Position \mathbf{x} befindet als

$$P_i(\mathbf{x}, t) = \langle \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i(t)) \rangle. \quad (2.23)$$

Auf die gleiche Weise wird die Zwei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion

$$P_{i,j}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) = \langle \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i(t)) \delta(\mathbf{x}' - \mathbf{x}_j(t)) \rangle, \quad (2.24)$$

definiert, also die Wahrscheinlichkeit, dass sich zum Zeitpunkt t die Zelle Z_i an Position x und die Zelle Z_j an Position x' befinden. Analog sind allgemeine n -Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der Form gegeben durch

$$P_{i_1, \dots, i_k}(\mathbf{x}, \mathbf{x}^{(1)}, \dots, \mathbf{x}^{(k)}, t) = \langle \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_{i_1}(t)) \dots (\delta(\mathbf{x}^{(k)} - \mathbf{x}_{i_k}(t))) \rangle, \quad (2.25)$$

wobei $n \in \{1, \dots, N\}$ und N die Anzahl der Zellen ist. Durch Ableiten nach der Zeit und Einsetzen der Gleichung 2.19 für das einzelzellbasierte Modell wird aus Gleichung 2.23, nach mehreren Umformungen und durch Umschreiben des

Terms auf der rechten Seite als Faltung zwischen F und einer δ -Funktion mit Mittelpunkt x_k (siehe [98] für Details),

$$\begin{aligned}
 \frac{\delta P_i(\mathbf{x}, t)}{\delta t} &= -\nabla^2 P_i & (2.26) \\
 &- F_0 \nabla \cdot \left\langle \sum_{k, k \neq i} \int F(\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x}_i - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}'\|} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i) \delta(\mathbf{x}' - \mathbf{x}_k) d\mathbf{x}' \right\rangle \\
 &= -\nabla^2 P_i - F_0 \nabla \cdot \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|} \sum_{k, k \neq i} P_{i,k}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) d\mathbf{x}'.
 \end{aligned}$$

Die Ein-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion hängt also direkt von der Zwei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion ab. Für diese führen die gleichen Überlegungen wie für die Ein-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion zu

$$\begin{aligned}
 \frac{\delta P_{i,j}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t)}{\delta t} &= \nabla^2 P_{i,j} & (2.27) \\
 &- F_0 \left(\frac{\delta}{\delta \mathbf{x}} - \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}'} \right) \left(F(\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j\|) \frac{\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j}{\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j\|} P_{i,j}(\mathbf{x}, \mathbf{x}') \right) \\
 &- F_0 \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}} \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}''\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}''}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}''\|} \sum_{k, k \neq i \neq j} P_{i,j,k}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t) d\mathbf{x}'' \\
 &- F_0 \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}'} \int F(\|\mathbf{x}' - \mathbf{x}''\|) \frac{\mathbf{x}' - \mathbf{x}''}{\|\mathbf{x}' - \mathbf{x}''\|} \sum_{k, k \neq i \neq j} P_{i,j,k}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t) d\mathbf{x}'' .
 \end{aligned}$$

Die Zwei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion hängt demnach also von der Drei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $P_{i,j,k}(x, x', x'', t)$ ab. Ein erneutes Durchführen der obigen Schritte für diese, würde zu einer Gleichung führen, die wiederum von der Vier-Zellen-WDF abhängt. Wiederholtes Ausführen der obigen Schritte liefert also letztlich eine Hierarchie von partiellen Integral-Differentialgleichungen. Das Lösen von Gleichung 2.26 nach P_i erfordert insbesondere das Lösen von Gleichung 2.27 nach $P_{i,j}$, welche wiederum von der Drei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $P_{i,j,k}$ abhängt und so weiter. Da die Abhängigkeit von einer speziellen Zelle keine Rolle spielt, ist folgende Vereinfachung sinnvoll:

Definition 2.3.2. *Die Zellpositionen zum Zeitpunkt $t = 0$ seien identisch verteilt. In diesem Fall hat jede Zelle die gleichen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen und*

es sei

$$p_1(\mathbf{x}, t) := \frac{1}{N} \sum_i P_i(\mathbf{x}, t), \quad i \in \{1, \dots, N\} \quad (2.28)$$

$$p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) := \frac{1}{N(N-1)} \sum_i \sum_{j, j \neq i} P_{i,j}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t), \quad (i, j) \in \{1, \dots, N\}^2 \quad (2.29)$$

$$p_3(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t) := \frac{1}{N(N-1)(N-2)} \sum_i \sum_{j \neq i} \sum_{k \neq j \neq i} P_{i,j,k}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t), \quad (i, j, k) \in \{1, \dots, N\}^3 \quad (2.30)$$

und so weiter.

Mit der Vereinheitlichung aus Definition 2.3.2 bezeichnet also $p_1(x, t)$ die Wahrscheinlichkeit, dass sich zum Zeitpunkt t eine beliebige Zelle an Position x befindet und $p_2(x, x', t)$ die Wahrscheinlichkeit, dass sich zum Zeitpunkt t eine Zelle an Position x und eine Zelle an Position x' befindet. Insgesamt haben wir damit die folgende Proposition:

Proposition 2.3.1. *Mit der Notation aus Definition 2.3.2 werden die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (Gleichung 2.26 und 2.27) zu*

$$\begin{aligned} \frac{\delta p_1(\mathbf{x}, t)}{\delta t} &= -\nabla^2 P_i \\ &\quad - F_0(N-1) (\nabla \cdot \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|} p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) d\mathbf{x}', \end{aligned} \quad (2.31)$$

$$\begin{aligned} \frac{\delta p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t)}{\delta t} &= \nabla^2 p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) \\ &\quad - F_0 \left(\frac{\delta}{\delta \mathbf{x}} - \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}'} \right) \cdot \left(F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|} p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) \right) \\ &\quad - F_0(N-2) \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}} \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}''\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}''}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}''\|} p_3(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t) d\mathbf{x}'' \\ &\quad - F_0(N-2) \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}'} \int F(\|\mathbf{x}' - \mathbf{x}''\|) \frac{\mathbf{x}' - \mathbf{x}''}{\|\mathbf{x}' - \mathbf{x}''\|} p_3(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t) d\mathbf{x}''. \end{aligned} \quad (2.32)$$

Bemerkung 2.3.1. *Durch die Normalisierung gilt bei Integration über den gesamten Raum*

$$\int p_1(\mathbf{x}, t) d\mathbf{x} = 1 \quad \text{und} \quad (2.33)$$

$$\int p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) d\mathbf{x} d\mathbf{x}' = 1. \quad (2.34)$$

Bemerkung 2.3.2. *Es gilt*

$$p_1(\mathbf{x}, t) = \int p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) d\mathbf{x}'. \quad (2.35)$$

2.3.4 Auflösen der Hierarchie in den Gleichungen

Durch die Hierarchie der voneinander abhängigen N partiellen Differentialgleichungen, ist es außerordentlich schwierig, diese numerisch zu lösen. Aus diesem Grunde wird eine Abgeschlossenheitsrelation eingeführt, durch die die Abhängigkeit der Gleichungen an einer bestimmten Stelle abgebrochen wird. Die einfachste und häufig in kontinuierlichen Modellen angewendete Möglichkeit (siehe zum Beispiel [45], [44], [50] und [49]) besteht darin, die „*Mean-Field-Assumption*“ (MFA) zu verwenden, also anzunehmen, dass die Position einer Zelle zum Zeitpunkt t stochastisch unabhängig von der Position von einer beliebigen anderen Zelle in der Population ist. Die Zwei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion könnte unter dieser Annahme also zu

$$p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) = p_1(\mathbf{x}, t) \cdot p_1(\mathbf{x}', t) \quad (2.36)$$

vereinfacht werden. Vergleiche von numerischen Lösungen der durch MFA approximierten Gleichung zu gemittelten Werten aus Simulationen des Einzel-Zell-basierten Modells legen allerdings nahe, dass die MFA keine ausreichend gute Approximation liefert. Insbesondere wenn die interzellulären Adhäsionskräfte stark sind, liefert sie keine guten Ergebnisse mehr, wie auch andere Studien belegen [65] [136]. In [98] sind detaillierte numerische Untersuchungen nachzulesen. Ferner ist die Annahme der MFA, dass die Bewegung zweier Zellen stochastisch unabhängig ist, für unsere Anwendungen zu streng. Das Verhalten einer Zelle wird während kollektiver Migration nämlich durch Interaktionen mit anderen Zellen (durch Signalübertragung oder mechanische Kräfte, zum Beispiel durch Zell-Zell-Adhäsion) beeinflusst. Dies führt zu Zell-Zell-Korrelationen. Durch mechanische Interaktion der Zellen entstehen physikalische Kräfte [148] und Korrelation in der Zellbewegung [135]. Aus diesen Gründen wird die Kirkwood-Approximation (KSA, für *Kirkwood superposition approximation*) verwendet. Diese wurde 1935 von John G. Kirkwood als Mittel der Darstellung einer diskreten Wahrscheinlichkeitsverteilung (ursprünglich um die BBGKY-Hierarchie, die bei der Untersuchung von Flüssigkeiten auftaucht, zu vereinfachen), entwickelt [74]. In unserem Fall führt sie zu der Gleichung

$$p_3(\mathbf{x}, \mathbf{x}', \mathbf{x}'', t) \cong \frac{p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) \cdot p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}'', t) \cdot p_2(\mathbf{x}', \mathbf{x}'', t)}{p_1(\mathbf{x}, t) \cdot p_1(\mathbf{x}', t) \cdot p_1(\mathbf{x}'', t)}. \quad (2.37)$$

Unter Verwendung der Kirkwood-Approximation bleiben die Korrelationen zwischen zwei Zellen erhalten und erst der Einfluss einer dritten Zelle in der Nä-

he wird vernachlässigt. Damit vereinfacht sich die Gleichung der Zwei-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion und das kontinuierliche Modell ist in diesem Fall durch

$$\frac{\delta p_1(\mathbf{x}, t)}{\delta t} = -\nabla^2 P_i - F_0(N-1)\nabla \cdot \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|} p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) d\mathbf{x}', \quad (2.38)$$

und

$$\begin{aligned} \frac{\delta p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t)}{\delta t} &= \nabla^2 p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) - F_0 \left(\frac{\delta}{\delta \mathbf{x}} - \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}'} \right) \cdot \left(F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|} p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) \right) \\ &\quad - F_0(N-2) \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}} \\ &\quad \cdot \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}''\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}''}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}''\|} \frac{p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) \cdot p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}'', t) \cdot p_2(\mathbf{x}', \mathbf{x}'', t)}{p_1(\mathbf{x}, t) \cdot p_1(\mathbf{x}', t) \cdot p_1(\mathbf{x}'', t)} d\mathbf{x}'' \\ &\quad - F_0(N-2) \frac{\delta}{\delta \mathbf{x}'} \\ &\quad \cdot \int F(\|\mathbf{x}' - \mathbf{x}''\|) \frac{\mathbf{x}' - \mathbf{x}''}{\|\mathbf{x}' - \mathbf{x}''\|} \frac{p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) \cdot p_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}'', t) \cdot p_2(\mathbf{x}', \mathbf{x}'', t)}{p_1(\mathbf{x}, t) \cdot p_1(\mathbf{x}', t) \cdot p_1(\mathbf{x}'', t)} d\mathbf{x}'' \end{aligned} \quad (2.39)$$

gegeben.

Ausgewählte Ergebnisse der Datenanalyse

Im Laufe dieser Arbeit standen uns zahlreiche von Kollaborationspartnern angefertigte Datensätze von *Scratch-Assay*-Experimenten zur Verfügung. In diesem Kapitel präsentieren wir ein paar ausgewählte Ergebnisse unserer Analysen mit Methoden der Particle Image Velocimetry, die im vorigen Kapitel vorgestellt beziehungsweise entwickelt wurden.

3.1 Nachbearbeitung und Validierung der PIV-Ergebnisse

3.1.1 Filtern der Ergebnisse

In diesem Abschnitt stellen wir Filter vor, die wir benutzen um Ausreißer und offensichtliche Fehler in den Vektorfeldern zu eliminieren und später durch einen Durchschnitt der umliegenden Werte zu ersetzen. Gute Übersichten effizienter Methoden zum Aufspüren von fehlerhaften Vektoren in Vektorfeldern, die mit Particle Image Velocimetry berechnet wurden, finden sich beispielsweise in [158] und [56]. Als Illustration ist in Abbildung 3.1 ein PIV-Ergebnis mit fehlerhaften Vektoren abgebildet.

Idealerweise müsste man zur Entscheidung, welche Vektoren fehlerhaft sind, eine allgemeingültige Methode entwickeln, die jedem Vektor einen Wert für seine Verlässlichkeit zuordnet, der sich unmittelbar aus der Autokorrelation der Abfrage-region berechnen lässt. Als solches Maß wurde der Begriff der *Detectability*

$$D_0(X) = \frac{R(s_1)}{R(s_2)} \quad (3.1)$$

eingeführt ([22], [67]), der für jeden Vektor X als Quotient des höchsten und zweithöchsten Peaks (an Position s_1 und s_2) berechnet wird. Wie allerdings in [158] aufgezeigt wurde, scheint diese Methode alleine nicht ausreichend robust zu sein und es hat sich herausgestellt, dass der Vergleich mit anderen Vektoren in der Umgebung zuverlässigere Ergebnisse liefert. In den folgenden Abschnitten stellen

wir einige weitere Methoden zum Herausfiltern von fehlerhaften Vektoren vor. Die Idee der *Detectability* geht in den Signal-Rausch-Verhältnis-Filter (Abschnitt 3.1.1.3) ein.

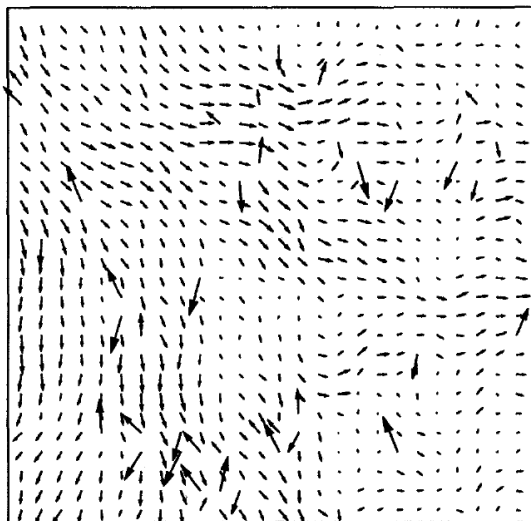


Abbildung 3.1: **Fehlerhafte Vektoren.** Das Bild aus [158] zeigt ein beliebiges PIV-Vektorfeld, das offensichtlich fehlerhafte Vektoren enthält.

3.1.1.1 Globaler Mittelwerttest

Wir verwenden einen globalen Filter beziehungsweise einen globalen Histogramm-Operator, der Vektoren entfernt, die deutlich größer oder kleiner sind als die Mehrzahl der Vektoren im Vektorfeld. Um systematisch festzulegen, für welche Vektoren dies zutrifft, werden „Akzeptanz-Intervalle“ basierend auf der Standardabweichung der Verschiebungen in x - beziehungsweise y -Richtung berechnet, die durch

$$[U_{\min}, U_{\max}] = [-\lambda \cdot \sigma(U), \lambda \cdot \sigma(U)] \quad [V_{\min}, V_{\max}] = [-\lambda \cdot \sigma(V), \lambda \cdot \sigma(V)] \quad (3.2)$$

gegeben sind. Hierbei bezeichnet $\sigma(U)$ die Standardabweichungen aller Verschiebungen in x -Richtung, sowie $\sigma(V)$ die Standardabweichung aller Verschiebungen in y -Richtung; Der Faktor λ ist ein Skalar, der frei gewählt werden kann. Wir verwenden standardmäßig $\lambda = 4$. Dieser Wert ist bewusst hoch gewählt, um nur Vektoren zu löschen, die mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit falsch sind, und nicht zu sehr und unkontrolliert in die Ergebnisse einzugreifen.

3.1.1.2 Lokaler Mittelwerttest

Der lokale Filter, den wir verwenden, filtert die Verschiebungen basierend auf der Differenz zwischen den einzelnen Verschiebungen und dem Mittelwert der Verschiebungen in der lokalen Umgebung. Für den berechneten Verschiebungsvektor $\mathbf{u}_{i,j} = \begin{pmatrix} u_{i,j} \\ v_{i,j} \end{pmatrix}$ in Zeile i und Spalte j betrachten wir den Mittelwert der x -Komponenten aller neun umliegenden Verschiebungsvektoren. Es bezeichne

$$\mu^{3 \times 3}(u_{i,j}) = \mu(\{u_{k,l} | k \in \{i-1, i, i+1\}, l \in \{j-1, j, j+1\}\}) \quad (3.3)$$

den Mittelwert und

$$\sigma^{3 \times 3}(u_{i,j}) = \sigma(\{u_{k,l} | k \in \{i-1, i, i+1\}, l \in \{j-1, j, j+1\}\}) \quad (3.4)$$

die Standardabweichung dieser Komponenten. Der Vektor $\mathbf{u}_{i,j}$ wird hierbei als „Ausreißer“ bezeichnet, sofern

$$u_{i,j} \notin [\mu^{3 \times 3}(u_{i,j}) - \lambda \cdot \sigma^{3 \times 3}(u_{i,j}), \mu^{3 \times 3}(u_{i,j}) + \lambda \cdot \sigma^{3 \times 3}(u_{i,j})]. \quad (3.5)$$

Das gleiche Kriterium wird auch für die y -Komponenten $v_{i,j}$ der Verschiebungsvektoren angewendet. Der Faktor λ ist hierbei wieder ein frei wählbarer Skalar. In diesem Fall haben wir stets $\lambda = 2.5$ gewählt. Durch den lokalen Filter wird also sichergestellt, dass ein einzelner Vektor sich nicht zu stark von den umliegenden Vektoren unterscheidet. In Abbildung 3.2 wird die Wirkungsweise dieses Filters veranschaulicht.

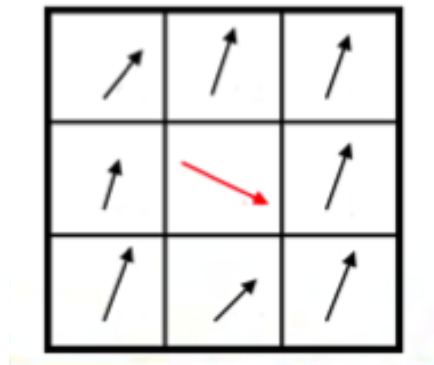


Abbildung 3.2: **Beispiel lokaler Filter.** Der rote Vektor in der Darstellung unterscheidet sich von den umliegenden Vektoren in Richtung und Länge so stark, dass er vom lokalen Filter als fehlerhaft eingestuft und entfernt wird. Der entfernte Vektor wird anschließend durch den Mittelwert der umliegenden Vektoren ersetzt.

Wie bei den anderen Filtern gibt es zahlreiche Varianten, wie dieser Filter angewendet werden könnte, beispielsweise kann statt dem Mittelwert auch der Median der Verschiebungen in der lokalen Umgebung verwendet werden oder es kann eine größere lokale Umgebung betrachtet werden (zum Beispiel innerhalb eines Quadrates von 5×5 statt 3×3 Vektoren).

3.1.1.3 Signal-Rausch-Verhältnis-Test

Für diesen Filter wird neben den Verschiebungen in x - und y -Richtung auch das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise-ratio*, SNR) bestimmt, welches hilft die Qualität der errechneten Vektoren zu quantifizieren. Dieses wird als das Verhältnis zwischen der Höhe des höchsten Peaks (in Subpixel-Auflösung) und der Höhe des zweithöchsten Peaks in der Kreuzkorrelationsfunktion berechnet. Die Höhe des zweithöchsten Peaks („Störpeak“) wird also als Maß für die Stärke von Störsignalen herangezogen. Als ungültig werden hierbei alle Vektoren eingestuft, die ein Signal-Rausch-Verhältnis haben, welches kleiner ist als ein festgelegter Schwellenwert. Laut Argumentation in [69] ist hierfür 1.3 ein geeigneter Wert, den auch wir verwenden.

3.1.2 Umrechnung der Einheiten

Um durchschnittliche Zellgeschwindigkeiten in der gewünschten Maßeinheit $[\frac{\mu\text{m}}{\text{h}}]$ zu erhalten, müssen wir die errechneten Werte, die zunächst Geschwindigkeiten in $[\frac{\text{pixel}}{\text{Bild}}]$ sind, entsprechend skalieren. Aus den Hersteller-Angaben des Mikroskops und der Skalierung der Bilder mit ImageJ ergibt sich, dass 676 Pixel auf einem Bild etwa $0.22 \cdot 10^{-2}\text{m}$ entsprechen. Demnach gilt die Umrechnungsformel

$$1 \text{ pixel} \cong \frac{0.22 \cdot 10^{-2}\text{m}}{676} = 3.2\mu\text{m}. \quad (3.6)$$

Wenn also beispielsweise die Zeit zwischen den Aufnahmen zweier aufeinanderfolgender Bilder 90 Minuten beträgt, so ist

$$1 \frac{\text{pixel}}{\text{Bild}} \cong 1 \cdot \frac{3.2 \frac{\mu\text{m}}{\text{Bild}}}{1.5 \frac{\text{h}}{\text{Bild}}} = 2.14 \frac{\mu\text{m}}{\text{h}}. \quad (3.7)$$

Mit Hilfe dieses Wertes beziehungsweise des entsprechenden Wertes für abweichende Zeitintervalle zwischen zwei Aufnahmen können nun alle mit PIV ermittelten Geschwindigkeiten in $[\frac{\mu\text{m}}{\text{h}}]$ angegeben werden. Für experimentelle Daten, die eine andere Auflösung aufweisen als oben angegeben, muss die Formel entsprechend angepasst werden.

3.1.3 Validierung der errechneten Geschwindigkeitsfelder

In einigen Datensätzen, für die sowohl Phasenkontrastbilder, als auch Bilder der (mit HOECHST-Färbung) gefärbten Nuklei vorliegen, wurde die Particle Image Velocimetry getestet. Die Particle Image Velocimetry liefert für beide nahezu identische Resultate, was weiterhin bestätigt, dass sie vertrauenswürdige und konsistente Ergebnisse erzeugt. Zusätzlich zu Tests an experimentellen Daten haben wir die PIV auch umfangreich mit simulierten Daten getestet, für die die zugrunde liegenden Parameter bekannt sind. Hierbei wurden verschiedene Parameterkombinationen verwendet, die unterschiedliche phänotypische Eigenschaften aufweisen. Mit der PIV haben wir hierbei überzeugende Ergebnisse erhalten. Die erhaltenen Geschwindigkeitsdynamiken stimmen gut mit in den Simulationen gemessenen Parametern überein.

3.1.4 Alternative zu PIV: Einzel-Zell-Tracking

Einzel-Zell-Tracking (*Single Cell Tracking*) ist ein weit verbreiteter Ansatz zur Analyse von experimentellen Daten, dessen Ziel es ist, alle Zellen zu identifizieren und ihre Bewegung über die Zeit als Trajektorie zu erfassen. Es gibt zahlreiche Algorithmen, die alle auf zwei wesentlichen Schritten basieren: Der erste Schritt ist die Segmentierung der Zellen, also die Identifizierung der einzelnen Zellen auf allen verfügbaren Bildern. Der zweite Schritt widmet sich der Wiedererkennung der auf einem Bild identifizierten Zellen auf dem folgenden Bild. Die Zuordnung der Zellen basiert in einfacheren Algorithmen nur auf der Distanz der segmentierten Zellen und ordnet einer Zelle auf dem Folgebild die Zelle mit dem geringsten Abstand zu, wobei Mehrfachzuweisungen vermieden werden. Als Faustregel gilt, dass solche Algorithmen gut funktionieren, solange die Zellen sich pro Bild um Strecken bewegen, die kleiner sind als der Zelldurchmesser [162]. In fortgeschritteneren Algorithmen werden die Zellen über die Minimierung einer Kostenfunktion zugeordnet, in die neben der Distanz der Zellen auch weitere Kriterien einfließen, wie zum Beispiel morphologische Eigenschaften der Zellen [54]. Einzell-Zell-Tracking liefert Trajektorien der Bewegung von einzelnen Zellen. Aus diesen können zahlreiche zellspezifische Parameter, wie Zellgeschwindigkeiten, Persistenz und Winkelkorrelationen berechnet werden.

Die verlässlichen Ergebnisse der Particle Image Velocimetry sind ausreichend, um das Migrationsverhalten der Zellen zu charakterisieren und ihre Geschwindigkeit zu quantifizieren. Um das inverse Problem für das vollständige Modell in Kapitel 5 zu lösen, benötigen wir allerdings die Positionen einzelner Zellen zu bestimmten Zeitpunkten sowie ihre Geschichte, also nach der Zeit aufgelöste Trajektorien der Zellen. In diesem Fall ist es unausweichlich auf Einzel-Zell-Tracking-Daten zurückzugreifen.

Generell ist für unsere Anwendungen die Verwendung von Einzel-Zell-Tracking

naheliegender, um Parameter zu bestimmen, die für die Migration der Zellen charakteristisch sind. Daher wurde im Verlauf dieser Arbeit viel an Daten aus Einzel-Zell-Tracking gearbeitet, die auf unterschiedliche Weise erhalten wurden. Die Beschaffenheit der Daten (insbesondere die hohe Zelldichte und die niedrige Auflösung) führte allerdings in vielen Fällen zu Fehlern im Einzel-Zell-Tracking. Im folgenden Kapitel finden sich eine Validierung der Tracking-Daten mit den Ergebnissen der PIV und eine Darstellung der Probleme des Einzel-Zell-Trackings in den vorliegenden experimentellen Daten.

3.1.4.1 Validierung der Einzel-Zell-Tracking-Daten

Durch Kollaboration mit der Biomedical Computer Vision Group (BMCV) am Bioquant in Heidelberg liegen für einige Datensätze Einzel-Zell-Tracking-Daten vor, die mit dem in [54] vorgestellten Algorithmus und der dort publizierten Software berechnet wurden. Nun können wir die Ergebnisse der Particle Image Velocimetry direkt mit den Ergebnissen des Einzel-Zell-Trackings vergleichen. In Einzel-Zell-Tracking-Algorithmen werden zunächst auf jedem Bild die Zellen segmentiert, was bei hoher Zelldichte und adhätierenden Zellen schwierig wird und bereits eine hohe Fehlerquote beinhaltet.

Mit dem Plugin *TrackClassOverlay5* für ImageJ (siehe 2.1) können die durch Einzel-Zell-Tracking erhaltenen Zelltrajektorien und die originalen Videos überlagert werden, sodass eine stichprobenartige manuelle Kontrolle der Qualität der Ergebnisse möglich ist. Hierbei fallen einige falsche Zuordnungen auf, häufig auch Zellen, deren Trajektorien über Kreuz springen. Diese Fehler sind auf die hohe Zelldichte zurückzuführen, die oft auch schon im ersten Schritt des Zell-Trackings zu fehlerhafter Segmentierung der Zellen führt. Es ist schwierig bis unmöglich, diese nachträglich systematisch zu finden und zu korrigieren. In Abbildung 3.3 ist ein Beispiel für das Ergebnis des Einzel-Zell-Trackings mit den Methoden von [54] zu sehen. Hier ist ein kleiner Ausschnitt von zwei aufeinanderfolgenden Bildern des Originalvideos dargestellt, auf dem die segmentierten Zellen und Trajektorien mit dem Plugin *TrackClassOverlay5* für ImageJ aufgetragen sind. Beim Vergleich sind deutliche Fehler auszumachen: Zum Beispiel werden zwei Zellen (Nr. 788 und 817) auf dem linken Bild korrekt segmentiert, aber auf dem folgenden Bild rechts fälschlich als eine Zelle erkannt. Durch diesen Segmentierungsfehler „fehlt“ Zelle 788 also auf dem rechten Bild und wird fälschlich mit einer anderen identifiziert, wodurch eine starke Bewegung der Zelle (grüne Linie) berechnet wird, die offensichtlich falsch ist. Auf der rechten Seite des Bildausschnittes scheint eine Zelle (Nr. 882) laut ihrer Trajektorie aus den Einzel-Zell-Tracking-Daten über eine andere Zelle zu springen, was auf dem zweidimensionalen Substrat nur schwer möglich ist. Auch dieser Fehler wird offensichtlich durch Fehler bei der Segmentierung und bei der Zuordnung erzeugt. Insgesamt entstehen auf diese Weise zahlreiche falsche Trajektorien; in dem kleinen in Abbildung 3.3 gezeigten Aus-

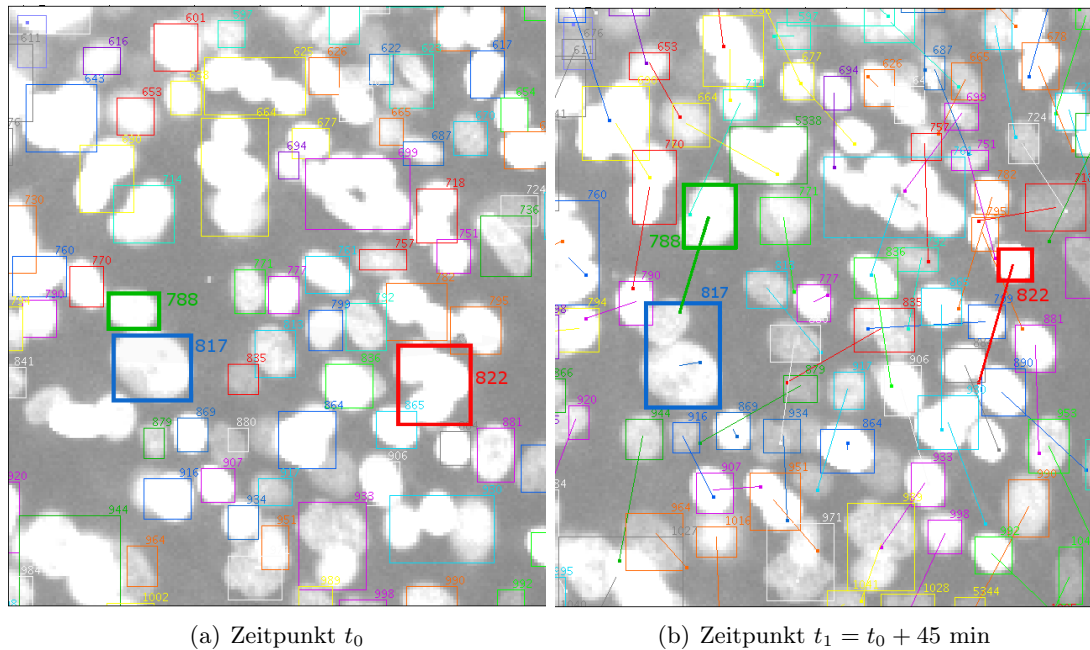
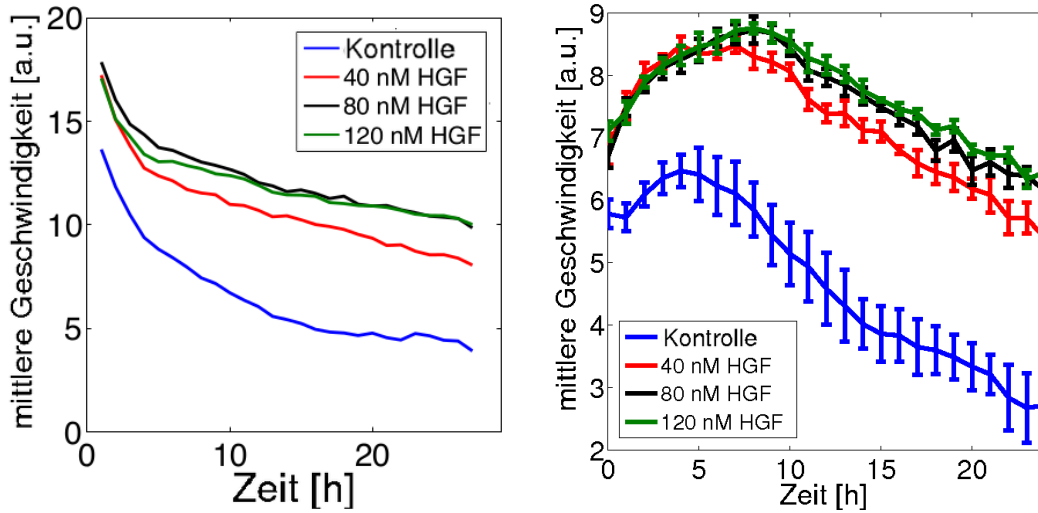


Abbildung 3.3: **Beispiel für Fehler im Einzel-Zell-Tracking durch Segmentierungs-Fehler.** a) Zeitpunkt t_0 , b) Zeitpunkt $t_1 = t_0 + 45$ min. Die im Text erwähnten Beispiele sind hervorgehoben.

schnitt sind viele weitere Fehler zu erkennen. Die Methoden der Particle Image Velocimetry liefern im Wesentlichen ein Tracking von Zellgruppen, anstelle eines Trackings von einzelnen Zellen. Im Gegensatz zum Einzel-Zell-Tracking ist es für die Particle Image Velocimetry nicht notwendig, einzelne Zellen aus Zell-Clustern zu identifizieren. Die Particle Image Velocimetry hat (bei Anwendung auf unsere Daten) an dieser Stelle also einen Vorteil, da sie auch bei hoher Zelldichte problemlos funktioniert und akkurate Ergebnisse liefert.

In den Einzel-Zell-Tracking-Daten konnte zudem ein systematischer Fehler ausgemacht werden, der durch die Kalibrierung der im Tracking-Algorithmus verwendeten Parameter entsteht. Der Algorithmus stellt die Parameter bei Evaluation der ersten drei Bilder ein. Die ersten drei Werte der Trajektorien sind daher unzuverlässig, ebenso wie daraus berechnete Statistiken (zum Beispiel die mittlere Geschwindigkeit, wie in Abbildung 3.4 gezeigt). Abbildung 3.4 zeigt den Verlauf der mittleren Zellgeschwindigkeit mit der Zeit. Es sieht so aus, als ob nach drei Datenpunkten (Abstand zwischen den Datenpunkten in diesem Fall: 60 Minuten) ein Wechsel im Migrationsverhalten der Zellen auszumachen ist. Hierbei handelt sich um einen systematischen Fehler. Unabhängig von diesem Fehler entstehen in erster Linie durch Segmentierungsfehler und somit falsche Zuordnungen der Zellen in aufeinanderfolgenden Bildern jedoch deutliche Unterschiede zwischen den

Geschwindigkeitsdynamiken aus Einzel-Zell-Tracking und PIV, siehe Abbildung 3.4.



(a) mittlere Geschwindigkeit aus Einzel-Zell-Tracking

(b) mittlere Geschwindigkeit aus PIV

Abbildung 3.4: **Vergleich von Geschwindigkeitsdynamik aus PIV und aus Einzel-Zell-Tracking** für einen Datensatz der Zelllinie H1975 mit HGF-Behandlung in unterschiedlicher Dosierung.

Nachteile hat die Particle Image Velocimetry, wenn sich die Zellen in einer Box zufällig in verschiedene Richtungen bewegen. In diesem Fall liefert der Algorithmus eine durchschnittliche Richtung und Geschwindigkeit. Ein weiterer potentieller Nachteil der PIV entsteht normalerweise durch die Tatsache, dass lediglich zwei Projektionen des Geschwindigkeitsvektors senkrecht zur Kamerarichtung (also x - und y -Komponente) erfasst werden und mögliche Geschwindigkeitskomponenten in der dritten Raumrichtung verloren gehen. Durch die Beschaffenheit der *Scratch-Assay*-Experimente, die nur eine monomolekulare Zellschicht aufweisen und in denen somit kaum dreidimensionale Effekte möglich sind, kann dies bei den verwendeten Daten aber vernachlässigt werden. Anders als bei Einzel-Zell-Tracking-Daten liefern die PIV-Ergebnisse nur lokale Geschwindigkeitsfelder, es ist allerdings nicht möglich die Trajektorie einer einzelnen Zelle oder einer Gruppe von Zellen zu verfolgen, somit können aus der PIV auch keine Persistenzlängen bestimmt werden.

Zusammenfassend lässt sich das Fazit ziehen, dass die Particle Image Velocimetry in Anbetracht der Beschaffenheit der Daten einige Vorteile gegenüber Einzel-Zell-Tracking-Algorithmen besitzt und robustere Ergebnisse liefert.

3.2 Inferierte räumlich-zeitliche Parameter

Wir betrachten die *Scratch-Assay*-Daten stets so, dass der Spalt senkrecht im Bild steht (siehe Abschnitt 1.3.2.5 für Preprocessing der Videos). Die Koordinatenachsen werden mit x und y bezeichnet; Bewegung in y -Richtung bedeutet also Bewegung parallel zum Spalt, Bewegung in x -Richtung hingegen bedeutet demgemäß Bewegung senkrecht zum Spalt beziehungsweise in den Spalt hinein. Mit der im vorigen Kapitel vorgestellten Methode erhalten wir für eine Serie Bilder eines *Scratch-Assay*-Experiments die Positionen (x, y) der Mittelpunkte aller Boxen, sowie die jeweilige Verschiebung, wobei wir die Verschiebung in x -Richtung mit der Variable u bezeichnen, die Verschiebung in y -Richtung mit der Variable v . Wir erhalten also für jeden Zeitpunkt ein Geschwindigkeitsfeld. Aus diesen zeitlich und räumlich aufgelösten Geschwindigkeitsfeldern können wir nun Größen berechnen, die das Verhalten der Zellen unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen charakterisieren. Für diese können wir zum Beispiel die Verteilungen der x - und y -Komponenten der Geschwindigkeitsvektoren oder Geschwindigkeitshistogramme bestimmen. Für jeden Datenpunkt (x, y) (Mittelpunkte der Boxen aus PIV-Auswertung) können wir für jeden Zeitpunkt t (zu dem ein Bild vorliegt) die momentane lokale Geschwindigkeit als

$$\text{Geschwindigkeit}(x, y, t) = \sqrt{u^2(x, y, t) + v^2(x, y, t)} \quad (3.8)$$

berechnen. Wir bestimmen mittlere nach der Zeit aufgelöste Geschwindigkeitsdynamiken, indem wir für jeden Zeitpunkt den Mittelwert der lokalen Geschwindigkeiten ermitteln. Beispiele hierfür sind in Abbildungen 3.7 a), 3.10, 3.11, 3.12 und 3.13 zu sehen. Die Geschwindigkeiten der untersuchten Zelllinien zeigen eine zeitliche Dynamik, die stets zunächst ansteigend und dann wieder abfallend ist. Zellen, die kurz nach Beginn des Experimentes offensichtlich sterben, zeigen diese Dynamik nicht. Auf diese Weise entsteht nebenbei ein Kriterium, mit dem festgestellt werden kann, ob die Zellen vital sind.

Heatmaps (Space-Time-Plots). Der Spaltschlussvorgang kann in Heatmaps beziehungsweise *Space-Time-Plots* veranschaulicht werden. Für eine Heatmap der Verschiebungen in x -Richtung werden die x -Komponenten aller Verschiebungen in y -Richtung gemittelt. Somit wird jedem Paar aus Zeitpunkt und x -Position eine mittlere Geschwindigkeit in x -Richtung zugeordnet. Auf ähnliche Weise können auch Heatmaps für die y -Komponente der Geschwindigkeit, Bewegungswinkel oder Dichten erstellt werden.

Relativer Anteil der x -Komponente an der Gesamtbewegung. Um den relativen Einfluss von gerichteter Bewegung auf die Gesamtbewegung zu analysieren, be-

rechnen wir den Quotienten aus der x -Komponente und der Summe beider Komponenten, also

$$\frac{|u|}{|u| + |v|}. \quad (3.9)$$

Diese Größe nimmt genau dann einen Wert zwischen 0 und 0.5 an, wenn gerichtete Bewegung parallel zum Spalt dominiert und Werte zwischen 0.5 und 1 genau dann, wenn gerichtete Bewegung zum Spalt hin dominiert. Ein Wert von 0 würde bedeuten, dass alle Zellen ausschließlich parallel zum Spalt laufen und ein Wert 1 würde bedeuten, dass alle Zellen ausschließlich Bewegung senkrecht zum Spalt ausführen. Nimmt dieser Parameter den Wert 0.5 an, so ist davon auszugehen, dass zufällige ungerichtete Bewegung vorliegt.

Räumliche Korrelationslängen. Wir berechnen Korrelationslängen als Maß für kollektive Migration. Je höher der Wert der Korrelationslänge ist, desto mehr bewegen sich die Zellen kollektiv und nicht stochastisch unabhängig.

Sind allgemein zwei Zufallsvariablen X_1 und X_2 gegeben, wobei für $i \in \{1, 2\}$ $E[X_i]$ den Erwartungswert von X_i , $\sigma[X_i]$ die Standardabweichung von X_i sowie $\text{Cov}[X_1, X_2]$ die Kovarianz von X_1 und X_2 bezeichnet, so berechnet sich deren Korrelation als

$$\text{Corr}(X_1, X_2) = \frac{\text{Cov}[X_1, X_2]}{\sigma[X_1] \cdot \sigma[X_2]}. \quad (3.10)$$

An dieser Stelle kann nun eine direkte Verbindung zwischen linearer Algebra und Wahrscheinlichkeitstheorie genutzt werden: In einem endlichdimensionalen Wahrscheinlichkeitsraum $\{1, 2, \dots, n\}$ kann man den Zufallsvariablen Vektoren im \mathbb{R}^n zuordnen und die Korrelation kann auch geometrisch interpretiert werden. Die Korrelation zweier Vektoren v_1, v_2 können wir dementsprechend also als

$$\text{Corr}(v_1, v_2) = \frac{(v_1, v_2)}{\|v_1\|_2 \cdot \|v_2\|_2} \quad (3.11)$$

berechnen, wobei (v_1, v_2) das Skalarprodukt von v_1 und v_2 und $\|\cdot\|_2$ die Euklidische Norm bezeichnen. Es bezeichne ϕ den von den Vektoren v_1, v_2 aufgespannten Winkel. Gemäß

$$(v_1, v_2) = \|v_1\|_2 \cdot \|v_2\|_2 \cdot \cos(\phi) \quad (3.12)$$

[142] entspricht die Korrelation $\text{Corr}(v_1, v_2)$ dann dem Kosinus des von den beiden Vektoren eingeschlossenen Winkels. Positive Korrelation steht hierbei für einen spitzen Winkel, negative für einen stumpfen Winkel. Gilt $\text{Corr}(v_1, v_2) = 0$, so sind die beiden Vektoren unkorreliert und orthogonal zueinander. Auf diese Wei-

se können wir also aus den Verschiebungsvektoren aus der PIV Korrelationen berechnen. Indem wir für jeden Punkt die Korrelation des lokalen Vektors mit allen in einer bestimmten Entfernung liegenden Vektoren berechnen und darüber mitteln, erhalten wir räumliche Korrelationen der Zellbewegung als Funktion der Distanz.

3.3 Untersuchte Datenmenge

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit mehr als 1300 einzelne von Kollaborationspartnern angefertigte *Scratch-Assay*-Videos analysiert, das entspricht einer Rohdaten-Menge von über 500 Gigabyte. Die Ergebnisse aller untersuchten Datensätze vorzustellen, würde den Rahmen dieser Arbeit deutlich sprengen, wir beschränken uns in den folgenden Abschnitten daher auf einzelne Beispiele. Die in den Abschnitten 3.4, 3.5 und 3.7 vorgestellten Ergebnisse unserer Datenanalyse basieren auf Experimenten von Benedikt Müller (Allgemeine Pathologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Arbeitsgruppe von PD Dr. Kai Breuhahn) und die in Abschnitt 3.8 vorgestellten auf Experimenten von Dr. Sabrina Schmitt aus derselben Arbeitsgruppe. Die Datensätze zur Analyse des Einflusses von HGF auf NSCLC (siehe Abschnitt 3.6) stammen aus Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Klingmüller (Lehrstuhl für Systembiologie der Signaltransduktion, DKFZ Heidelberg).

3.4 Der Einfluss von FIR auf Migration von CaLu-1-Zellen

Anhand der mit Particle Image Velocimetry ermittelten Geschwindigkeitsfelder können wir aufzeigen, dass FIR (Synonyme: PUF60, SIAHBP1), das im nächsten Abschnitt ausführlicher beschrieben wird, Migration von CaLu-1-Zellen, die menschliche NSCLC-Zellen sind (siehe Abschnitt 1.3.1 für Details), fördert. Die hier vorgestellten Ergebnisse werden aktuell in [103] publiziert. Dort werden auch weitere Untersuchungen unserer Kollaborationspartner vorgestellt, die belegen, dass FIR in menschlichen NSCLC-Zellen stark überexprimiert ist.

3.4.1 Hintergrund

Für nichtkleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass disregulierte Transkriptionsfaktoren (wie zum Beispiel STAT3, FOXM1, p53) die Krebsentstehung (*carcinogenesis*) durch verschiedene onkogene Mechanismen begünstigen [7] [12] [80] [96]. Durch ihren zentralen Einfluss auf Signalwege werden Transkriptionsfaktoren als potentielle Ziele für Therapien bösartiger Tumoren beim Menschen betrachtet [92].

In dieser Studie liegt spezielles Interesse auf den Proteinen FBP-1 und FBP-2. Diese gehören zu einer Familie von Proteinen, die mit Einzelstrang-Nuklein-

Säuren interagieren, darunter die sogenannte *far-upstream element (FUSE)* DNA-Sequenz, die sich innerhalb von Promoterregionen (zum Beispiel von *c-myc* und *p21*) befindet. Die Abkürzung FBP steht für *far upstream element (FUSE)-binding protein*. Die FBP-Proteine haben Einfluss auf die Stabilität der mRNA, sowie auf Translation und Transkription. Aus experimentellen Studien ist bekannt, dass FBP-1 und FBP-2 in mehr als 70 % der nichtkleinzelligen Lungenkarzinome beim Menschen disreguliert sind [30] [63]. Vor allem FBP-1 hat in NSCLC-Zellen einen Einfluss auf die Dynamik der Mikrotubuli, wodurch die Migration und Proliferation der Tumorzellen unterstützt wird [138].

Unter physiologischen Bedingungen wurde gezeigt, dass die dynamische Bindung von FBP-Proteinen an den Promotor des *c-myc*-Gens von hoher Relevanz für die Expression ist [85]. Die Bindung von den FBP-Proteinen in der Promoterregion wird durch den *FBP-interacting-repressor (FIR)* gelöst und somit die Aktivität von FBP aufgehoben. Folglich wäre anzunehmen, dass FIR die Migrationsfähigkeit von Zellen verringert. Es ist allerdings bekannt, dass FIR in verschiedenen Tumorarten (zum Beispiel Darmkrebs oder Leberzellkarzinomen) stark exprimiert ist, und es konnte in Studien nachgewiesen werden, dass dadurch das Tumorwachstum gefördert wird [94] [91]. Es liegt also vielmehr die Vermutung nahe, dass FIR in NSCLC-Zellen seine Repressorfunktion verliert und stattdessen Funktionen ausübt, die das Tumorwachstum fördern.

In [103] wird nun gezeigt, dass FIR auch in den meisten NSCLC-Zelllinien deutlich überexprimiert ist. Darüber hinaus bestimmen wir quantitativ den Effekt von FIR auf die Migration von CaLu-1-Zellen und können nachweisen, dass FIR in diesem Fall tatsächlich migrationsfördernd wirkt.

3.4.2 Ergebnisse

Um den Effekt von FIR auf das Migrationsverhalten der CaLu-1-Zellen zu untersuchen, stehen uns die räumlich und zeitlich aufgelösten Verschiebungen in den zwei Raumdimensionen, die mit PIV berechnet wurden, zur Verfügung. Obwohl in diesen Datensätzen die Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden aufgenommen wurden, verwenden wir in den folgenden Abbildungen nur die Bilder aus den ersten 30 Stunden des Experiments, da dort signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Bedingungen, insbesondere in den Geschwindigkeitsdynamiken sichtbar sind.

Abbildung 3.5 visualisiert die mittels PIV berechneten Geschwindigkeitsfelder. Bereits hier sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen ersichtlich. In Abbildung 3.6 sind Histogramme der Verschiebungen in x -Richtung und y -Richtung (unabhängig von Ort und Zeit) zu sehen. Hier sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen sichtbar: Die Zellen, die mit FIR siRNA behandelt wurden, haben im Vergleich zur Kontrolle und zu den Zellen, die mit Nonsense-siRNA behandelt

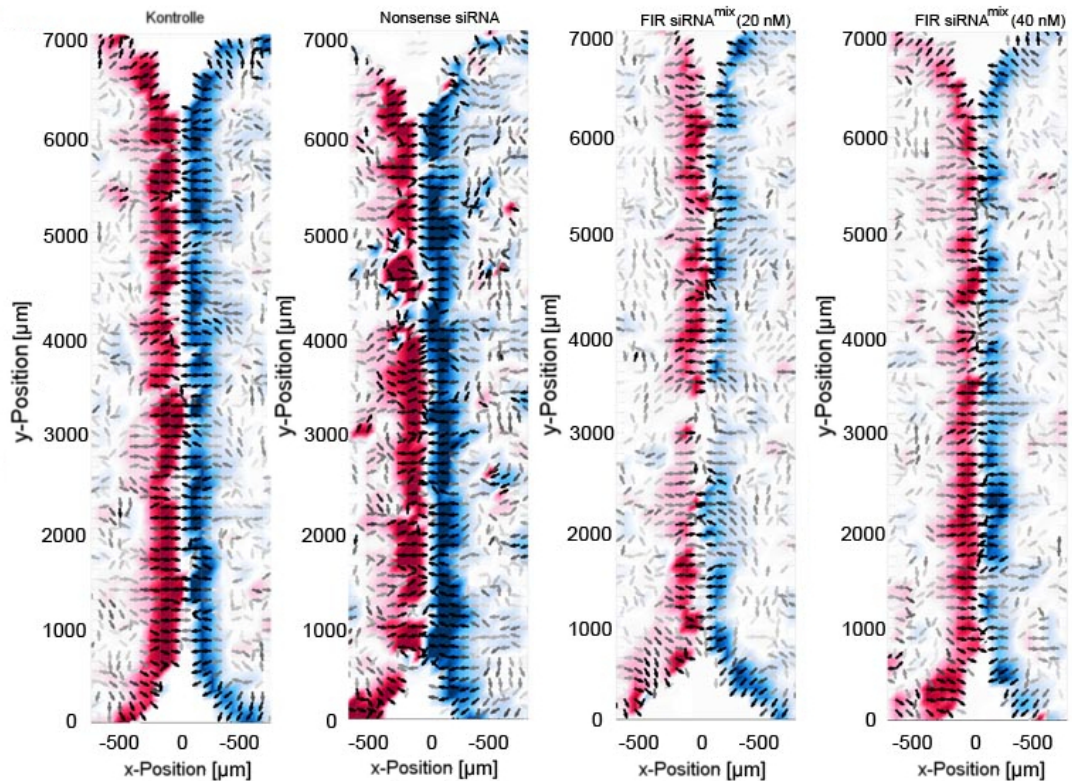


Abbildung 3.5: **Visualisierung von Geschwindigkeitsfeldern aus PIV zu einem frühen Zeitpunkt ($t = 6h$).** Die Pfeile entsprechen kollektiven Verschiebungen von Zellgruppen. Die Farbe indiziert die absolute Verschiebung in x -Richtung, also senkrecht zum Spalt (blau: nach links, rot: nach rechts, höhere Farbintensität bedeutet größere Verschiebung).

wurden, eine deutlich reduzierte Anzahl der hohen Geschwindigkeitskomponenten. Ähnliche Histogramme können zum Beispiel für die Verteilung der lokalen Geschwindigkeiten oder Bewegungswinkel angefertigt werden. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen werden aber am besten deutlich, wenn der Verlauf lokaler Geschwindigkeiten über die Zeit betrachtet wird, der in Abbildung 3.7, a) gezeigt wird. Die Geschwindigkeit der Zellen steigt bei allen Bedingungen zunächst an und erreicht ihr Maximum nach ca. 10-15 Stunden. Danach sinkt die Geschwindigkeit der Zellen wieder. Die Zeitpunkte, an denen die Geschwindigkeit ihr Maximum erreicht, stimmen in diesem Fall nicht mit dem Zeitpunkt des Spaltschlusses überein. Die typische Dynamik der nach der Zeit aufgelösten Geschwindigkeiten ist also nicht (allein) durch den Spaltschluss bedingt, sondern tritt davon unabhängig auf. Wir betrachten nun nur die x -Komponente der Geschwindigkeit und stellen deren Verlauf für die verschiede-

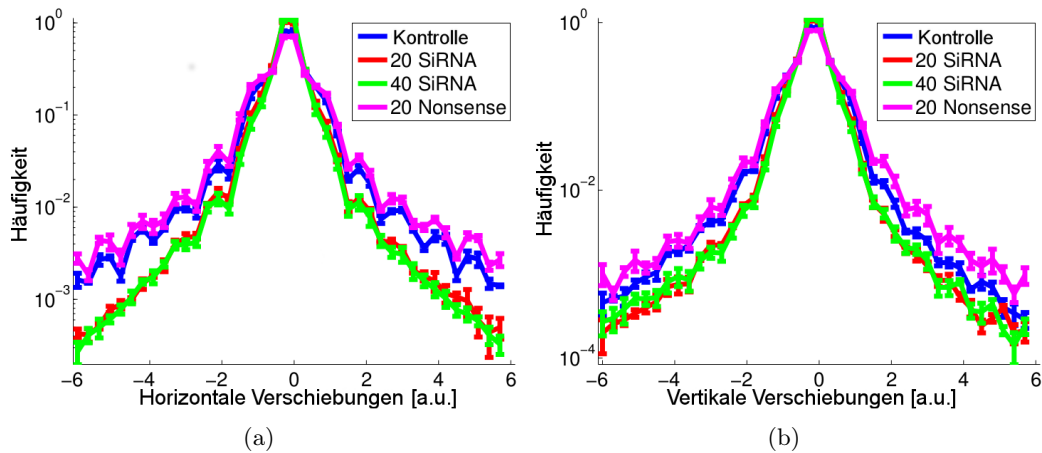


Abbildung 3.6: **Histogramme der Geschwindigkeitsvektoren in x - und y - Richtung** in logarithmischer Skala, a) Histogramm der Verschiebungen in x -Richtung, b) Histogramm der Verschiebungen in y -Richtung. Zu sehen ist die Häufigkeit verschieden großer Verschiebungen, die Fläche unter jeder Kurve ist auf 1 normiert. Es ist eindeutig zu sehen, dass die Zellen der Kontrolle (blaue Kurve) und die mit 20 nM Nonsense-siRNA (violette Kurve) deutlich mehr hohe Geschwindigkeitskomponenten aufweisen, als die Zellen mit FIR siRNA (rote und grüne Kurve).

nen experimentellen Bedingungen in einer Heatmap dar (Abbildung 3.8). Rote Färbung bedeutet hierbei Bewegung nach rechts, blaue Färbung Bewegung nach links, das weiße Feld in der Mitte kennzeichnet die zellfreie Fläche. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen sich von beiden Seiten zum Spalt hinbewegen und diesen schließen. Ebenso deutlich ist hier zu erkennen, dass die Zellen, bei denen FIR nicht inhibiert wurde, eine deutlich höhere Motilität aufweisen. Um festzustellen, ob die FIR-Inhibierung in erster Linie die gerichtete Migration beeinflusst, berechnen wir für alle experimentellen Bedingungen den relativen Anteil der Bewegung senkrecht zum Spalt an der Gesamtbewegung. Das Resultat ist in Abbildung 3.7, b) zu sehen. Durch diese Auswertung können wir also quantitativ zwischen gerichteter Bewegung senkrecht zum Spalt (in x -Richtung) und zufälliger Bewegung parallel zum Spalt (in y -Richtung) differenzieren. Damit ist also nicht ausschließlich die Reduktion der Zellgeschwindigkeit nach FIR-Knockdown dokumentiert, sondern auch die spezielle Reduktion der gerichteten Bewegung. Durch Segmentierung von einzelnen Zellen in ImageJ können wir den Verlauf der Zelldichte (bzw. die Anzahl der Zellen) als Heatmap plotten. Dies ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Diese Abbildung lässt den Vorgang des Spaltschlusses und dessen Dynamik besonders gut erkennen.

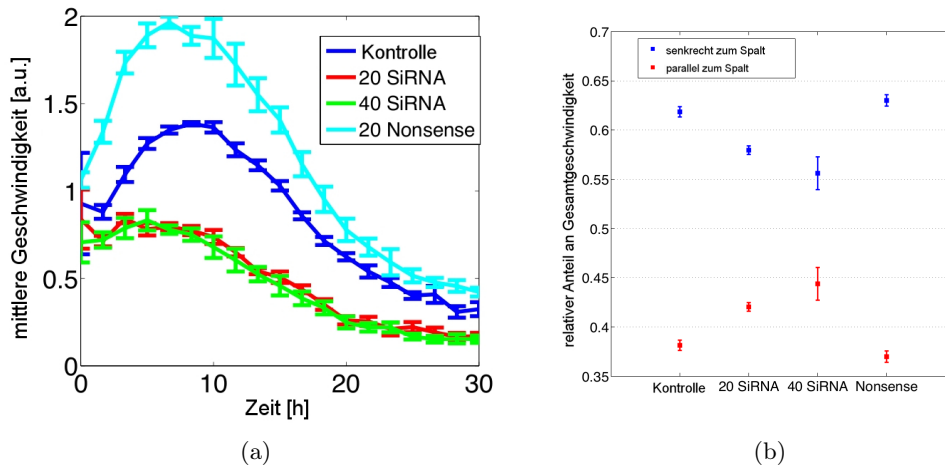


Abbildung 3.7: **Charakteristika der Zellmigration von CaLu-1-Zellen** a) Geschwindigkeitsverlauf der Zellmigration über die Zeit, blau: Kontrolle, rot: 20 nM FIR siRNA, grün: 40 nM FIR siRNA, hellblau: 20 nM Nonsense-siRNA; b) Vergleich der relativen Bewegung senkrecht zum Spalt unter den verschiedenen Bedingungen.

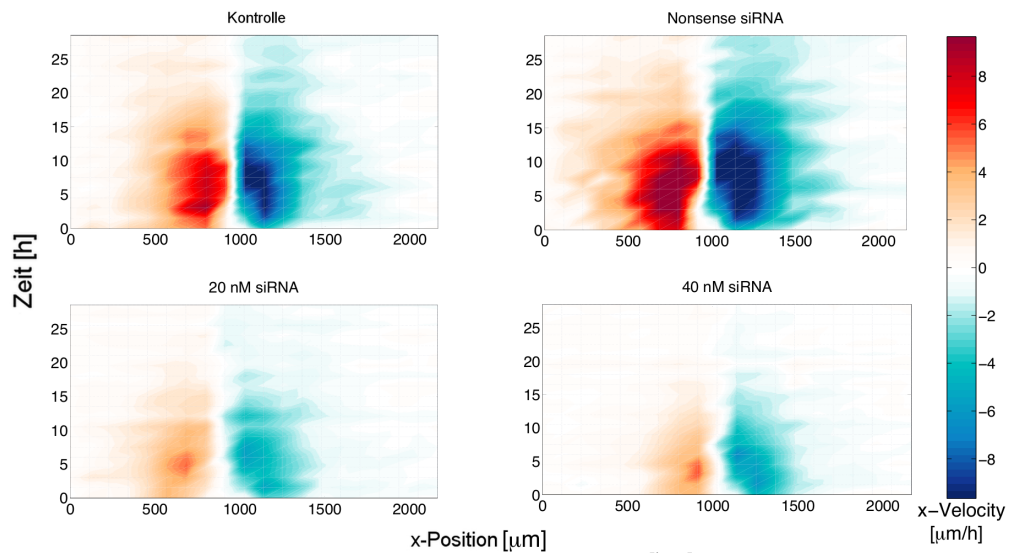


Abbildung 3.8: **Heatmap für die x -Komponente der Geschwindigkeitsvektoren bei Migration von CaLu-1-Zellen.** Hierbei steht rote Färbung für Bewegung nach rechts und blaue Färbung für Bewegung nach links. Teilbild links oben: Kontrolle, rechts oben: Behandlung mit Nonsense siRNA, links unten: Behandlung mit 20 nM FIR siRNA, rechts unten: Behandlung mit 40 nM FIR siRNA.

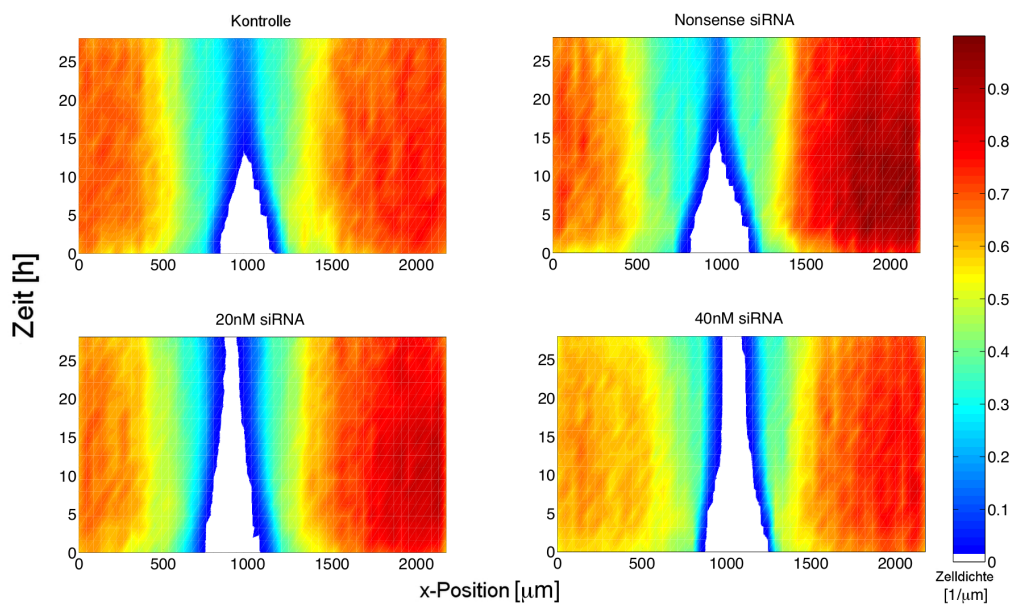


Abbildung 3.9: **Heatmap der Zelldichte bei Migration von CaLu-1-Zellen.** Abgebildet ist der zeitlich und räumlich aufgelöste Verlauf der Zelldichte; blaue Färbung steht hierbei für geringe Dichte, rote Färbung für hohe Dichte, weiße Färbung steht für zellfreie Flächen. Teilbild links oben: Kontrolle, rechts oben: Behandlung mit Nonsense siRNA, links unten: Behandlung mit 20 nM FIR siRNA, rechts unten: Behandlung mit 40 nM FIR siRNA.

3.5 Geschwindigkeitsdynamik mit und ohne Zellteilung (Mitomycin-Experiment)

Als weiteres Beispiel stellen wir hier die nach der Zeit aufgelösten Geschwindigkeitsdynamiken eines Experimentes vor, bei dem Zellen der Zelllinie H1975 (Passage 11) mit dem Antibiotikum Mitomycin, das die Zellteilung hemmt, behandelt wurden. Die allgemeine Funktionsweise von Mitomycin besteht darin, dass es nach einer enzymatischen Aktivierung die DNA-Synthese hemmt. Anschließend kann keine Dissoziation der DNA-Stränge mehr stattfinden, da diese kovalent miteinander verbunden werden. Weil die Dissoziation zur Replikation aber essentiell wichtig ist, wird somit die Zellteilung behindert.

Insgesamt liegen Daten für vier verschiedene experimentelle Bedingungen vor, die jeweils in fünf Replikaten ausgeführt wurden:

- Ein Kontrollexperiment, bei dem die gehungerten Zellen nicht stimuliert wurden,
- eines, bei dem die Zellen mit Mitomycin behandelt wurden,
- eines bei dem den Zellen FCS gegeben wurde und
- eines, bei dem den Zellen Mitomycin und FCS gegeben wurden.

In Abbildung 3.10 sind die ermittelten nach der Zeit aufgelösten Geschwindigkeitsdynamiken dargestellt. Wie zuvor ist zu sehen, dass die Geschwindigkeit der Zellen mit der Zeit zunächst ansteigt und dann ab einem gewissen Zeitpunkt nach ca. einem halben Tag stetig sinkt. Ziel dieses Experimentes ist, festzustellen, ob und wie Zellteilung einen Einfluss auf die Geschwindigkeit hat, oder ob die Reduktion der Geschwindigkeit allein vom Effekt des Spaltschlusses abhängt.

Die Geschwindigkeit der Zellen, die mit FCS behandelt wurden (hellblaue Kurve) steigt innerhalb der ersten zwölf Stunden an und sinkt danach wieder. Bei den Zellen, die zusätzlich mit Mitomycin behandelt wurden (rote Kurve), ist der ansteigende Verlauf der Geschwindigkeit gleich, jedoch fällt die Reduktion der Geschwindigkeit deutlich geringer aus. Die Zellen behalten also eine höhere Geschwindigkeit bei. Der Grund für die Geschwindigkeitsreduktion ist also nicht allein durch die Mechanik des Spaltschlusses gegeben, sondern offenbar auch durch die Tatsache, dass nach dieser Zeit ein Teil der Zellen in Mitose geht. Dadurch wird die *Sheet-Migration* gehemmt. Dies passt gut zu Ergebnissen aus Proliferations-Assays für die gleiche Zelllinie. In diesen wurde gezeigt, dass die Proliferation von H1975-Zellen in den ersten 12-15 Stunden gering ist und danach stetig ansteigt (unveröffentlichte Daten von Ruth Merkle, DKFZ, Lehrstuhl für Systembiologie der Signaltransduktion (Prof. Dr. U. Klingmüller)).

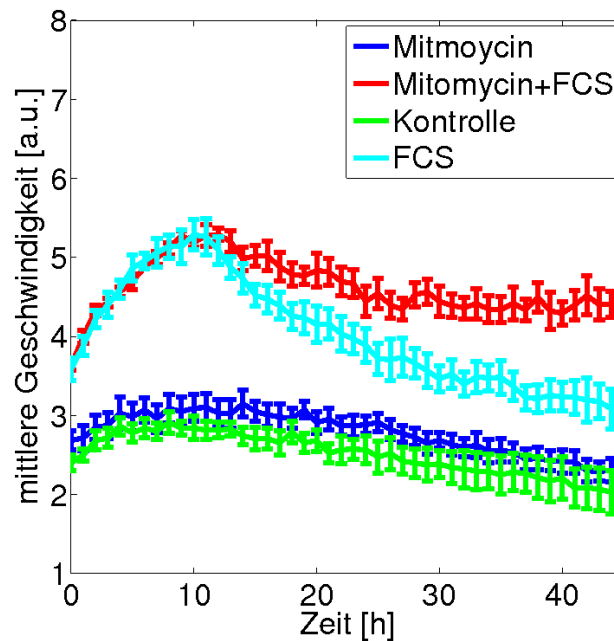


Abbildung 3.10: **Geschwindigkeitsdynamik von Zellen der Zelllinie H1975 nach Stimulation mit Mitomycin**, blau: Stimulation mit Mytomycin, rot: Stimulation mit Mytomycin und FCS, grün: Kontrolle (unstimuliert), hellblau: Stimulation mit FCS.

Bei den Zellen, die nicht mit FCS behandelt wurden, ist zu sehen, dass die Zellen mit Gabe von Mitomycin (blaue Kurve) zu jeder Zeit schneller laufen als die Zellen, denen kein Mitomycin beigefügt wurde (grüne Kurve). Jedoch liegen die Kurven nah beieinander und es ist somit kein eindeutig signifikanter Effekt auszumachen.

3.6 Einfluss von HGF auf die Migration von H1975-Zellen

In diesem Abschnitt stellen wir das Ergebnis eines Datensatzes vor, in dem ein signifikanter Einfluss von HGF und verschiedener Komponenten/Genprodukte des HGF-Signalfades auf die Migration von H1975-Zellen gefunden wurde.

In Abbildung 3.11 ist ein Plot der zeitlich aufgelösten Geschwindigkeitsdynamiken zu sehen. In diesem Experiment wurden die Zellen vor Beginn der Aufzeichnungen gehungert. Die blaue Kurve zeigt die Dynamik für die Kontrollzellen, die nicht weiter stimuliert wurden. Die durchschnittliche Geschwindigkeit dieser Zellen steigt mit der Zeit zunächst stetig an, bis sie nach etwa 18 Stunden ihr Maximum erreicht und dann kontinuierlich sinkt. Bei Zellen, die mit HGF stimuliert wurden, ist die Geschwindigkeit deutlich erhöht (rote Kurve: $40 \frac{ng}{ml}$ HGF,

grüne Kurve: $80 \frac{ng}{ml}$ HGF).

In den Wells mit der höheren Dosis von HGF erreichen die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt ihre maximale Geschwindigkeit als in denen mit der geringeren Dosis HGF. Die Inhibierung von PI3K (siehe Abschnitt 1.1.4.1) bewirkt eine Senkung der mittleren Geschwindigkeit. Die Zellen, denen neben Stimulation mit HGF zusätzlich noch ein MEK-Inhibitor beigefügt wurde, zeigen eine andere zeitliche Geschwindigkeitsdynamik. Nachdem ihre Geschwindigkeit zunächst konstant langsam ist, steigt sie gegen Ende des Versuchszeitraumes an. Die mit MEK-Inhibitor behandelten Zellen sterben jedoch zum Ende des Versuches. Das Gewebe zieht sich daraufhin zusammen und der aufgezeichnete Geschwindigkeitsanstieg ist ein Artefakt, das nichts mit aktiver lebendiger Zellmigration zu tun hat.

In diesem Experiment waren ursprünglich noch weitere Versuchsansätze vorhan-

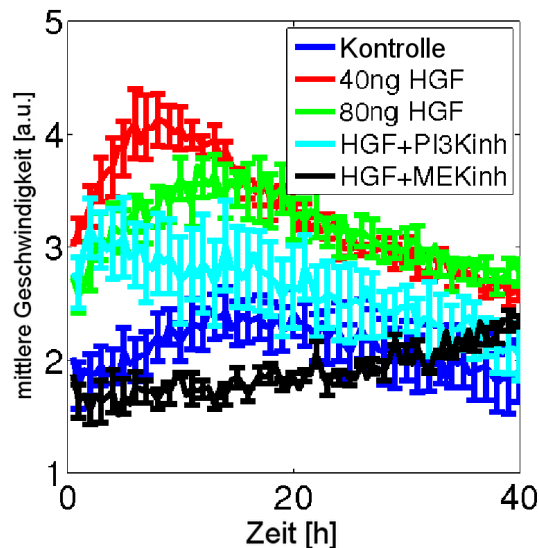


Abbildung 3.11: **Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Stimulation mit HGF**, blau: unbehandelte Kontrolle, rot: Behandlung mit $40 \frac{ng}{ml}$ HGF, grün: Behandlung mit $80 \frac{ng}{ml}$ HGF, hellblau: Behandlung mit $40 \frac{ng}{ml}$ HGF und PI3K-Inhibitor, schwarz: Behandlung mit $40 \frac{ng}{ml}$ HGF und MEK-Inhibitor.

den, in denen die Zellen mit einem AKT-Inhibitor stimuliert wurden. In diesen Wells starben jedoch alle Zellen zeitnah nach Beginn der Aufzeichnung, sodass es nicht sinnvoll erscheint, diese in die Auswertung mit einzubeziehen.

In vielen weiteren Experimenten (hier nicht gezeigt) konnte ein Dosiseffekt von der Stimulation mit HGF auf die Migration von H1975-Zellen ausgemacht werden. Für Dosierungen zwischen 0 und $80 \frac{ng}{ml}$ HGF stieg die mittlere Geschwindigkeit der Zellen an, höhere Dosierung ($120 \frac{ng}{ml}$ HGF) führte zu keinem weiteren An-

stieg. Dieser, in vielen Experimenten nachgewiesene, Dosisseffekt ist jedoch starken Schwankungen von Experiment zu Experiment unterworfen und nicht über alle Wiederholungen der Experimente konsistent. Im in Abbildung 3.11 gezeigten Datenbeispiel ist beispielsweise kein Dosisseffekt zwischen den beiden unterschiedlich hohen Konzentrationen von HGF erkennbar. Insgesamt lieferten die verschiedenen experimentellen Bedingungen Ergebnisse, die auch durch die wechselnde und oft schlechte Datenqualität schwer eindeutig zu interpretieren sind.

Für die Zellen der Zelllinie H1975 konnte in unseren Daten kein Verlust der Zelladhäsion durch HGF festgestellt werden, der für MDCK-Zellen nachgewiesen wurde [20].

3.7 Auswirkung von EGF und IGF auf die Migration von H1975-Zellen

3.7.1 Hintergrund

Auch in dieser Studie liegt das Augenmerk auf der Aktivierung von Wachstumsfaktor-Signalpfaden. Hier betrachten wir die Auswirkung der Stimulation mit IGF und EGF (siehe Abschnitt 1.1.4.2 und 1.1.4.3).

In Studien wurde gezeigt, dass aberrante Stimulation des IGF/IGF1R-Signalpfades und des EGF/EGFR-Signalpfades Migration und Proliferation von Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterstützt. Daher wird in der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) aktuell eine Hemmung des EGF-Signalpfades durch *small compound inhibitors* wie zum Beispiel Erlotinib oder Gefitinib verwendet. Allerdings entwickeln die meisten Patienten Resistenzen, was in vielen Fällen durch die Aktivierung des IGF/IGF1R-Signalpfades bedingt ist [51] [102]. Es ist also notwendig den *Crosstalk* zwischen IGF-Signalübertragung und EGF-Signalübertragung weiter zu untersuchen. Hierfür wurde das Migrationsverhalten von Zellen der Zelllinie H1975 unter Stimulation mit EGF und/oder IGF in *Scratch-Assays* aufgezeichnet.

3.7.2 Ergebnisse

Wie zuvor stellen wir die Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Stimulation mit EGF und/oder IGF dar, die aus den mit PIV berechneten Verschiebungen errechnet wurden. In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse eines Datensatzes dargestellt.

Alle Zellen wurden vor Beginn dieses Experimentes gehungert. Die Zellen, denen fetales Kälberserum (FCS) gegeben wurde, stellen eine Positivkontrolle dar und zeigen somit die maximal möglichen Geschwindigkeiten an, die die Zellen hier erreichen können (rote Kurve). Wie zuvor steigt die Geschwindigkeit über die Zeit zunächst an und fällt nach einem Peak nach etwa 14 Stunden wieder ab.

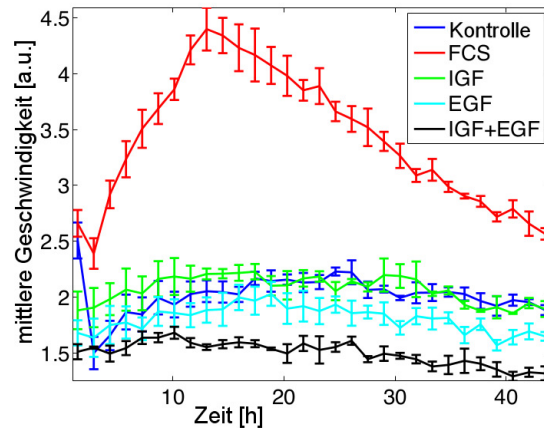


Abbildung 3.12: **Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Stimulation mit EGF beziehungsweise IGF**, blau: unbehandelte Kontrolle, rot: Behandlung mit FCS (Positivkontrolle), grün: Behandlung mit IGF, hellblau: Behandlung mit EGF, schwarz: Behandlung mit EGF und IGF.

Die Beigabe von IGF (grüne Kurve) erhöht die Geschwindigkeit der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (dunkelblau) kaum, die mit EGF behandelten Zellen sind in diesem Fall sogar etwas langsamer. Die kombinierte Gabe von EGF und IGF scheint die Zellgeschwindigkeit überraschenderweise zu reduzieren.

In einem anderen Experiment wurde untersucht, ob nach Inhibierung von EGFR die Migration verringert wird und ob dieser Effekt durch Stimulation mit IGF wieder kompensiert werden kann, also ob nach dem Ausschalten des EGF-Rezeptors IGF dessen Funktion übernehmen kann.

In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis eines Datensatzes zu sehen. Die Zellen, die mit FCS stimuliert wurden (blaue Kurve), migrieren erwartungsgemäß am schnellsten. In den Replikaten, in denen der EGF-Rezeptor inhibiert wurde (rote Kurve: 100 nM EGFR-Inhibitor, hellblaue Kurve: 50nM EGFR-Inhibitor) zeigt sich die Migration der Zellen deutlich verlangsamt, wobei die höhere Dosis des Inhibitors zu einer deutlicheren Geschwindigkeitsreduktion führt. In weiteren Replikaten wurden die Zellen zusätzlich zur Inhibierung des EGF-Rezeptors auch mit IGF stimuliert (grüne Kurve: 100 nM EGFR-Inhibitor plus IGF, schwarze Kurve 50 nM EGFR-Inhibitor plus IGF). Die zusätzliche Stimulation mit IGF erreicht hier für beide Dosen, dass die Geschwindigkeit der Zellen höher ist als in den Replikaten, in denen nur der EGF-Rezeptor inhibiert wurde; allerdings wird nicht die Geschwindigkeit der Positivkontrolle erreicht. Es existiert also ein nachweisbarer *Crosstalk*. Die Inhibierung von EGFR kann durch Gabe von IGF teilweise kompensiert werden.

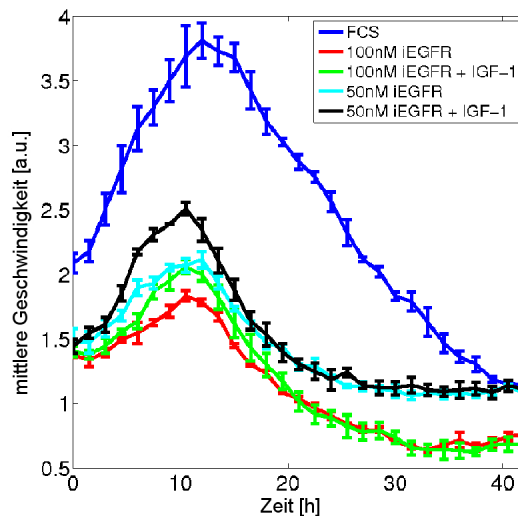


Abbildung 3.13: **Geschwindigkeitsdynamiken von H1975 nach Inhibierung von EGFR und wahlweise Stimulation mit IGF**, blau: Behandlung mit FCS, rot: Behandlung mit 100 nM EGFR-Inhibitor, grün: Behandlung mit 100 nM EGFR-Inhibitor und IGF-1, hellblau: Behandlung mit 50 nM EGFR-Inhibitor, schwarz: Behandlung mit 50 nM EGFR-Inhibitor und IGF-1.

3.8 Einfluss von Stathmin auf die Migration von Keratinozyten in der Wundheilung

In dieser Studie wurden primäre juvenile Keratinozyten konfluent in einem 2D-Migrations-Assay ausgesät und die Migration durch *time-lapse microscopy* aufgezeichnet. In Abbildung 3.14 sind exemplarisch Ausschnitte aus den Daten zu Beginn des Experiments und nach genau einem Tag abgebildet. Um die Schnelligkeit des Spaltschlusses zu analysieren, wurde die relative zellfreie Fläche ausgerechnet, deren Verlauf über die Zeit in Abbildung 3.15 a) zu sehen ist. In Kollaboration mit der Biomedical Computer Vision Group (PD Dr. Karl Rohr) wurde mit dem Algorithmus in [51] ein Einzel-Zell-Tracking für diese Daten erstellt. Durch Auswertung der Einzel-Zell-Tracking-Daten konnten die mittleren Geschwindigkeiten der Zellen in den verschiedenen experimentellen Bedingungen berechnet werden (Abbildung 3.15 b)). Die Geschwindigkeiten der mit Stathmin-siRNA behandelten Zellen sind deutlich kleiner als die der Zellen im Kontrollexperiment. Zudem konnten Heatmaps des Dichteverlaufes der Zellen über die Zeit erstellt werden, die in Abbildung 3.16 dargestellt sind.

Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und zeigten in beiden Fällen vergleichbare Ergebnisse. Weitere Details sind in [132] nachzulesen.

3.8. Einfluss von Stathmin auf die Migration von Keratinozyten in der Wundheilung

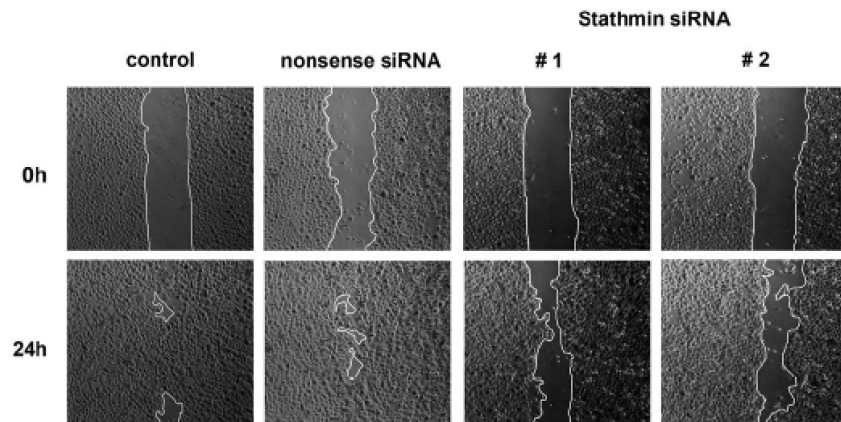


Abbildung 3.14: **Repräsentative Ausschnitte aus den 2D-Migrations-Daten von konfluenten Keratinozyten** zu den Zeitpunkten $t = 0h$ und $t = 24h$. Die Migrationsfront ist als weiße Linie eingezeichnet [132].

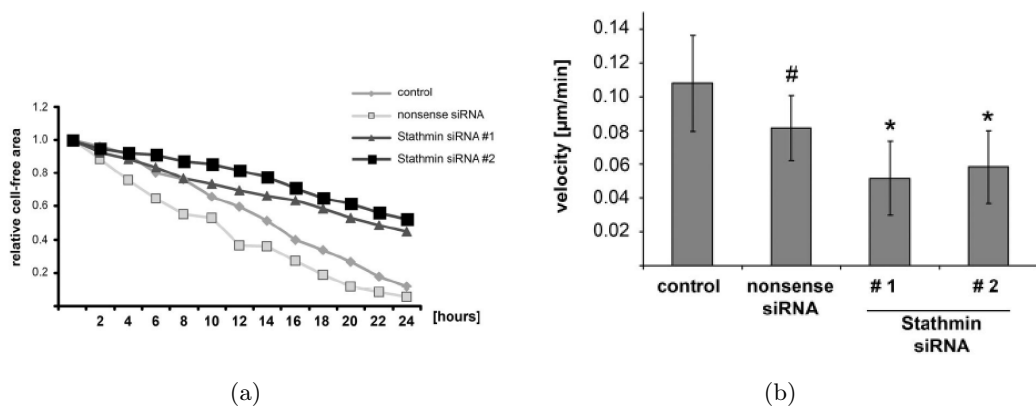
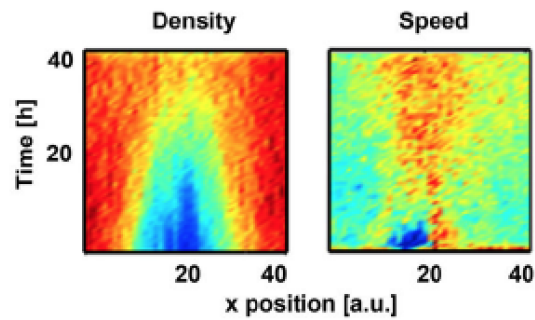
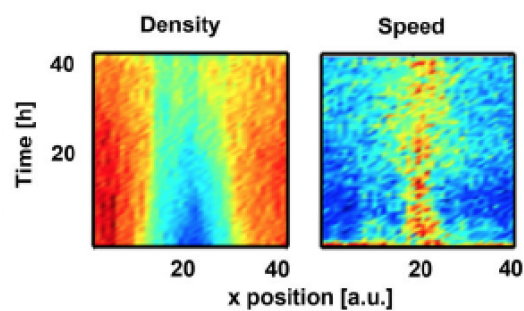


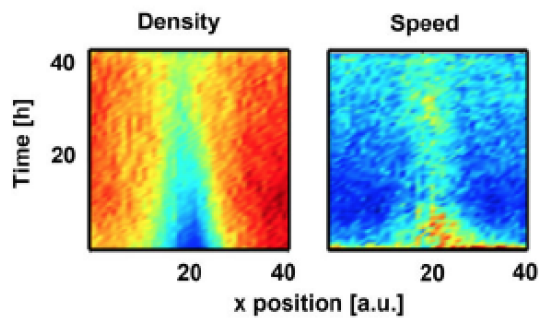
Abbildung 3.15: **Charakteristika des Einflusses von Stathmin auf die Migration von Keratinozyten** a): Relative zellfreie Fläche des Versuchsansatzes [132], b): mittlere Geschwindigkeit für die verschiedenen experimentellen Bedingungen [132].



(a) Nonsense siRNA



(b) Stathmin siRNA



(c) c-Met siRNA

Abbildung 3.16: Heatmaps der Zelldichte (links) und der Geschwindigkeitsverteilung (rechts) während des Spaltschlussprozesses von migrierenden Keratinozyten. Die Profile sind farbkodiert und zeigen den Verlauf über alle Zeitpunkte. Auf der x -Achse ist die Position im Spalt aufgetragen, auf der y -Achse die Zeit. Die Zelldichten wurden in Relation zur Position im Spalt berechnet. Die Farbkodierung für die Dichten reicht von rot (hohe Dichte) bis blau (niedrige Dichte); die Farbkodierung der Geschwindigkeiten erstreckt sich ebenfalls von rot (hohe Geschwindigkeit) bis blau (niedrige Geschwindigkeit) [132].

Ergebnisse der mathematischen Modellierung und Simulation der Zellbewegung

4.1 Fitting der Fisher-Gleichung an *Scratch-Assay*-Daten

Da für die Fisher-Gleichung

$$\frac{\delta n}{\delta t} = r \cdot n \cdot \left(1 - \frac{n}{K}\right) + D \nabla^2 n \quad (4.1)$$

gezeigt wurde, dass sie in Wundheilungsprozessen *traveling waves* erzeugen kann, ergibt sich ein naheliegender Ansatz zur Modellierung des Spaltschlussprozesses im *Scratch-Assay* durch das Fitten dieser Gleichung an eindimensionale Dichteprofile. Für das Fitten der Fisher-Gleichung an die *Scratch-Assay*-Daten werden alle Bilder einer Bilderserie zunächst so rotiert, dass der Spalt auf dem ersten Bild exakt senkrecht im Bild liegt. Hierfür verwenden wir die Statistiksoftware R (siehe Abschnitt 2.1) unter Benutzung der Toolbox EBIImage für R (siehe Abschnitt 2.1). Die Methode zur automatischen Detektion der optimalen Rotation ist denkbar einfach: Für alle möglichen Rotationen von -10° bis 10° (in 0.2° -Schritten), die mit der EBIImage-Funktion *rotate* erzeugt werden, werden die Spaltensummen der Intensitäten berechnet. Ausgewählt wird dann die Rotation, bei der möglichst viele Spaltensummen klein sind (kleiner als eine fest definierte Schranke), also bei der möglichst viele Spalten zellfrei sind. Nach der Rotation der Bilder werden die Intensitätswerte in senkrechter Richtung aufsummiert, sodass man eindimensionale Dichteprofile erhält. An die so erhaltenen Dichteprofile kann nun die Fisher-Gleichung gefittet werden, um für jedes Experiment die drei grundlegenden Parameter zu schätzen, nämlich den Diffusionskoeffizienten D , die Proliferationsrate r und die tragende Kapazität K . Die Fisher-Gleichung wird hierbei für verschiedene Parameterkombinationen mit Hilfe des *ODE-Solvers* *ode15s* in Matlab gelöst. Das Fitting basiert auf dem Minimieren der mittleren quadratischen Abweichung der Fisher-Gleichung von den aus den Daten errechneten Dichteprofilen.

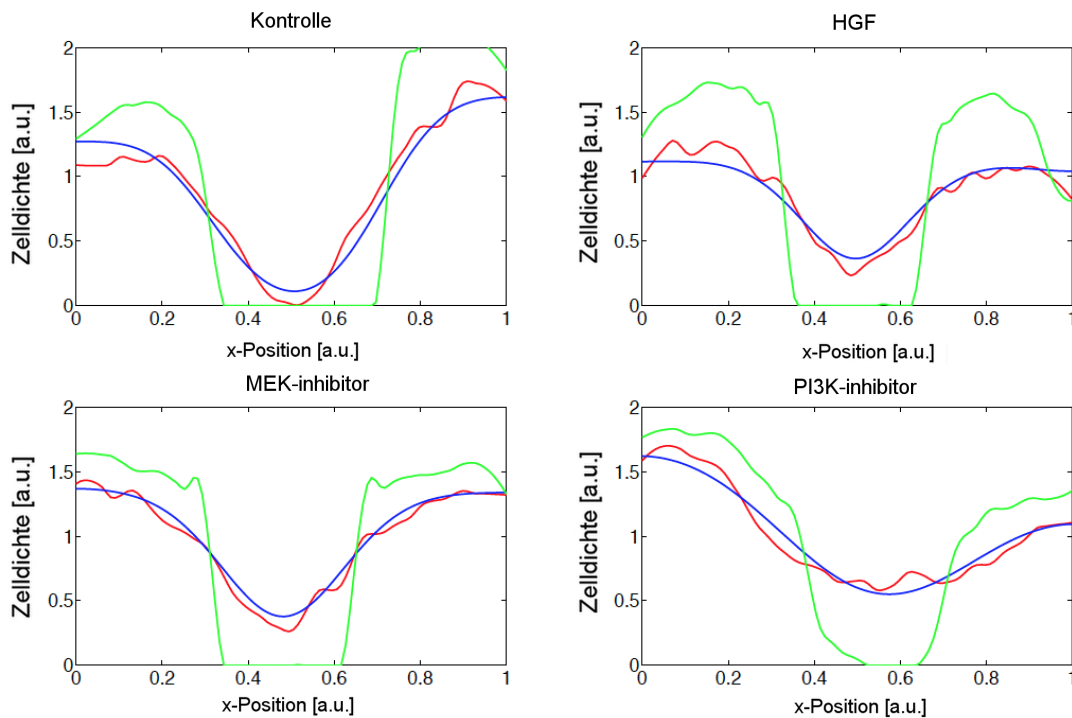


Abbildung 4.1: **Plot von eindimensionalen Dichteprofilen aus experimentellen *Scratch-Assay*-Daten** für die Zelllinie H838 und Fits der Fisher-Gleichung. Die vier Plots gehören zu vier verschiedenen experimentellen Bedingungen. Dargestellt sind das Dichteprofil zum Zeitpunkt $t = 0$ (grüne Kurve), das Dichteprofil zum Ende der Aufzeichnung (rote Kurve) und das gefittete Dichteprofil (blaue Kurve).

Das Fitten dieses Modells an die eindimensionalen Dichteprofile liefert annehmbare Ergebnisse, was in Abbildung 4.1 veranschaulicht ist, in der Dichteprofile und Fit für verschiedene Zeitpunkte dargestellt sind. Vergleicht man die gefitteten Diffusionskoeffizienten mit durchschnittlichen Geschwindigkeiten, die für die gleichen Daten mittels Einzel-Zell-Tracking ermittelt wurden, so ist qualitativ der gleiche Trend sichtbar. Dies ist in Abbildung 4.2 zu sehen, in der diese beiden Größen für Daten von H1975-Zellen, die mit unterschiedlichen Dosen von HGF behandelt wurden, dargestellt sind. Sowohl die gefitteten Diffusionskoeffizienten, als auch die errechneten Geschwindigkeiten steigen mit zunehmender HGF-Konzentration an. Nur der Wert für die höchste Dosis (120 ng/ml) weicht im Fit nach unten hin ab und ist geringer als bei der Kontrolle. Für die Einzel-Zell-Tracking-Daten sind alle drei Werte nach Stimulation mit HGF deutlich größer als der Wert der Kontrolle.

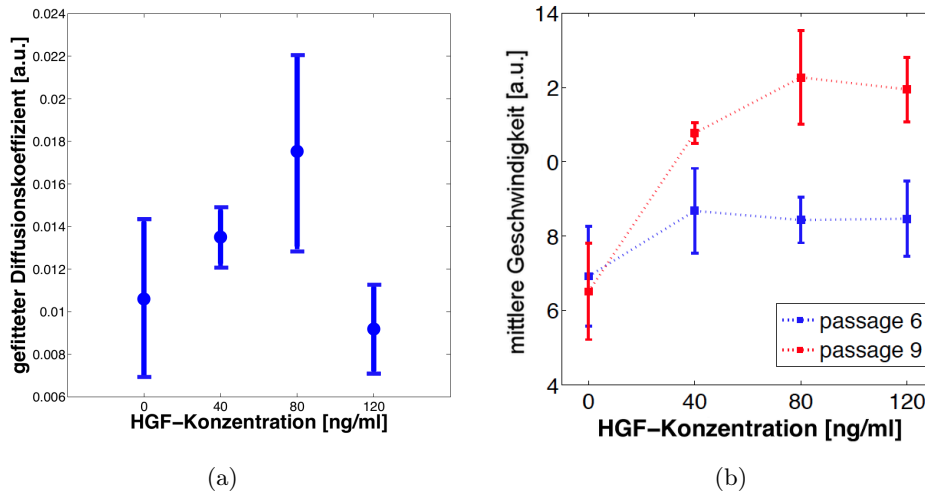


Abbildung 4.2: **Vergleich zwischen Diffusionskoeffizienten aus Fit der Fisher-Gleichung und mittleren Geschwindigkeiten aus Einzel-Zell-Tracking.** a): Diffusionskoeffizienten aus Fit mit Fisher-Gleichung, b): mittlere Geschwindigkeit aus Einzel-Zell-Tracking.

4.1.1 Diskussion des Modellierungsansatzes mit Fisher-Gleichung

Ein zentrales Element der Fisher-Gleichung ist der logistische Wachstumsterm, der biologisch als Proliferation zu deuten ist. Es stellte sich allerdings heraus, dass in den betrachteten Zeitspannen bei den untersuchten Zelllinien kaum Zellteilungen stattfinden. In Kollaboration mit der Biomedical Computer Vision Group (PD Dr. Karl Rohr) wurde ein Zelltracking-Algorithmus ([54]) verwendet, mit dessen Hilfe auch Proliferationsereignisse erfasst werden können. Die Analyse der Ergebnisse zeigte bei der Zelllinie H1975 eine durchschnittliche Wahrscheinlichkeit von $1.3 \cdot 10^{-3}$, dass eine Zelle sich in einer Stunde teilt, das heißt in einer Population von 1000 Zellen sind pro Stunde durchschnittlich nur 1.3 Zellteilungen zu beobachten. Es ist zudem bekannt, dass Proliferation in vielen Zelllinien nicht notwendig für Spaltschluss beziehungsweise Wundheilung ist [32] [33].

Um in diesem Modell *traveling fronts* zu erzeugen, ist Proliferation von großer Bedeutung. In der vorliegenden Situation ist allerdings so wenig Proliferation zu beobachten, dass sie vernachlässigbar ist und somit die Beschreibung mit einem logistischen Wachstumsterm nicht sinnvoll erscheint. Obwohl der Modellierungsansatz basierend auf der Fisher-Gleichung vielversprechende Ergebnisse liefert, werden wir ihn also nicht weiter verfolgen, da in den vorliegenden Daten keine biologische Grundlage für die Anwendung dieses Modells gegeben ist.

Im Folgenden werden wir in Anbetracht der geringen Proliferationsraten in den betrachteten Zeitintervallen Effekte durch Proliferation vernachlässigen. Wir kon-

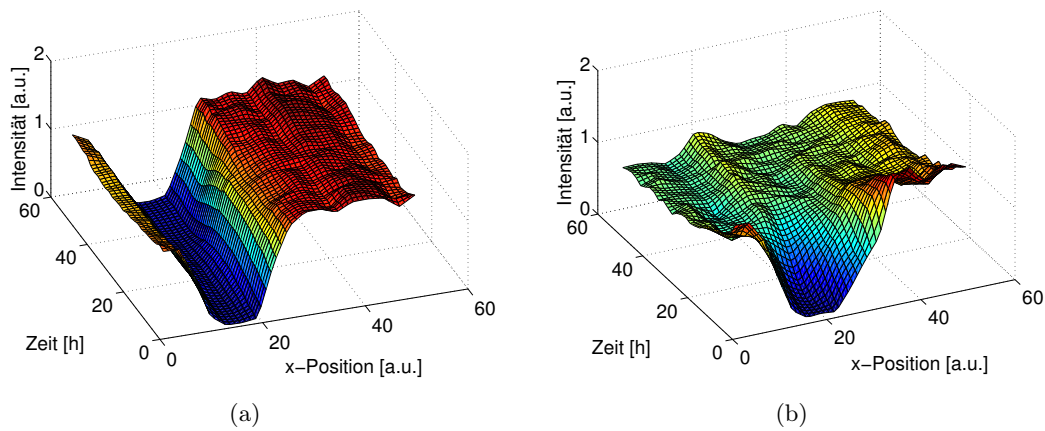


Abbildung 4.3: **Visualisierung von eindimensionalen Dichteprofilen aus *Scratch-Assay*-Daten als *Surface-Plot*.** a) Kontroll-Experiment ohne Stimulation, kein Spaltschluss. b) Stimulation mit 80nM HGF, Spaltschluss nach ca. 24 Stunden.

zentrieren uns daher auf ein anderes Migrationsmodell, das auf mechanischen interzellulären Kräften (Adhäsion) und zufälliger Motilität beruht und das in Abschnitt 2.3 vorgestellt wurde.

4.2 Fitting des kontinuierlichen Modells an experimentelle Daten

Unser Ziel ist es, das in Abschnitt 2.3 vorgestellte Modell zu benutzen, um das Verhalten der Zellen in den vorliegenden Migrationsexperimenten erklären zu können. Im Gegensatz zum einzelzellbasierten Modell, das aufgrund der Stochastizität nicht direkt an experimentelle Daten gefittet werden kann, ist ein direkter Fit der kontinuierlichen Variante (Gleichung 2.39) möglich.

Wir berechnen dafür zunächst eindimensionale Dichteprofile aus den experimentellen Daten wie in Abschnitt 4.1. In Abbildung 4.3 ist der zeitliche Verlauf von diesen für zwei unterschiedliche experimentelle Bedingungen visualisiert. Es sei T die Menge der Zeitpunkte, zu denen die Aufnahmen gemacht wurden und die x -Achse sei in M Boxen diskretisiert: Wir erhalten $p_1^{\text{Daten}}(i, j)$, indem wir (nach Rotation der Originalvideos) die Zellen, die sich zum Zeitpunkt t_j in einer Box mit Mittelpunkt x_i befinden, zählen. Für einen Datensatz mit $M = 50$ Boxen in x -Richtung, $T = 48$ Zeitpunkten und 3 experimentellen Replikaten erhalten wir also beispielsweise eine Matrix p_1^{Daten} der Größe $50 \times 48 \times 3$. Um für den Fitting-Prozess die entsprechenden Parameter des Modells zu bestimmen, folgen wir den Methoden in [98]: Wir betrachten das eindimensionale Problem und schreiben

Gleichung 2.39 bezüglich der Zellseparation $\xi := x - x'$ und des Massenmittelpunktes $\frac{\eta}{2} := \frac{x+x'}{2}$ um. Damit gilt

$$x = \frac{\eta - \xi}{2}, \quad x' = \frac{\eta + \xi}{2}, \quad \text{und} \quad x - x' = \xi, \quad (4.2)$$

und wir erhalten aus Gleichung 2.39

$$\begin{aligned} \frac{\delta p_2(\eta, \xi, t)}{\delta t} &= \nabla^2 p_2(\eta, \xi, t) - F_0 \frac{\delta}{\delta \xi} (F(|\xi|) \operatorname{sgn}(\xi) p_2(\eta, \xi, t)) \\ &\quad - \frac{F_0(N-2)}{2} \left(\frac{\delta}{\delta \eta} + \frac{\delta}{\delta \xi} \right) \int F \left(\left| \frac{\eta + \xi}{2} - x'' \right| \right) \\ &\quad \cdot \operatorname{sgn} \left(\frac{\eta + \xi}{2} - x'' \right) p_3(\xi, \eta, x'', t) dx'' \\ &\quad - \frac{F_0(N-2)}{2} \left(\frac{\delta}{\delta \eta} - \frac{\delta}{\delta \xi} \right) \int F \left(\left| \frac{\eta - \xi}{2} - x'' \right| \right) \\ &\quad \cdot \operatorname{sgn} \left(\frac{\eta - \xi}{2} - x'' \right) p_3(\xi, \eta, x'', t) dx''. \end{aligned} \quad (4.3)$$

Hierbei bezeichnet

$$\operatorname{sgn}(x) = \begin{cases} +1, & \text{falls } x > 0 \\ 0, & \text{falls } x = 0 \\ -1, & \text{falls } x < 0 \end{cases} \quad (4.4)$$

die Vorzeichenfunktion und gemäß der Näherung durch die *Kirkwood-Superposition-Approximation* (KSA) ist die 3-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion gegeben durch

$$p_3(\xi, \eta, x'', t) = \frac{p_2\left(\frac{\eta-\xi}{2}, \frac{\eta+\xi}{2}, t\right) p_2\left(\frac{\eta-\xi}{2}, x'', t\right) p_2\left(\frac{\eta+\xi}{2}, x'', t\right)}{p_1\left(\frac{\eta-\xi}{2}, t\right) p_1\left(\frac{\eta+\xi}{2}, t\right) p_1(x'', t)}. \quad (4.5)$$

Der Term für $p_1(x, t)$ kann als

$$p_1(x, t) = \int_x^{1+x} p_2(\eta, 2x - \eta, t) d\eta \quad (4.6)$$

geschrieben werden. Die KSA-basierte kontinuierliche Variante des Modells wird numerisch gelöst, indem zuerst Zeit und Raum diskretisiert werden. Die resultierenden (nichtlinearen) gewöhnlichen Differentialgleichungen werden dann in Matlab mit *ODE-Solver* ode23s für steife Anfangswertprobleme gelöst. Als Anfangsbedingung wird hier die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung $p_1^{\text{Daten}}(i, t = 0)$ zum Startzeitpunkt $t = 0$ verwendet.

Für die Parameter in der Kraftfunktion werden feste Werte angenommen, nämlich

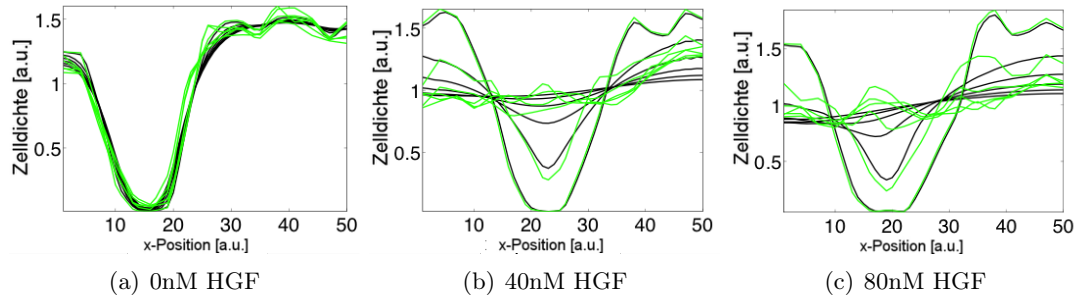


Abbildung 4.4: **Beispiel für Fits des kontinuierlichen Modells an eindimensionale Dichtepprofile von *Scratch-Assay*-Daten** der Zelllinie H1975 mit unterschiedlichen Dosen HGF. Die grünen Linien symbolisieren die Dichtepprofile zu verschiedenen Zeitpunkten, die schwarzen Linien die entsprechenden Fits.

$r_c = 0.05$ (durch Segmentierung von Einzelzellen als sinnvoller Wert für den natürlichen Zellradius ermittelt), $a = 2$ (ziemlich hoch gewählt, d. h. die Zellen sind recht inkompressibel), $\sigma = 2$ (d. h. die Zellen interagieren über eine Distanz von maximal zwei Zelldurchmessern). Für jede Kombination der Parameter D und F_0 kann nun $p_1^{\text{Modell}}(i, j)$ berechnet werden. Es wird der Fehler F_{Fit} zwischen Modell und Daten bestimmt als

$$F_{\text{Fit}} = \frac{1}{M \cdot T} \sum_{i,j} (p_1^{\text{Daten}} - p_1^{\text{Modell}})^2. \quad (4.7)$$

Die Fehler mehrerer experimenteller Replikate für die gleichen experimentellen Bedingungen werden addiert. Mit Hilfe des Matlab-Suchalgorithmus *fminsearch* wird die Parameterkombination D, F_0 bestimmt, für die die Zielfunktion 4.7 minimal wird. Um sicherzustellen, dass nicht nur ein lokales Minimum erreicht wird, sondern ein globales Optimum gefunden wird, wird der Suchalgorithmus mehrfach (zum Beispiel $n = 10$ mal) gestartet. Als Ausgangswerte werden jeweils die „besten“ Parameterwerte p_i^{best} des vorigen Durchlaufes genommen und als

$$\tilde{p}_i = p_i^{\text{best}} \cdot \left(\frac{1}{2} + \epsilon_i\right), \quad (4.8)$$

zufällig abgeändert, wobei $\epsilon_i \in [0, 1]$ eine zufällige Zahl ist. Beispiele für Ergebnisse dieser Fits sind in Abbildung 4.4 abgebildet.

Der Fitting-Prozess liefert Schätzungen für die Modellparameter D (Diffusionskoeffizient) und F_0 (Amplitude der interzellulären mechanischen Kräfte). Für verschiedene experimentelle Konditionen ändert sich der gefittete Wert für F_0 kaum, aber wir erhalten signifikant unterschiedliche Werte für D . In Abbildung

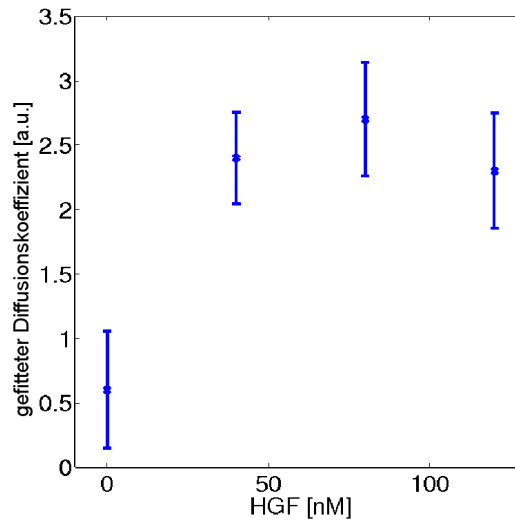


Abbildung 4.5: **Beispiel für mit kontinuierlichem Modell gefittete Diffusionskoeffizienten** für Migration von H1975-Zellen mit unterschiedlichen Dosen HGF.

4.5 zeigen wir auf diese Weise gefittete Diffusionskoeffizienten von Zellen der Zelllinie H1975, die mit unterschiedlichen Dosen HGF stimuliert wurden. Der Diffusionskoeffizient steigt mit zunehmender HGF-Konzentration an, dieses Ergebnis korreliert mit den aus Einzel-Zell-Tracking-Daten ermittelten Geschwindigkeiten für den gleichen Datensatz.

Da im Modell in dieser Form die Zellbewegung im Wesentlichen durch Diffusion gesteuert wird, sind der Diffusionskoeffizient D und die Kraftübertragungskonstante F_0 die Parameter, die den größten Einfluss auf die Migration haben. Der Fitting-Algorithmus könnte angepasst werden, dass die Parameter a , σ und r_c nicht als bekannt vorausgesetzt werden müssen, sondern gleichfalls gefittet werden. Wir werden jedoch in Kapitel 5 eine Methode vorstellen, mit der diese auf andere Weise auch für ein erweitertes Modell inferiert werden können.

Simulationen des Modells in dieser Form zeigen, dass es in der Lage ist, *traveling waves* zu erzeugen, wobei sich im Unterschied zu klassischen *traveling waves* die Form der Wellen leicht verändert und die Amplitude kleiner wird. Auf den ersten Blick scheint das Modell in dieser Form auf zufriedenstellende Weise die Daten zu beschreiben. Doch um zu verstehen, ob das Modell in dieser Form tatsächlich die richtigen Mechanismen beschreibt, vergleichen wir es im nächsten Abschnitt mit den Ergebnissen der Datenanalyse.

4.3 Erweiterung des adhäsionsbasierten Modells und Anpassung an Ergebnisse der Datenanalyse

In Kapitel 2.2.1 haben wir zeitlich aufgelöste Geschwindigkeitsdynamiken aus den *Scratch-Assay*-Experimenten berechnet und festgestellt, dass im Laufe des Experimentes die mittleren Geschwindigkeiten zunächst ansteigen und dann wieder sinken. Im nächsten Schritt ermitteln wir, ob die Resultate des Modellierungsansatzes diesen Ergebnissen der Datenanalyse entsprechen. Hierfür führen wir Simulationen des Modells in der aktuellen Form durch und berechnen die dabei entstehenden Geschwindigkeitsprofile. In Abbildung 4.6 ist der typische Geschwindigkeitsverlauf über die Zeit, der in Simulationen auftritt, abgebildet. Hier wird allerdings deutlich, dass das Modell in der bisherigen Form nicht in der Lage ist, die Dynamiken mit Beschleunigung und nachfolgender Verlangsamung zu erzeugen, sondern dass die Geschwindigkeiten hier im Laufe der Zeit stetig geringer werden ohne jemals anzusteigen. Im bisherigen Modell scheint also etwas zu fehlen, das es erforderlich macht, nochmals genauer zu ermitteln, was bei kollektiver Zellmigration passiert.

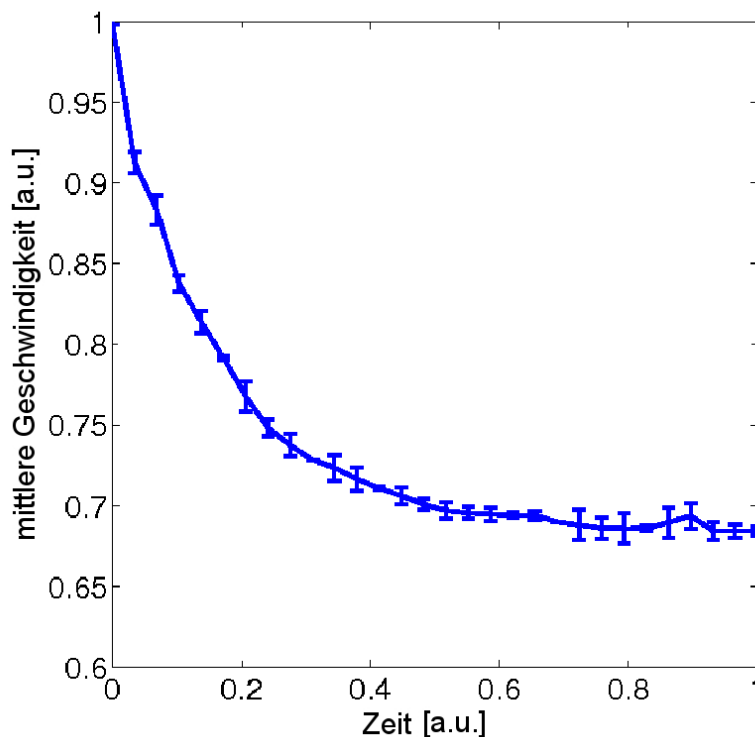


Abbildung 4.6: **Typischer Geschwindigkeitsverlauf** (gemittelt über alle Zellen) aus einer Simulation des Modells in Gleichung 2.39.

4.3.1 Progressive Aktivierung der Zellbewegung bei kollektiver Zellmigration

Zu Beginn des Wundschlussexperimentes haben die Zellen, die sich am Rand des Spaltes befinden, neben sich freie Fläche und somit keine Kontaktinhibierung zum Spalt hin. Folglich polarisieren sie in dieser Richtung [76]. Durch das polarisierte Zytoskelett migrieren Zellen der von uns betrachteten Zelllinien dann in die freie Fläche. Sie sind allerdings noch durch Kräfte der Zell-Zell-Adhäsion mit den in „zweiter Reihe“ befindlichen Zellen verbunden und „ziehen“ somit an diesen, woraufhin diese Zellen ebenfalls in Richtung der freien Fläche polarisieren [76] und migrieren. Sobald diese sich bewegen, üben sie den gleichen Effekt auf die wiederum hinter ihnen befindlichen Zellen aus und so weiter. Also kommt es zu einer progressiven Aktivierung der Zellbewegung [157]. Dieser Effekt wird in Abbildung 4.7 veranschaulicht, die den Beschreibungen in [157] nachempfunden ist. Es entsteht eine aktive, gerichtete Bewegung mit Persistenz in der Bewegungsrichtung. Im Modell, das durch Gleichung 2.19 gegeben ist, reagieren die Zellen zu jeder Zeit instantan auf die Positionen bzw. ausgeübten Kräfte der umliegenden Zellen, das heißt sie verändern in jedem Zeitpunkt ihre Richtung und Geschwindigkeit in Reaktion auf Kräfte durch die umliegenden Zellen und durch Diffusion. Eine progressive Aktivierung der Migration kann im Modell in dieser Form allerdings nicht erzeugt werden. Die hierfür nötige aktive Bewegung ist im Modell nicht enthalten. Der Spalt wird geschlossen, da die Zellen ein Kräftegleichgewicht anstreben, bei dem sich Adhäsion und Abstoßung ausgleichen. Um den Spalt zu schließen, müssen die Zellen initial also leicht komprimiert sein. Die Kompression nimmt aber monoton ab, wenn die Zellen sich in den Spalt bewegen. Auf diese Weise kann folglich kein Anstieg in den Zellgeschwindigkeiten entstehen, aus allen Simulationen des Modells wird eine stetig sinkende Geschwindigkeitsdynamik berechnet. Um die oben beschriebene progressive Aktivierung der Zellbewegung im Modell beschreiben zu können, muss man davon ausgehen, dass die Zellen sich an eine mechanische Stimulation für eine gewisse Zeit „erinnern“ können und durch die Kräfte der benachbarten Zellen einen Drift in eine Richtung erhalten, der eine gewisse Zeit anhält. Daher werden wir im nächsten Abschnitt unser Modell durch einen weiteren Term ergänzen, der gerichtete Bewegung modelliert und diesem Effekt Rechnung trägt.

4.3.2 Integration von persistenter gerichteter Bewegung

In diesem Abschnitt passen wir unser Modell so an, dass Zellen nicht ausschließlich instantan auf mechanische Stimuli von Nachbarzellen reagieren, sondern sich an mechanische Stimuli für einen gewissen Zeitraum erinnern können. Das in diesem Abschnitt vorgestellte erweiterte Modell entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Alistair M. Middleton.

Um die Eigenbewegung der Zelle zu simulieren, führen wir deshalb neben dem

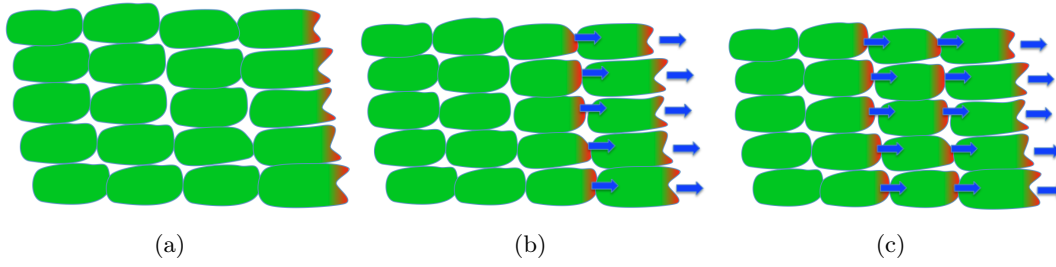


Abbildung 4.7: **Illustration der progressiven Aktivierung der kollektiven Zellbewegung**, vgl. Beschreibung in [157]. Teilbild a): Eine dicht gepackte Monolage von Zellen polarisiert in Richtung der freien Fläche auf der rechten Seite, Teilbild b): Die Frontzellen beginnen nach rechts zu migrieren und „ziehen“ an den Zellen in zweiter Reihe, die ebenfalls polarisieren und in Folge gerichtet migrieren, Teilbild c): Der Effekt wird durch die Zellschichten weiter nach hinten durchgegeben.

stochastischen Term ξ_i , der ungerichtete (zufällige) Eigenbewegung beschreibt, noch einen zweiten Term \mathbf{x}_i^* ein, der gerichtete Eigenbewegung modelliert. Wir nehmen hierbei an, dass die gerichtete Eigenbewegung durch interzelluläre Kräfte, die von benachbarten Zellen auf eine Zelle einwirken, angeregt wird. Die Stärke dieses Einflusses sei durch eine Proportionalitätskonstante A_0 gegeben. Die Persistenz wird durch eine charakteristische Relaxations-Zeitlänge τ modelliert, für die eine Zelle sich an die mechanische Stimulation durch die Nachbarzellen „erinnert“ wird. Um die Übersicht zu behalten, setzen wir im Folgenden abkürzend

$$\mathbf{F}_{i,k} = F_0 \cdot F(\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_k\|) \frac{\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_k}{\|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_k\|}. \quad (4.9)$$

Das Modell (vergleiche Gleichung 2.19 für die ursprüngliche Version) wird durch den Term für gerichtete Eigenbewegung nun erweitert zu

$$\frac{d\mathbf{x}_i}{dt} = \underbrace{\sum_{k,k \neq i} \mathbf{F}_{i,k}}_{\text{interzelluläre Kräfte}} + \underbrace{\mathbf{x}_i^*}_{\text{gerichtete Eigenbewegung}} + \underbrace{\xi_i}_{\text{ungerichtete Eigenbewegung}}, \quad (4.10)$$

$$\frac{d\mathbf{x}_i^*}{dt} = \underbrace{\frac{1}{\tau}}_{\text{Gedächtnis-Dauer}} \left(A_0 \sum_{k,k \neq i} \mathbf{F}_{i,k} - \mathbf{x}_i^* \right). \quad (4.11)$$

Die progressive Aktivierung der Migration kann mit Wellen von ERK-Aktivierung assoziiert werden, die in MDCK-Zellen beobachtet wurden. Die Wellen beginnen

an der Front und werden durch die Zellschichten nach hinten übertragen [93]. Diese chemische Komponente ist in unserem Modell allerdings nicht berücksichtigt und nicht notwendig.

Um dieses Gleichungssystem (4.10, 4.11) zu simulieren, verwenden wir das Euler-Maruyama-Verfahren zur Lösung von stochastischen Differentialgleichungen ([117], [75]) mit Schrittweite $\Delta t = 10^{-4}$ im Zeitintervall $t \in [0, 1]$. Für weitere Analysen werden 48 dieser Zeitpunkte (in gleichmäßigen Intervallen) gespeichert. Abbildung 4.8 zeigt einen typischen durchschnittlichen Geschwindigkeitsverlauf bei Simulation des Modells mit dem neuen Term für aktive gerichtete Bewegung im Vergleich zu Simulation ohne Drift und Gedächtnis.

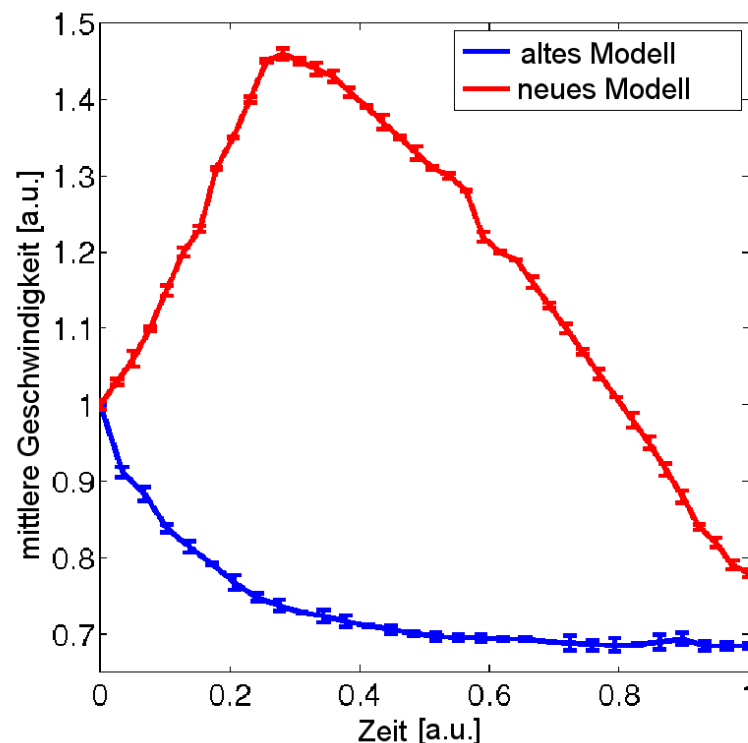


Abbildung 4.8: **Qualitativer Vergleich des Geschwindigkeitsverlauf im Modell mit und ohne Term für gerichtete Bewegung.** Blaue Linie: Geschwindigkeitsverlauf aus Simulation des Modells ohne Gedächtnisterm, rote Linie: Geschwindigkeitsverlauf aus Simulation des Modells mit Gedächtnisterm (jeweils gemittelt über alle Zellen).

Das um den Gedächtnisterm zur Simulation von gerichteter Eigenbewegung erweiterte Modell ist nun also in der Lage, die aus der Datenanalyse errechneten Geschwindigkeitsdynamiken zu erklären. Darüber hinaus kann das Modell in die-

ser Form ein breites Spektrum an Phänotypen der kollektiven Migration erzeugen, die wir in den Daten gesehen haben. Abhängig von der Wahl der Parameter entstehen so beispielsweise zelluläre Brücken, Finger-ähnliche Fronten oder Spaltschluss der Zellen als geschlossene gerade Front, siehe Abschnitt 4.4 für Details und Beispiele.

4.4 Beispiele für Simulationen des Modells

In der Simulation des Modells wird die Situation im *Scratch-Assay* durch Positionierung der Zellen zum Startzeitpunkt nachempfunden. Es werden N_x Zellen in x -Richtung und N_y Zellen in y -Richtung platziert, in einer Simulation werden somit $N_x \cdot N_y$ Zellen betrachtet. Der Bereich in der Mitte wird entsprechend dem Spalt im *Scratch-Assay* zellfrei gehalten. Um ähnliche Abmessungen wie im *Scratch-Assay* zu erzeugen, wird das Gebiet in y -Richtung dreimal so groß gewählt wie in x -Richtung. Die Zellen am Rand des Spaltes werden zu Beginn „stimuliert“, d.h. sie „erinnern“ sich, dass sie sich in Richtung des Spaltes bewegen wollen. Dies simuliert die Stimulation durch mechanischen Stress nach Entfernen des Inserts und das Fehlen von Kontaktinhibition durch die freie Fläche. Wir setzen also als Anfangsbedingung

$$\mathbf{x}^*(t=0)|_{\text{Front}} = \begin{pmatrix} \pm\theta \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (4.12)$$

Der Parameter θ gibt hierbei die Stärke der anfänglichen Stimulation an. In Abbildung 4.9 sind Beispiele von Simulationen unter verschiedenen Parameterkombinationen gegeben. In Teilbild a) wurde für die Simulation ein recht kleiner Wert für die Amplitude A_0 des Drift-Terms gewählt und die Zellen an der Front wurden zu Beginn nicht stimuliert ($\theta = 0$). Dies führt zu einem Spaltschluss als geschlossene Front. Mit anfänglicher Stimulation und einem größeren Wert für A_0 ergeben sich in Teilbild b) zelluläre Brücken. In der Simulation in Teilbild c) ist der Wert für den natürlichen Zellradius r_c , der im Morse-Potential die räumliche Distanz, in der die Adhäsionskräfte wirken, reguliert, recht klein gewählt. Dadurch werden die Adhäsionskräfte verändert und die Zellen an der Front werden von den Zellen im Hintergrund zurückgehalten. Es entstehen Finger-artige Strukturen an der Front (siehe Teilbild c)). In allen drei gezeigten Simulationen wurden $20 \cdot 240$ Zellen simuliert. Es werden periodische Randbedingungen gewählt, sodass die Zellbewegung auf einem n -dimensionalen Torus $[0, L]^n$ stattfindet, wobei L die (charakteristische) Länge des Definitionsbereiches bezeichnet. Die Parameterkombinationen der in Teilbild a) gezeigten Simulation lautet

$$D = 0.001, F_0 = 1, a = 1.818, r_c = 0.0333, \sigma = 1.2, \theta = 0, A_0 = 20, \tau = 0.0988;$$

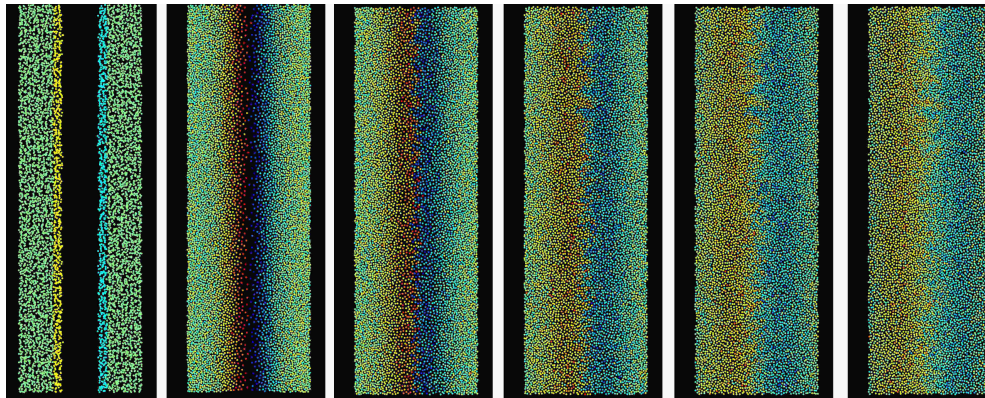
in Teilbild b) wurde

$$D = 0.01, F_0 = 1, a = 1.818, r_c = 0.0399, \sigma = 2, \theta = 1, A_0 = 100, \tau = 3.1623$$

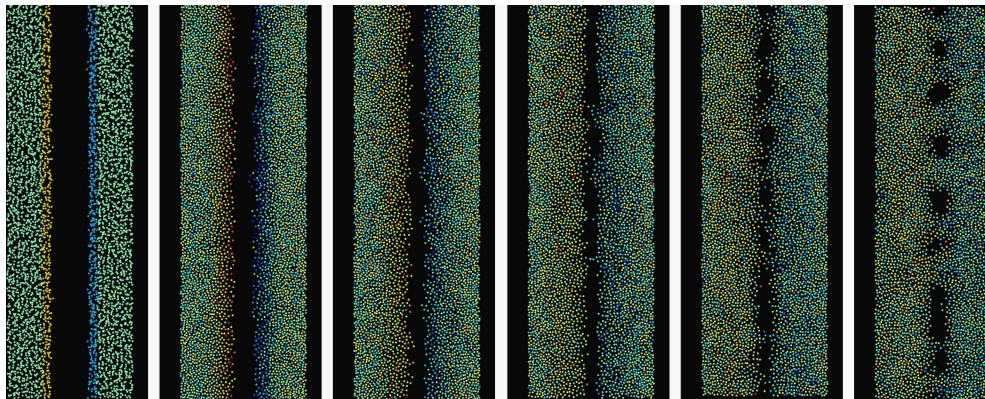
und in Teilbild c) wurde

$$D = 0.01, F_0 = 1, a = 1.818, r_c = 0.03, \sigma = 2, \theta = 1, A_0 = 100, \tau = 3.1623$$

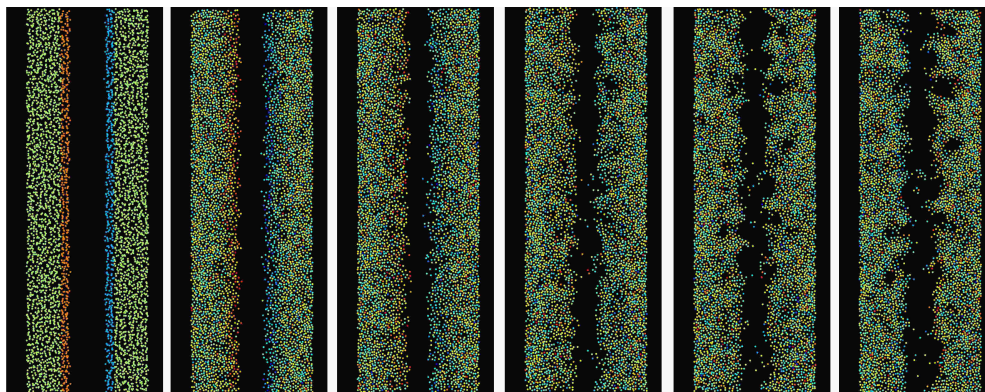
verwendet. Hier wird deutlich, dass das Modell die wesentlichen Phänotypen der Migration von NSCLC-Zellen reproduzieren kann, die in den zur Verfügung stehenden experimentellen Daten beobachtet werden konnten (vergleiche Abbildung 1.8). Darüber hinaus entstehen in den Simulationen des Modells weitere Phänomene, die in den Daten auftauchen, wie zum Beispiel „Löcher“ im Gewebe (siehe Abbildung 4.10) oder sich vom Gewebe ablösende Zellen (siehe Abbildung 4.11). Die Zellen an der Front von Fingern sind in der Simulation oft größer als die Zellen im Hintergrund und entsprechen so dem allgemeinen Verständnis von *Leader*-Zellen [118], die sich aus „normalen“ Zellen entwickeln (siehe Abbildung 4.12). Die explizite Einführung von *Leader*-Zellen mit abweichenden Eigenschaften ist hierfür nicht notwendig.



(a) Front-artiger Spaltschluss



(b) Zelluläre Brücken



(c) Finger

Abbildung 4.9: **Simulationen des Modells.** a) Front-artiger Spaltschluss; b) Zelluläre Brücken; c) Finger-artige Strukturen.

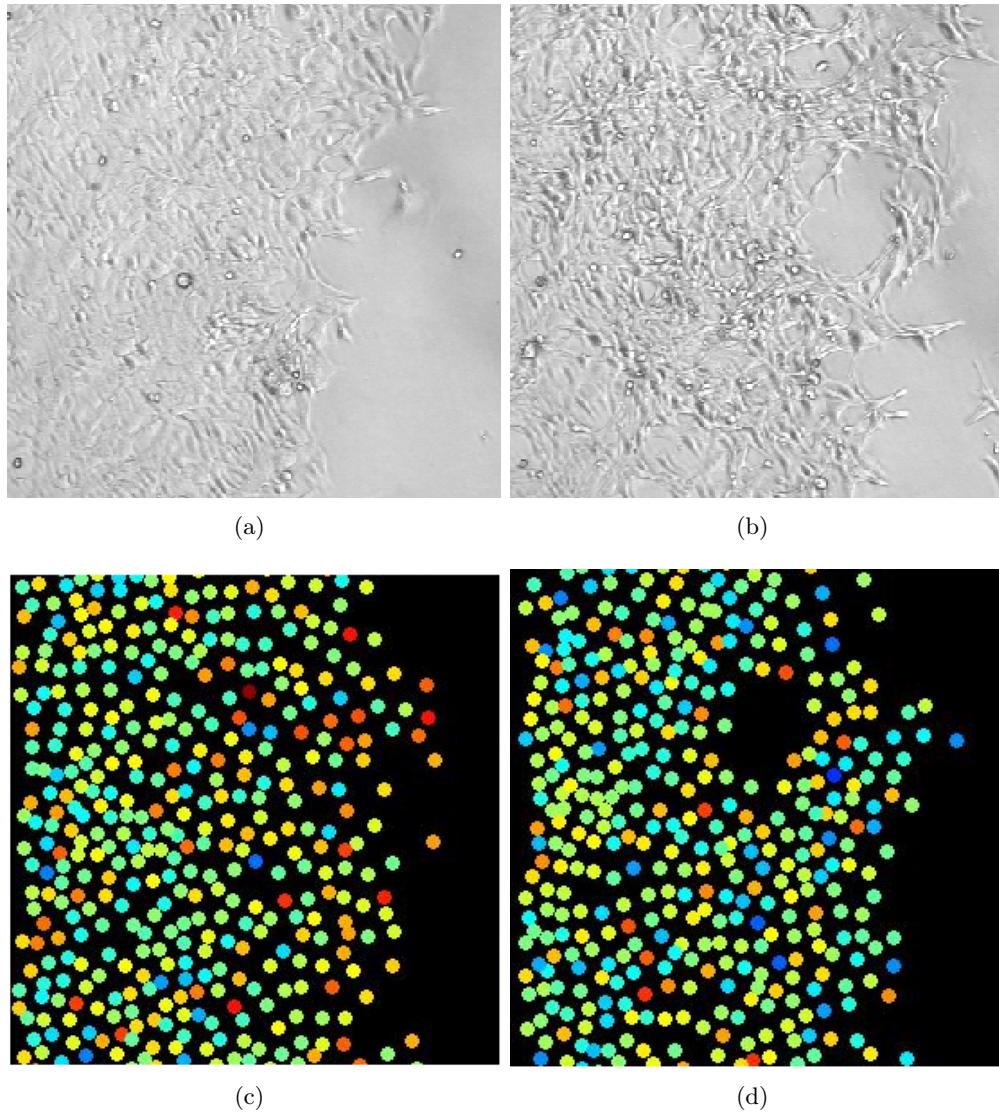


Abbildung 4.10: **Bildung von Löchern im Gewebe** in Experiment (a): früher Zeitpunkt, b): später Zeitpunkt in Experiment mit H1975-Zellen, die mit $100 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ EGF stimuliert wurden) und Simulation (c): früher Zeitpunkt, d): später Zeitpunkt).

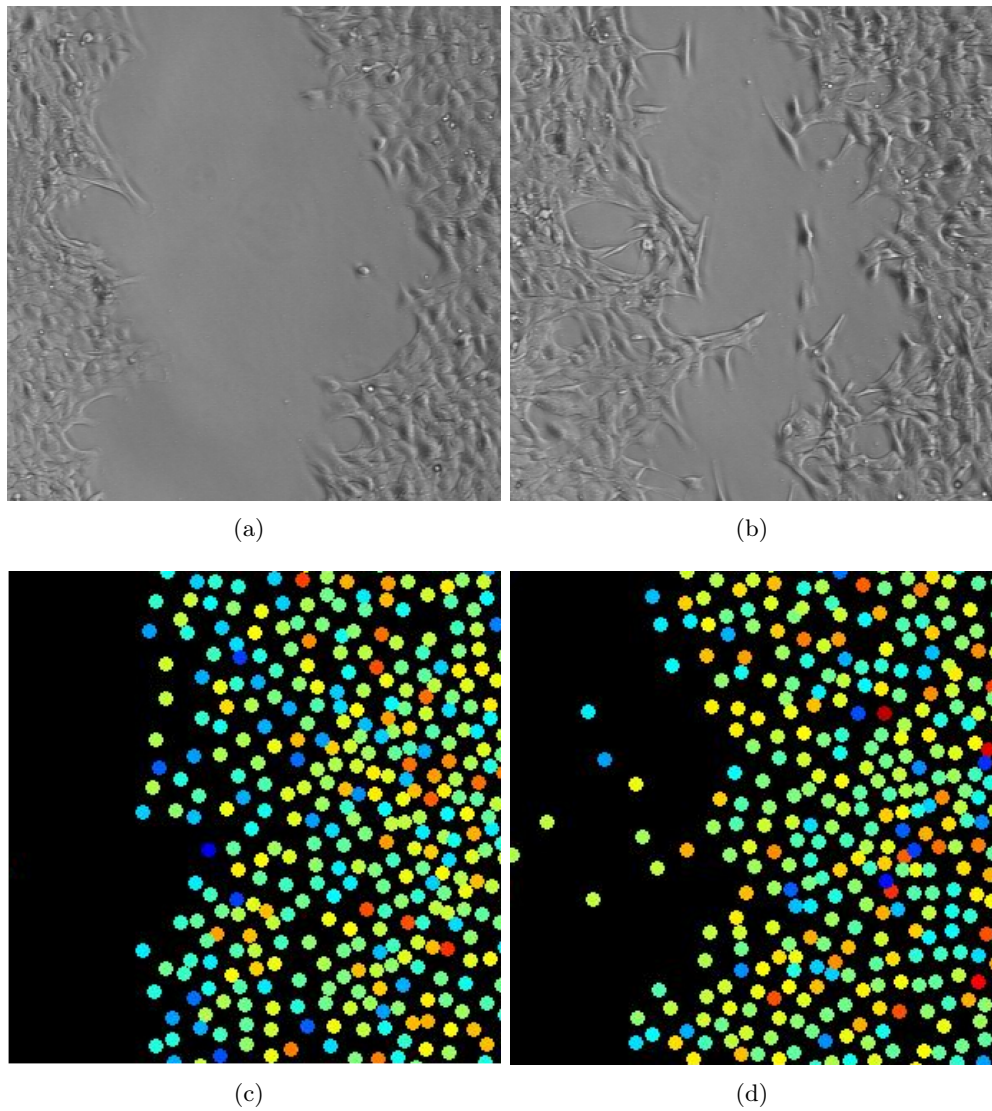


Abbildung 4.11: **Vom Gewebe abgelöste Zellen** in Experiment (a): früher Zeitpunkt, b): später Zeitpunkt) in Experiment mit H1975-Zellen, die mit $100 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ EGF stimuliert wurden) und Simulation (c): früher Zeitpunkt, d): später Zeitpunkt.)

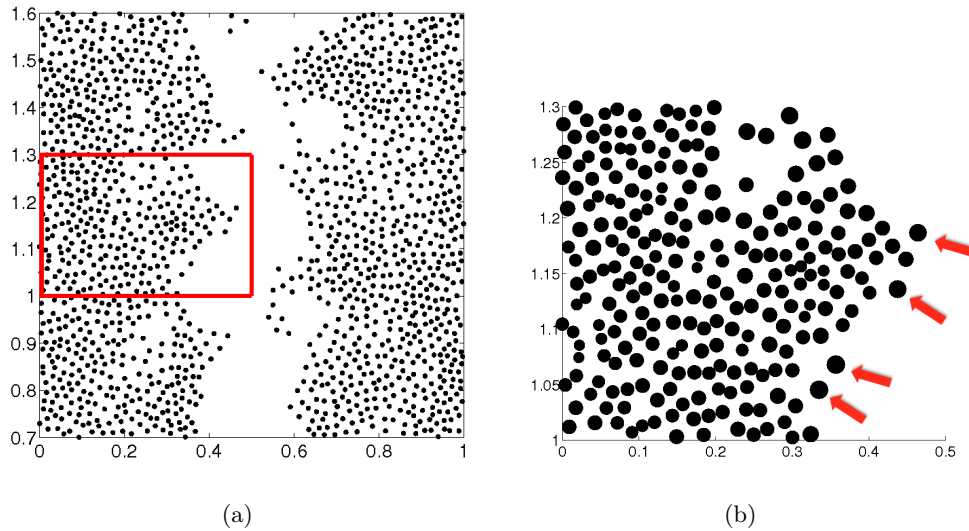


Abbildung 4.12: **Bildung von *Leader*-Zellen in der Simulation.** a) Ausschnitt aus Simulation mit Bildung eines „Fingers“. Abgebildet sind die Massennittelpunkte von Zellen in einer Simulation. b) Vergrößerung des rot umrandeten Bereiches aus a). Die Größe jeder Zelle in der Abbildung ist proportional zum Abstand zu ihrem nächsten Nachbarn. Die Zellen an der Front des Fingers (rote Pfeile) weisen größere Abstände zu ihren Nachbarzellen auf, als die dahinter liegenden Zellen, sie sind also größer als die anderen Zellen. Dies entspricht den allgemeinen Beobachtungen zu *Leader*-Zellen.

Modellbasierte Inferenz von Parametern

Für das erweiterte Modell können wir aufgrund der gekoppelten Differentialgleichungen keine kontinuierliche Version angeben. Somit besteht keine Möglichkeit, dieses Modell direkt an experimentelle Daten zu fiten. Zusätzlich zu den Parametern auf Gewebeebene, die wir mittels der Datenanalyse extrahieren können, wollen wir jedoch trotzdem weitere Parameter bestimmen. Wir beschäftigen uns in diesem Kapitel mit der Invertierung des Modellproblems, durch die wir aus experimentellen Daten Rückschlüsse auf zellbasierte Modellparameter ziehen können. Die hier vorgestellten Methoden basieren auf intensiver Zusammenarbeit mit Dr. Alistair M. Middleton.

5.1 Korrelationsfunktionen

Für die im Folgenden vorgestellte Methode benötigen wir zwei Korrelationsfunktionen. In Abschnitt 2.3.3 haben wir bereits die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $P_{i,j}(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t)$ definiert, die die Wahrscheinlichkeit angibt, dass sich die Zelle i zum Zeitpunkt t an der Position $\mathbf{x} = (x, y)$ und Zelle j an der Position $\mathbf{x}' = (x', y')$ befinden. Diese ist assoziiert mit der Dichtekorrelationsfunktion $P_2(x, y, r, \theta, t)$, die die erwartete Anzahl von Zellen angibt, die sich zum Zeitpunkt t in einer Distanz r in Richtung eines Winkels θ von einer Zelle an Position (x, y) befinden. Wegen des Gedächtnisterms im neuen Modell benötigen wir zusätzlich eine weitere Funktion $Q(\mathbf{x}, t, \mathbf{y}', \mathbf{y}'', t')$, die die Wahrscheinlichkeit angibt, dass eine Zelle, die sich zum Zeitpunkt t an der Position $\mathbf{x} = (x, y)$ befindet, sich zum Zeitpunkt $t' < t$ an der Position \mathbf{y}' befand und eine weitere Zelle sich an der Position \mathbf{y}'' befand, beziehungsweise die Funktion $Q(x, y, t; \rho, \psi, t')$, die für eine Zelle an der Position (x, y) die erwartete Anzahl an Zellen zum Zeitpunkt t , die sich zu einem Zeitpunkt $t' < t$ in einer Distanz ρ und einem Winkel ψ von (unabhängig von ihrer Position) befanden, angibt. Die Funktion $P_2(x, y, r, \theta, t)$ enthält also Informationen über die Anzahl von Zellen in einer bestimmten Nachbarschaft einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. $Q(x, y, t; \rho, \psi, t')$ hingegen enthält

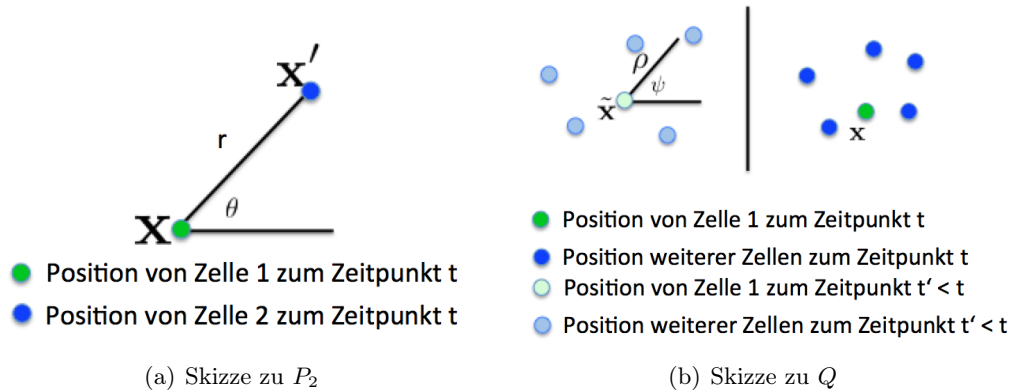


Abbildung 5.1: **Skizze zu den Korrelationsfunktionen P_2 und Q .** a) $P_2(\mathbf{x}, r, \theta, t)$ gibt für eine Zelle, die sich zum Zeitpunkt t an der Position $\mathbf{x} = (x, y)$ befindet, Informationen über die Anzahl der Zellen an der Position \mathbf{x}' im Winkel θ und Distanz r von \mathbf{x} . b) Für eine Zelle, die sich zum Zeitpunkt t an der Position \mathbf{x} befindet, gibt $Q(\mathbf{x}, t; \rho, \psi, t')$ Informationen über die Anzahl der Zellen, die sich zum Zeitpunkt $t' < t$ in Abstand ρ und Winkel ψ von der Position der Zelle zum Zeitpunkt t' befanden. An welcher Position (in der Zeichnung als $\tilde{\mathbf{x}}$ markiert) sich die Zelle zu diesem Zeitpunkt befand, ist hierbei irrelevant.

Informationen darüber, wie sich die Nachbarschaftsstrukturen verändert haben, während die Zelle migriert ist. Bei der Bestimmung von Q ist die Position der Zelle zum Zeitpunkt t' nicht wichtig, benötigt wird nur die Information über die mechanischen Stimuli durch Nachbarzellen, die zu diesem Zeitpunkt auf die Zelle eingewirkt haben. Durch diese kann nämlich eine aktive persistente Bewegung angeregt worden sein, die das Verhalten der Zelle zum Zeitpunkt t noch beeinflusst.

Um das Verständnis zu erleichtern, was P_2 und Q beschreiben, ist ihre Bedeutung in Abbildung 5.1 skizziert. Beide Größen sind direkt aus experimentellen Daten rekonstruierbar (siehe unten, Abschnitt 5.3). Um aus experimentell ermittelten Größen auf direkte Weise mechanische Parameter für die Interaktion von Zellen inferieren zu können, schreiben wir im nächsten Abschnitt die lokal gemittelten Geschwindigkeitsvektoren der Zellen als Funktion der Korrelationsfunktionen $P_2(x, y, r, \theta, t)$ und $Q(x, y, t; \rho, \psi, t')$.

5.2 Integralgleichung für räumlich-lokal gemittelte Geschwindigkeitsvektoren

In Analogie zu den Datenauswertungen mit Particle Image Velocimetry, die uns lokale Geschwindigkeiten von Gruppen von Zellen liefern, betrachten wir nun auch hier räumlich-lokal gemittelte Geschwindigkeitsvektoren (*bulk cell velocities*). Im Fokus stehen also nicht Geschwindigkeiten von einzelnen Zellen, sondern lokal gemittelte Geschwindigkeiten einer Gruppe von Zellen. Wir betrachten das Gewebe an einer Stelle $\mathbf{x} := (x, y)$. Es bezeichne u die x -Komponente der Geschwindigkeitsvektoren, sowie v die y -Komponente der Geschwindigkeitsvektoren und es sei $\mathbf{u} = (u(\mathbf{x}), v(\mathbf{x}))$. Dann ist

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = \left\langle \frac{d\mathbf{x}_i}{dt} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_i(t)) \right\rangle \quad (5.1)$$

der lokale gemittelte Geschwindigkeitsvektor des Gewebes mit dem Mittelpunkt $\mathbf{x} = (x, y)$. Wir setzen die neue Modellgleichung (Gleichung 4.10) in Gleichung 5.1 ein. Damit erhalten wir nach Umsortieren der Terme

$$\begin{aligned} \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = & F_0 \int F(\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|) \frac{\mathbf{x} - \mathbf{x}'}{\|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\|} P_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t) d\mathbf{x}' \quad (5.2) \\ & + A_0 F_0 \int_0^t e^{-(t-t')/\tau} \int F(\|\mathbf{y}' - \mathbf{y}''\|) \frac{\mathbf{y}' - \mathbf{y}''}{\|\mathbf{y}' - \mathbf{y}''\|} Q(\mathbf{x}, \mathbf{t}; \mathbf{y}', \mathbf{y}'', \mathbf{t}') d\mathbf{y}'' dt' \\ & + e^{\frac{t}{\tau}} \cdot \mathbf{x}^*(t = 0), \end{aligned}$$

wobei P_2 die Dichtekorrelationsfunktion (siehe Abschnitt 2.3.3 oben) und Q deren Änderung über die Zeit bezeichnet. Der erste Term in der Gleichung für $\mathbf{u}(\mathbf{x}, t)$ beschreibt direkte interzelluläre Kräfte, wobei die Dichtekorrelationsfunktion $P_2(\mathbf{x}, \mathbf{x}', t)$ mit der Funktion F , die die interzellulären Kräfte beschreibt, multipliziert wird. Das Produkt wird über die Zellnachbarschaft integriert. Der zweite Term beschreibt die gerichtete Eigenbewegung der Zellen. Hierfür wird zunächst die Funktion $Q(\mathbf{x}, \mathbf{t}; \mathbf{y}', \mathbf{y}'', \mathbf{t}')$ mit F multipliziert und dieses Produkt über die Zellnachbarschaft integriert. Daraus ergibt sich die resultierende Kraft, die zu Zeitpunkt t' auf die Zelle wirkt. Diese wird mit einer Exponentialfunktion multipliziert, die die Länge des Gedächtnisses widerspiegelt und dann über die Zeit t' integriert. Der Term $\mathbf{x}^*(t = 0)$ bezeichnet die Stimulation der Zellen zu Beginn des Experimentes beziehungsweise der Simulation.

Da die interzellulären Kräfte, die von der Funktion F beschrieben werden, nur eine begrenzte Reichweite haben und das Problem radialsymmetrisch ist, ist es sinnvoll, die rechte Seite der Gleichung in Polarkoordinaten zu transformieren. Die Position \mathbf{x}' kann also in Abhängigkeit der Position \mathbf{x} und ihrem Abstand r und Winkel θ von dieser geschrieben werden. Ebenso kann die Position \mathbf{y}'' in

Abhängigkeit der Position \mathbf{y}' und ihrem Abstand ρ und Winkel ψ von dieser geschrieben werden. Hierfür setzen wir also

$$\mathbf{x}' = \mathbf{x} + r(\cos(\theta), \sin(\theta)) \quad \text{und} \quad \mathbf{y}'' = \mathbf{y}' + \rho(\cos(\psi), \sin(\psi)). \quad (5.3)$$

Damit gilt

$$\mathbf{x} - \mathbf{x}' = \begin{pmatrix} \Delta x \\ \Delta y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r \cdot \cos(\theta) \\ r \cdot \sin(\theta) \end{pmatrix} \quad \text{und} \quad \|\mathbf{x} - \mathbf{x}'\| = r \quad (5.4)$$

Sei $J = \frac{\delta(x, y)}{\delta(r, \phi)}$ die Jacobi-Matrix, dann gilt nach der Integral-Transformationsformel ([77], Seite 211)

$$\begin{aligned} d\mathbf{x}' &= dx dy = \det J \cdot dr d\phi = \det \begin{pmatrix} \frac{\delta x}{\delta r} & \frac{\delta x}{\delta \phi} \\ \frac{\delta y}{\delta r} & \frac{\delta y}{\delta \phi} \end{pmatrix} \cdot dr d\phi \\ &= \det \begin{pmatrix} \cos \phi & -r \cdot \sin \phi \\ \sin \phi & r \cdot \cos \phi \end{pmatrix} \cdot dr d\phi = r \cdot (\cos^2 \phi + \sin^2 \phi) \cdot dr d\phi \\ &= r \cdot dr d\phi. \end{aligned} \quad (5.5)$$

Einsetzen von Gleichung 5.4 und 5.5 in Gleichung 5.2 führt zu

$$\begin{aligned} \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) &= F_0 \int \int F(r) \cdot r \cdot \begin{pmatrix} \cos(\theta) \\ \sin(\theta) \end{pmatrix} P_2(\mathbf{x}, r, \theta, t) dr d\theta \\ &\quad + A_0 F_0 \int_0^t e^{-(t-t')/\tau} \\ &\quad \cdot \int \int F(\rho) \cdot \rho \cdot \begin{pmatrix} \cos(\psi) \\ \sin(\psi) \end{pmatrix} Q(\mathbf{x}, t; \rho, \psi, t') d\rho d\psi dt' \\ &\quad + e^{\frac{t}{\tau}} \cdot \mathbf{x}^*(t=0). \end{aligned} \quad (5.6)$$

In Gleichung 5.6 haben wir nun also eine Darstellung von lokalen Geschwindigkeitsfeldern in Abhängigkeit von Dichtekorrelationsfunktionen. Betrachten wir nur die alte Version des Modells (ohne Term für persistenten Drift beziehungsweise Gedächtnisterm) und nehmen wir an, dass die Zellen zu Beginn nicht stimuliert sind, so vereinfacht sich Gleichung 5.6 zu

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = F_0 \int \int F(r) \cdot r \cdot \begin{pmatrix} \cos(\theta) \\ \sin(\theta) \end{pmatrix} P_2(\mathbf{x}, r, \theta, t) dr d\theta. \quad (5.7)$$

Gleichung 5.6 lässt sich auch als Faltung schreiben und wird dann zu

$$\begin{aligned} \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = & F_0 \cdot F * P_2(\mathbf{x}, r, \theta, t) \\ & + A_0 F_0 \cdot e^{-(t-t')/\tau} * F * Q(\mathbf{x}, t; \rho, \psi, t') + e^{\frac{t}{\tau}} \cdot \mathbf{x}^*(t=0). \end{aligned} \quad (5.8)$$

5.3 Rekonstruktion von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen und Geschwindigkeitsfeldern aus experimentellen Daten

Alle zur Bestimmung der Parameter der mechanischen Interaktionen der Zellen benötigten Größen (\mathbf{u} , P_2 und Q) sind direkt aus experimentellen Daten zu ermitteln. Wie die Berechnung erfolgt, wird für die einzelnen Größen in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Bestimmung von lokalen Geschwindigkeitsvektoren. Die mittleren lokalen Geschwindigkeitsvektoren $\mathbf{u}(\mathbf{x}) \equiv \mathbf{u}(x, y)$ liegen unmittelbar als Ergebnis der PIV-Analysen vor. Alternativ können diese - sofern Informationen über die Trajektorien von individuellen Zellen durch Einzel-Zell-Tracking-Analysen vorliegen - durch Mitteln dieser bestimmt werden.

Um die mittleren lokalen Geschwindigkeitsvektoren aus dem Modell von den experimentell bestimmten zu unterscheiden, schreiben wir ab sofort

$$\mathbf{u}^{\mathcal{M}}(\mathbf{x}, t) = \begin{pmatrix} u^{\mathcal{M}}(\mathbf{x}, t) \\ v^{\mathcal{M}}(\mathbf{x}, t) \end{pmatrix} \quad (5.9)$$

für die Geschwindigkeitsvektoren aus dem Modell, beziehungsweise

$$\mathbf{u}^{\mathcal{D}}(\mathbf{x}, t) = \begin{pmatrix} u^{\mathcal{D}}(\mathbf{x}, t) \\ v^{\mathcal{D}}(\mathbf{x}, t) \end{pmatrix} \quad (5.10)$$

für die experimentell bestimmten Geschwindigkeitsvektoren.

Diskretisierung von Zeit und Raum. Um die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen zu (re-)konstruieren, diskretisieren wir Zeit und Raum. Dafür wird die x -Achse in M_x Intervalle aufgeteilt. Mit der Bezeichnung $\Delta x = 1/M_x$ ist der linke Rand des i -ten Intervalls gegeben durch $(i-1)\Delta x$ und der rechte Rand des i -ten Intervalls gegeben durch $i\Delta x$. Folglich ist der Mittelpunkt des i -ten Intervalls gegeben als $\frac{2i-1}{2}\Delta x$. Gleichermaßen wird die y -Achse in M_y Intervalle aufgeteilt, wobei der untere und obere Rand des j -ten Intervalls durch $(j-1)\Delta y$ beziehungsweise $j\Delta y$ gegeben sind, wobei $\Delta y = 1/M_y$. Diese Diskretisierung des Raumes wird in Abbildung 5.2 illustriert.

Wir wenden ähnliche Überlegungen wie für x und y auf r und θ an und setzen

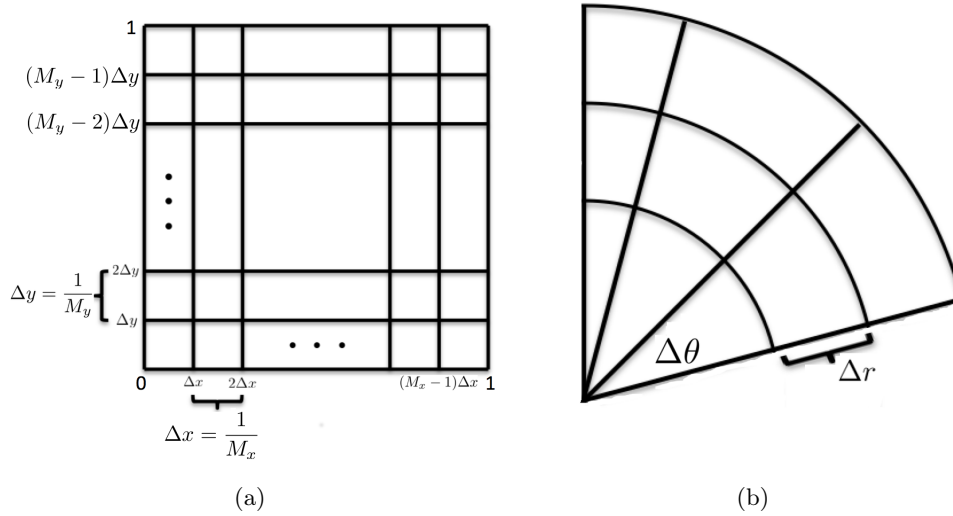


Abbildung 5.2: **Skizze zur Diskretisierung des Raumes.** a) Diskretisierung von x und y , b) Diskretisierung von r und θ .

$\Delta\theta = 1/M_\theta$ sowie $\Delta r = 1/M_r$. Für die Abstände r ist also die innere Begrenzung des k -ten Intervalls gegeben durch $(k-1)\Delta r$ und die äußere Begrenzung des k -ten Intervalls gegeben durch $k\Delta r$. Für die Winkel ist mit $\Delta\theta = \frac{2\pi}{M_\theta}$ die linke Begrenzung des l -ten Intervalls gegeben durch $(l-1)\Delta\theta$ und die rechte Begrenzung des l -ten Intervalls gegeben durch $l\Delta\theta$. Wir erhalten also eine Menge

$$X = \{[(i-1)\Delta x, i\Delta x] | i \in \{1, \dots, M_x\}\}, \quad (5.11)$$

der diskreten Abschnitte auf der x -Achse, eine Menge

$$Y = \{[(j-1)\Delta y, j\Delta y] | j \in \{1, \dots, M_y\}\}, \quad (5.12)$$

der diskreten Abschnitte auf der y -Achse, eine Menge

$$R = \{[(k-1)\Delta r, k\Delta r] | k \in \{1, \dots, M_r\}\}, \quad (5.13)$$

von diskretisierten Beträgen der Distanz von Zellen, sowie eine Menge

$$\Theta = \{[(l-1)\Delta\theta, l\Delta\theta] | l \in \{1, \dots, M_\theta\}\}, \quad (5.14)$$

von diskretisierten Winkeln. Sei weiterhin Δt ein Zeitintervall und seien die Messungen der experimentellen Daten zu Zeitpunkten $T = \{t_m \Delta t | m \in \{1, \dots, M_t\}\}$ erfolgt.

Rekonstruktion von $p_1(\mathbf{x}, t)$. Auf recht einfache Weise kann die Ein-Zellen-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $p_1(\mathbf{x}, t)$ bestimmt werden, indem für alle Intervalle $[a, b] \in X$ die Zellen gezählt werden, die sich in diesen befinden. Dies wird durch eine Histogrammfunktion implementiert.

Rekonstruktion von P_2 . Die Dichtekorrelationsfunktion $P_2(\mathbf{x}, r, \theta, t)$ beziehungsweise $P_2(x, y, r, \theta, t)$ ist nur von den Positionen der Zellen zu bestimmten Zeitpunkten abhängig. Um P_2 zu bestimmen, ist also ebenfalls kein vollständiges Einzel-Zell-Tracking nötig, sondern eine Segmentierung der Zellen ausreichend.

Für $i \in \{1, \dots, M_x\}$, $j \in \{1, \dots, M_y\}$, $k \in \{1, \dots, M_r\}$ und $l \in \{1, \dots, M_\theta\}$ sei $x_i = [(i-1)\Delta x, i\Delta x] \in X$, $y_j = [(j-1)\Delta y, j\Delta y] \in Y$, $r_k = [(k-1)\Delta r, k\Delta r] \in R$, $\theta_l = [(l-1)\Delta\theta, l\Delta\theta] \in \Theta$.

Mit

$$m(p) = \frac{2p-1}{2}, \quad (5.15)$$

für eine Variable p schreiben wir

$$P_2(x_i, y_j, r_k, \theta_l, t_m) = P_2(m(i)\Delta x, m(j)\Delta y, m(k)\Delta r, m(l)\Delta\theta, t_m\Delta t). \quad (5.16)$$

Um nun $P_2^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, r_k, \theta_l, t_m)$ zu berechnen, zählen wir die Anzahl der Fälle, bei denen eine Zelle sich in $x \in ((i-1)\Delta x, i\Delta x)$ und $y \in ((j-1)\Delta y, j\Delta y)$ befindet und eine weitere Zelle sich in Distanz $r \in ((k-1)\Delta r, k\Delta r)$ und Winkel $\theta \in ((l-1)\Delta\theta, l\Delta\theta)$ befindet.

Um Verwirrung zu vermeiden, schreiben wir für Schätzungen aus den Daten ab sofort $P_2^{\mathcal{D}}(x, y, r, \theta, t)$ und für die entsprechenden Modellgrößen $P_2^{\mathcal{M}}(x, y, r, \theta, t)$.

Rekonstruktion von Q . Um Q zu bestimmen, sind Einzel-Zell-Tracking-Daten erforderlich. Aus diesen kann Q dann direkt berechnet werden, da Q direkt von den Trajektorien einer Zelle und seiner Nachbarn abhängt. Für $Q(\mathbf{x}, t; \rho, \psi, t') \equiv Q(x, y, t; \rho, \psi, t')$ schreiben wir gleichermaßen wie oben bei der Rekonstruktion von $P_2(x, y, r, \theta, t)$

$$Q^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, t_m; r_k, \theta_l, t_n) = Q(m(i)\Delta x, m(j)\Delta y, t_m\Delta t; m(k)\Delta\rho, m(l)\Delta\psi, t_n\Delta t).$$

Um $Q^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, t_m; r_k, \theta_l, t_n)$ zu bestimmen, verfahren wir ähnlich und berechnen die Anzahl der Fälle, in denen eine Zelle sich im Moment t_m in $x \in ((i-1)\Delta x, i\Delta x)$ und $y \in ((j-1)\Delta y, j\Delta y)$ befindet und zur Zeit $t_n < t_m$ eine weitere Zelle sich in Distanz $\rho \in ((k-1)\Delta\rho, k\Delta\rho)$ und Winkel $\psi \in ((l-1)\Delta\psi, l\Delta\psi)$ befindet.

Um aus den experimentellen Daten geschätzte Parameter von den Modellparametern zu unterscheiden, schreiben wir auch hier $Q^{\mathcal{D}}(x, y, t; \rho, \psi, t')$ für Parameter

aus Daten und $Q^{\mathcal{M}}(x, y, t; \rho, \psi, t')$ für die entsprechenden Modellgrößen.

Überblick der benötigten Datenanalyse. Da alle Variablen also direkt aus den *Scratch-Assay*-Videos von kollektiv migrierenden Zellen gewonnen werden können, sind alle mechanischen Eigenschaften der Zellen inferierbar, die durch die Kraftfunktion F , die gerichtete Eigenbewegung \mathbf{x}^* und die Dauer des Gedächtnisses τ bestimmt sind.

Will man Modellparameter bezüglich des Modells ohne den Zellgedächtnissterm inferieren, so müsste $Q^{\mathcal{D}}(x, y, t; r, \theta, t')$ nicht bestimmt werden und somit wären PIV und Segmentierung ausreichend. Um Modellparameter für das vollständige Modell mit Gedächtnissterm zu bestimmen, ist es allerdings unabkömmlich, dass verlässliche Einzel-Zell-Tracking-Daten zur Verfügung stehen.

5.4 Formulierung der Zielfunktion

Wir wollen nun die Parameter der Modellfunktion (Gleichung 4.10) bestimmen. Zunächst nähern wir die Integralterme aus Gleichung 5.6 mit der Trapezregel an und erhalten für die Geschwindigkeitsvektoren aus dem Modell

$$\begin{aligned} \mathbf{u}^{\mathcal{M}}(i, j, t_i) \approx & F_0 \sum_{k=1}^{M_r} \sum_{l=1}^{M_\theta} w_{k,l}^P F(r_k) \cdot r \cdot \begin{pmatrix} \cos(\theta_l) \\ \sin(\theta_l) \end{pmatrix} P_2^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, r_k, \theta_l, t) \\ & + A_0 F_0 \sum_{k=1}^{M_r} \sum_{l=1}^{M_\theta} \sum_{t_j=1}^{M_t} w_{l,k,t_j}^Q e^{\frac{-(t_i-t_j)}{\tau}} F(\rho_k) \\ & \cdot \rho \cdot \begin{pmatrix} \cos(\psi_l) \\ \sin(\psi_l) \end{pmatrix} Q^{\mathcal{D}}(i, j, t; \rho_k, \psi_l, t') + e^{\frac{t}{\tau}} \cdot \mathbf{x}^*(t=0). \end{aligned} \quad (5.17)$$

Die bei Anwendung der Trapezregel auftretenden Gewichte der Terme in Gleichung 5.17 werden mit $w_{k,l}^P$ beziehungsweise w_{l,k,t_j}^Q bezeichnet, hierbei sind

$$w_{k,l}^P = \begin{cases} \frac{1}{4}, & (k, l) \in \{(1, 1); (1, M_\theta); (M_r, 1); (M_r, M_\theta)\} \\ \frac{1}{2}, & (k, l) \in \{1, M_r\} \times \{2, \dots, M_\theta - 1\} \cup \{2, \dots, M_r - 1\} \times \{M_\theta, 1\} \\ 1, & \text{sonst} \end{cases} \quad (5.18)$$

und

$$w_{k,l,t_j}^Q = \begin{cases} \frac{1}{8}, & (k, l, t_j) \in \{1, M_r\} \times \{1, M_\theta\} \times \{1, M_t\} \\ \frac{1}{4}, & (k, l, t_j) \in \{1, M_r\} \times \{1, M_\theta\} \times \{2, \dots, M_t - 1\} \\ & \cup \{1, M_r\} \times \{2, \dots, M_\theta - 1\} \times \{1, M_t\} \\ & \cup \{2, \dots, M_r - 1\} \times \{1, M_\theta\} \times \{1, M_t\} \\ \frac{1}{2}, & (k, l, t_j) \in \{1, M_r\} \times \{2, \dots, M_\theta - 1\} \times \{2, \dots, M_t - 1\} \\ & \cup \{2, \dots, M_r - 1\} \times \{2, \dots, M_\theta - 1\} \times \{1, M_t\} \\ & \cup \{2, \dots, M_r - 1\} \times \{1, M_\theta\} \times \{2, \dots, M_t - 1\} \\ 1, & \text{sonst.} \end{cases} \quad (5.19)$$

Wir berechnen nun die Differenz der linken und rechten Seite von Gleichung 5.6 beziehungsweise die Differenz von $\mathbf{u}^D(i, j, t_i)$ und $\mathbf{u}^M(i, j, t_i)$ als

$$\begin{aligned} \mathbf{d}(i, j, t_i) &= \mathbf{u}^D(i, j, t_i) - \left(F_0 \sum_{k=1}^{M_r} \sum_{l=1}^{M_\theta} w_{k,l}^P F(r_k) \cdot r \cdot \begin{pmatrix} \cos(\theta_l) \\ \sin(\theta_l) \end{pmatrix} \right) P_2^D(i, j, r_k, \theta_l, t) \\ &+ A_0 F_0 \sum_{k=1}^{M_r} \sum_{l=1}^{M_\theta} \sum_{t_j=1}^{M_t} w_{l,k,t_j}^Q e^{-\frac{(t_i-t_j)}{\tau}} F(\rho_k) \\ &\cdot \rho \cdot \begin{pmatrix} \cos(\psi_l) \\ \sin(\psi_l) \end{pmatrix} Q^D(i, j, t; \rho_k, \psi_l, t') + e^{\frac{t}{\tau}} \cdot \mathbf{x}^*(t=0) \Big), \end{aligned} \quad (5.20)$$

wobei $\mathbf{d}(i, j, t_i) = \begin{pmatrix} d_u(i, j, t_i) \\ d_v(i, j, t_i) \end{pmatrix}$. Es bezeichne nun \mathbf{p} einen Vektor, der alle Modellparameter, die inferiert werden sollen, enthält. Um \mathbf{p} zu ermitteln, nehmen wir an, dass Schätzungen von $P_2^D(x, y, r, \theta, t)$, $Q^D(x, y, t; \rho, \psi, t')$ und $\mathbf{u}^D(x, y)$ normalverteilt sind. Folglich nehmen wir weiterhin an, dass die x -Komponente $d_u(i, j, t_i)$ der Differenzen $\mathbf{d}(i, j, t_i)$ normalverteilt ist, und zwar mit Mittelwert 0 und Standardabweichung $\sigma_\epsilon(i, j, t_i)$, also

$$d_u(i, j, t_i) \sim \mathcal{N}(0, \sigma_\epsilon(i, j, t_i)^2). \quad (5.21)$$

Es bezeichne nun $\mu_{d_u}(i, j, t_i)$ den über alle experimentellen Replikate gemittelten Mittelwert von $d_u(i, j, t_i)$ und $s_{d_u}(i, j, t_i)$ den zugehörigen Standardfehler des Mittelwerts.

Eine Normalverteilung $\mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$ mit Mittelwert μ und Varianz σ^2 besitzt die Dichte

$$f(\xi, \mu, \sigma^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(\xi - \mu)^2}{2\sigma^2}\right). \quad (5.22)$$

Für n verschiedene Realisierungen einer Normalverteilung $\mathcal{N}(m, s^2)$ mit unbekanntem Mittelwert m und unbekannter Varianz s^2 erhält man für Realisierungen/Stichproben ξ_1, \dots, ξ_n die zugehörige Likelihood-Funktion als

$$\begin{aligned} L(m, s^2, \xi_1, \dots, \xi_n) &= \prod_{i=1}^n f(\xi_1, \dots, \xi_n, m, s^2) \\ &= \left(\frac{1}{2\pi s^2}\right)^{n/2} \exp\left(-\frac{\sum_{i=1}^n (\xi_i - m)^2}{2s^2}\right) \end{aligned} \quad (5.23)$$

und daraus die Log-Likelihood-Funktion

$$\log L(m, s^2, \xi_1, \dots, \xi_n) = -\frac{n}{2} \log 2\pi s^2 - \frac{\sum_{i=1}^n (\xi_i - m)^2}{2s^2}. \quad (5.24)$$

(Ein Maximum der Likelihood-Funktion ist aus Monotoniegründen gleichzeitig auch immer ein Maximum der Log-Likelihood-Funktion und umgekehrt).

Seien nun aus n Replikaten einer experimentellen Anordnung berechnete Geschwindigkeitsfelder mit Bewegungskomponenten

$$u_1^{\mathcal{D}} = u_1^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, t_m), \dots, u_n^{\mathcal{D}} = u_n^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, t_m)$$

in x -Richtung gegeben, dann lautet die Likelihood-Funktion

$$\begin{aligned} L(\mu_{d_u}(i, j, t_i), s_{d_u}^2(i, j, t_i), u_1^{\mathcal{D}}, \dots, u_n^{\mathcal{D}}) \\ &= \prod_{i,j,t_m} \left(\left(\frac{1}{2\pi s_{d_u}^2(i, j, t_i)} \right)^{n/2} \exp\left(-\frac{\sum_{k=1}^n (u_k^{\mathcal{D}}(x_i, y_j, t_m) - \mu_{d_u})^2}{2s_{d_u}^2(i, j, t_i)}\right) \right) \\ &= \prod_{i,j,t_m} \left(\left(\frac{1}{2\pi s_{d_u}^2(i, j, t_i)} \right)^{n/2} \exp\left(-\frac{n \cdot \mu_{d_u}(i, j, t_i)^2}{2s_{d_u}^2(i, j, t_i)}\right) \right) \end{aligned} \quad (5.25)$$

Die Größen $\mu_{d_u}(i, j, t_i)$ und $s_{d_u}(i, j, t_i)$ hängen von den Input-Parametern \mathbf{p} ab, es wird die Parameterkombination \mathbf{p} gesucht, für die 5.20 minimal wird. Um die gewünschten Parameterschätzungen zu erhalten, muss also die Likelihood-Funktion maximiert werden. Dies ist gleichbedeutend mit der Maximierung der Log-Likelihood-Funktion

$$\begin{aligned} L(\mu_{d_u}(i, j, t_i), s_{d_u}^2(i, j, t_i), u_1^{\mathcal{D}}, \dots, u_n^{\mathcal{D}}) \\ &= \sum_{i,j,t_i} \left(-\frac{n}{2} \log 2\pi s_{d_u}^2(i, j, t_i) - \frac{n}{2} \cdot \frac{\mu_{d_u}^2(i, j, t_i)}{s_{d_u}^2(i, j, t_i)} \right) \quad (5.26) \\ &= \sum_{i,j,t_i} \left(-\frac{n}{2} \left(\log 2\pi + \log s_{d_u}^2(i, j, t_i) + \frac{\mu_{d_u}^2(i, j, t_i)}{s_{d_u}^2(i, j, t_i)} \right) \right), \end{aligned}$$

beziehungsweise gleichbedeutend mit der Minimierung der Zielfunktion

$$\chi^2 = \sum_{i,j,t_i} \left(2 \log(s_{d_u}(i, j, t_i)) + \left(\frac{\mu_{d_u}(i, j, t_i)}{s_{d_u}(i, j, t_i)} \right)^2 \right). \quad (5.27)$$

Die optimale Parameterkombination, für die die Zielfunktion minimal wird, wird mit Hilfe des Matlab-Suchalgorithmus *fminsearch* bestimmt. Dieser wird mit 100 Durchläufen gestartet. In jedem Durchlauf wird als Ausgangswert die beste im vorigen Suchlauf gefundene Parameterkombination verwendet und es werden zwei der Parameter abgeändert. Ist einer der zu ändernden Parameter p_i^{best} , so wird dieser zu

$$\tilde{p}_i = p_i^{\text{best}} \cdot ((1 - a) + 2 \cdot a \cdot \epsilon_i), \quad (5.28)$$

zufällig abgeändert, wobei $a = 0.3$ und $\epsilon_i \in [0, 1]$, $i \in \{1, 2\}$ eine zufällige Zahl ist. Der Parameter wird also um bis zu 30 Prozent seines Wertes abgeändert. Dieser Wert erwies sich in Tests als effizient, um aus lokalen Minima zu entkommen ohne zu weit von den besten Parametern des vorigen Durchganges abzuweichen.

5.5 Inferierbare Parameter

In diesem Abschnitt werden die Parameter, die mit der vorgestellten Methode inferiert werden können, beschrieben. Im Wesentlichen interessieren uns 8 Parameter (D , a , r_c , σ , θ , F_0 , A_0 , τ). Die Größen a , σ und r_c steuern die Stärke des Morse-Potentials. Hierbei ist r_c der natürliche Zellradius, a ein konstanter Parameter, der die Steifheit der Zellen beschreibt, und σ die maximale Distanz, über die die Adhäsionskräfte wirken. Über die Kraftfunktion wird indirekt die Zelldichte bzw. die Distanz zwischen benachbarten Zellen beeinflusst. F_0 ist die Amplitude der interzellulären Kräfte und beeinflusst die Stärke ihrer Wirkung. Die Variable θ beschreibt die Amplitude des anfänglichen Gedächtnisses der Zellen, das heißt Zellen auf der linken Seite des Spaltes „erinnern“ sich zu Beginn an ein Ziehen nach rechts mit Amplitude θ , die Zellen auf der rechten Seite „erinnern“ sich entsprechend an ein Ziehen nach links mit Amplitude θ . Entsprechend der Größe F_0 bezeichnet A_0 die Amplitude der gerichteten Eigenbewegung. Die Größe τ ist eine Zeitkonstante, die die Länge des Gedächtnisses modelliert. Diese kann mit migratorischer Persistenz assoziiert werden. Die Variable D entspricht dem makroskopischen Diffusionskoeffizienten und wird im Term für die zufällige Eigenbewegung verwendet. Dieser Parameter kann mit der vorgestellten Methode leider nicht inferiert werden, da über das Rauschen gemittelt wird. In diesem Modell ist allerdings die dominante Komponente nicht mehr die Diffusion, sondern die aktive Bewegung, sodass die Diffusionsstärke einen kleineren Einfluss auf das Migrationsverhalten hat. Eine Übersicht der inferierbaren Parameter und deren

Parameter	Bedeutung	biologische Interpretation
D	Diffusionskoeffizient (nicht inferierbar)	Stärke der (zufälligen) Motilität der Zellen
a	Parameter für Morse-Potential	Steifheit der Zellen
r_c	Zell-Zell-Adhäsion,	natürlicher Zellradius
σ	indirekt: Zelldichte	Reichweite der interzellulären Kräfte
F_0	Amplitude der interzellulären Kräfte	
A_0	Amplitude der gerichteten Bewegung durch „Gedächtnis“ der Zellen	
θ	anfängliche Stimulation	mechanische Stimulation zur Bewegung in den Spalt (z. B. durch Entfernen des Inserts)
τ	Länge des Gedächtnisses	migratorische Persistenz

Tabelle 5.1: Übersicht der Modellparameter.

biologische Interpretation findet sich in Tabelle 5.1.

5.6 Fehlerquellen bei der Anwendung auf experimentelle Daten

Unser Wunsch ist, diese Methode auf experimentelle Daten anzuwenden, um interzelluläre Parameter, die die kollektive Migration steuern, zu inferieren. Wird diese Methode auf experimentelle Daten angewendet, so können allerdings bereits Unsicherheiten bei der Bestimmung von \mathbf{u} , P_2 und Q auftreten. Hierbei können einerseits die begrenzte Anzahl an experimentellen Replikaten, die Zellzahl pro Experiment und die Anzahl der aufgezeichneten Zeitpunkte eine Rolle spielen. Andererseits sind bei dicht gesäten Zellen Fehler in der Segmentierung und im Einzel-Zell-Tracking wahrscheinlich, die sich hier fortpflanzen können. Insbesondere in den für uns verfügbaren Daten führt dies zu Problemen. Außerdem treten häufig leichte Unterschiede in Replikaten der gleichen experimentellen Bedingungen auf. Aus diesen Gründen testen wir die Methode als erstes an simulierten Daten, um die Güte der Parameterschätzung in einer idealisierten Situation zu bestimmen.

5.7 Test der Methode an simulierten Daten

5.7.1 Inferierte Parameter bei Anwendung auf simulierte Daten

Für eine Simulation des Modells liegen die mittleren Geschwindigkeiten der simulierten Zellen direkt vor. Diese können leicht aus den bekannten Trajektorien der simulierten Zellen berechnet (beziehungsweise „gemessen“) werden. Andererseits

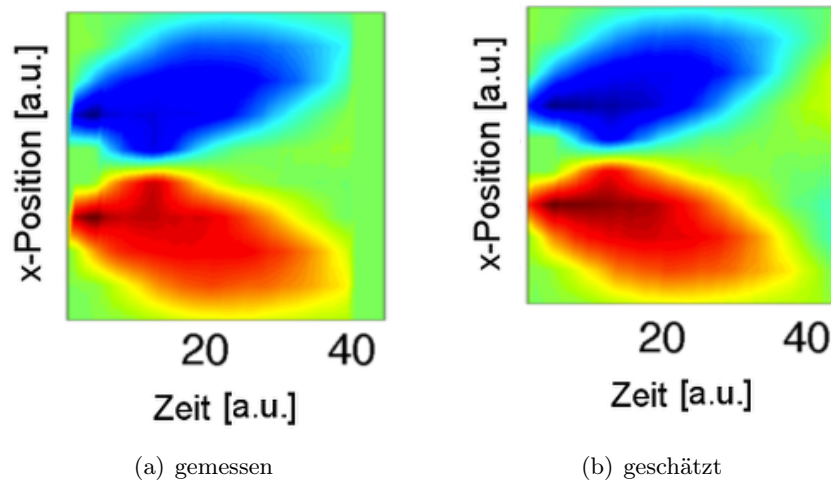


Abbildung 5.3: **Gemessene und geschätzte Heatmaps der absoluten Geschwindigkeiten.** a) Heatmap der Geschwindigkeiten, die aus simulierten Daten „gemessen“ wurde; b) Heatmap der Geschwindigkeiten durch Schätzung der Geschwindigkeitsvektoren aus Gleichung 5.6.

kann man die Geschwindigkeiten über die Dichtekorrelationsfunktionen und Gleichung 5.6 abschätzen beziehungsweise voraussagen. Auf diese Weise entsteht ein erster Test, ob die Methode zur Inferenz der Parameter funktioniert. Damit die Methode funktionieren kann, müssen die aus der Simulation bekannten und die aus Gleichung 5.6 geschätzten Geschwindigkeitsvektoren sich gleichen. Für ein Beispiel sind beide in Abbildung 5.3 dargestellt und sie stimmen offensichtlich weitgehend überein.

Wir testen die Methode zur Parameterinferenz an simulierten Daten. Manche Parameter sind besser identifizierbar als andere. Gute Ergebnisse erhalten wir insbesondere für F_0 , a , ϵ und σ , ohne dafür andere Parameter als bekannt vorauszusetzen. In Tabelle 5.2 sind für zwei Beispiele die aus simulierten Daten inferierten Werte für diese Parameter aufgelistet. Verwendet man die inferierten Parameter in erneuten Simulationen so entsteht ein ähnlicher Migrations-Phänotyp wie bei den „richtigen“ Parametern. Die Methode ist in der aktuellen Form also in der Lage Parameter zu inferieren, die die phänotypischen Charakteristika reproduzieren können. Der Parameter τ für die Relaxationszeit ist nur schlecht inferierbar. Offenbar ist es in der Simulation nur wichtig, dass die Zellen sich an mechanische Stimuli erinnern, aber nicht wie lange, da die Nachbarschaftsstrukturen im Wesentlichen erhalten bleiben und sich die mechanischen Stimuli durch Zellen in der Umgebung nicht stark verändern. In der Anwendung auf experimentelle Daten besteht eventuell die Möglichkeit, diesen Parameter aus anderen Untersuchungen zu schätzen und bei der Methode zur Parameterinferenz als bekannt

	D	F_0	a	ϵ	σ	θ	A_0	τ
Bsp. 1	0.001	1	1.818	0.0333	1.2	0	20	0.0988
Bsp. 1 inferiert	-	0.4701	1.2555	0.0315	1.673	0.5369	16.75	0.2085
Abweichung	-	-53%	-31%	-5%	+39%	- %	-16%	+111%
Bsp. 2	0.01	1	1.818	0.0399	2	1	100	3.1623
Bsp. 2 inferiert	-	0.535	1.88	0.0385	1.945	1.35	109.34	0.11
Abweichung	-	-46%	+3%	-3.5%	-2.7%	+35%	+9%	-96%

Tabelle 5.2: **Beispiele für inferierte Parameter.** Gezeigt sind für zwei Beispiele jeweils die in der Simulation verwendeten Parameter und die mit der vorgestellten Methode inferierten Parameter. Beispiel 1: Spaltschluss als Front, Beispiel 2: zelluläre Brücken.

vorauszusetzen.

Diskussion und Ausblick

Lungenkrebs ist eine der häufigsten Krebsarten und hat eine hohe Sterblichkeitsrate. Besonders gefährlich ist Lungenkrebs durch den *early spread*, also die Fähigkeit, schon in frühen Stadien Metastasen zu bilden. In dieser Arbeit wurde ein kombinierter Ansatz aus Datenanalyse und Modellierung entwickelt, der geeignet ist, um die Mechanismen bei der kollektiven Migration von Lungenkrebszellen in 2D-Kultur zu analysieren. Hiermit kann der Einfluss von Hormonen beziehungsweise Wachstumsfaktoren und deren Signalpfaden auf den *early spread* von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) untersucht werden. Durch effiziente weitgehend automatisierte Datenanalyse können aus experimentellen Migrationsdaten Parameter auf Gewebeebene gewonnen werden. Ein Modell basierend auf interzellulären Kräften, sowie zufälliger und gerichteter Zellbewegung ist in der Lage, die phänotypischen Ergebnisse der Migrationsexperimente zu reproduzieren. Das Modell kann durch die Stochastizität zwar nicht direkt an Daten gefittet werden, jedoch wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, basierend auf Geschwindigkeitsfeldern aus der Datenanalyse, aus den Modellgleichungen Parameter mechanischer Eigenschaften individueller Zellen im Zellverband zu inferieren. Durch die Kombination von Datenanalyse und Modellierung kann so ein breites Spektrum an zellspezifischen Parametern für die Migration gewonnen werden.

Datenanalyse. Als experimentelle Daten standen Videos aus *Scratch-Assays* (erzeugt mit IBIDI-Inserts) zur Verfügung. Dies ist ein häufig benutzter leicht reproduzierbarer Aufbau um kollektive Migration in 2D *in vitro* zu simulieren. Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, einen Ablauf von Schritten zu entwickeln, um diese Daten schnell und effizient auszuwerten. Naheliegende Ansätze basierend auf Einzel-Zell-Tracking-Ansätzen führten aufgrund der Eigenschaften der zur Verfügung stehenden experimentellen Daten zu Problemen. Insbesondere die hohe Zelldichte und die zu geringe Auflösung erzeugten bereits bei der Segmentierung einzelner Zellen Schwierigkeiten und hohe Fehlerquoten, da die Nuklei oft eng

aneinander lagen. Eine alternative Lösung dieses Problems konnte durch Verwendung von Bildkorrelationsverfahren aus der Particle Image Velocimetry gefunden werden. Die hohe Zelldichte spielt hierbei keine Rolle und auch die schwache Auflösung hatte keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse.

Mit den Methoden der PIV können wir für die experimentellen Daten aus den *Scratch-Assays* auf robuste und verlässliche Weise lokale Geschwindigkeitsfelder berechnen, also quasi ein lokales Tracking von kleinen Gruppen von Zellen. Die Tatsache, dass die betrachteten Zelllinien adhärent sind, begünstigte die Verwendung von PIV, da somit gewährleistet ist, dass Koordination zwischen den Zellen besteht und direkt benachbarte Zellen in der Regel in die gleiche Richtung migrieren. Aus den Geschwindigkeitsfeldern können wir Geschwindigkeitsdynamiken berechnen, die typischerweise zunächst mit der Zeit ansteigen und nach einer Weile (nach circa 10-15 h) wieder sinken. Nur Zellen, die schon zu Beginn des Experimentes starben, zeigten diese Dynamik nicht. Auf diese Weise entstand nebenbei ein Indikator für die Vitalität der Zellen, ohne Notwendigkeit der visuellen Inspektion der Originalvideos.

Interessanterweise zeigen beispielsweise MDCK-Zellen andere Geschwindigkeitsdynamiken als die von uns untersuchten Lungenkrebszellen. In einer Studie [113], die ebenfalls mit Techniken basierend auf Particle Image Velocimetry ausgewertet wurden, zeigen diese Zellen zu Beginn eine konstante hohe Geschwindigkeit von $12 \frac{\mu\text{m}}{\text{h}}$ mit einem plötzlichen Abfall der Geschwindigkeit auf $8 \frac{\mu\text{m}}{\text{h}}$, wenn die Zellen konfluent werden, dem ein weiterer langsamer Abfall der Geschwindigkeit auf bis zu $4 \frac{\mu\text{m}}{\text{h}}$ folgt. Allerdings wird hier ein anderer experimenteller Aufbau verwendet. Die Zellen werden in einer beschränkten Fläche ausgesät und wachsen diese zu, aber erhalten weder mechanische noch chemische Stimulation. Zum anderen steigt die Zellzahl in diesen Versuchen innerhalb der publizierten Dauer des Experiments von 16 Stunden um 100%. Diese Dichteänderung trägt mit Sicherheit auch deutlich zur Entwicklung der Geschwindigkeitsdynamik bei.

Generell ist anzunehmen, dass die Zelldichte einen großen Einfluss auf das Migrationsverhalten hat [154], sowie andere Faktoren (zum Beispiel pH-Wert, Passagennummer, etc.), die experimentell schwer zu kontrollieren sind. Zu Beginn sind die Zellen komprimiert, sie stoßen sich gegenseitig ab, was zu starker Migration in Richtung der freien Fläche führt. Immer mehr Zellen werden in Bewegung versetzt, wodurch der Anstieg in den Geschwindigkeitsdynamiken erklärt wird. Nach gewisser Zeit (nicht notwendigerweise abhängig vom Spaltschluss) wird die Geschwindigkeit wieder verringert. Wenn die Zellen konfluent sind, ist die Zelldichte überall gleich groß. Es herrschen also ausgeglichene Kräfte zwischen den Zellen, daher findet kein Ziehen in eine Richtung und keine große (persistente) Bewegung mehr statt. Der Einfluss der Zelldichte ist im verwendeten ABM-Modell nicht direkt enthalten, wird aber durch die sich ändernden interzellulären Kräfte bei dichter gepackten Zellen indirekt abgedeckt.

Modellierung. Unser erster Modellierungsansatz basierte auf der Fisher-Gleichung. Das Modell wurde an eindimensionale Dichteprofile gefittet, die nach Rotation der Originalbilder aus den experimentellen Daten gewonnen wurden. Mit diesem Modell können wir vielversprechende Fits generieren und *traveling waves* erzeugen, wie sie in den Daten zu sehen sind. Allerdings ist der im Modell vorhandene logistische Wachstumsterm von entscheidender Bedeutung bei der Entstehung der *traveling waves*. Durch Auswertung von Einzel-Zell-Tracking-Daten, die aufgrund einiger Fehler mit gewisser Vorsicht zu behandeln sind, wurden jedoch Hinweise erlangt, dass in den verwendeten Zelllinien im betrachteten Zeitrahmen vernachlässigbar wenig Proliferation stattfindet. Visuelle Inspektion der Daten stützt diesen Befund. Somit ist also die biologische Grundlage für Anwendung dieses Modells nicht gegeben. Aus diesem Grund wurde dieser Modellierungsansatz verworfen.

Wir verwenden ein Modell basierend auf den Arbeiten von T. J. Newman, R. Grima und Alistair M. Middleton [108] [98]. Dieses Modell liegt sowohl als einzelzellbasiertes Modell (ABM) als auch als kontinuierliches Modell vor und besteht aus Termen für mechanische Interaktion durch Adhäsion der Zellen und zufälliger Zellbewegung. Vergleich der Datenanalyse mit Simulationen zeigte, dass das Modell in der ursprünglichen Version nicht in der Lage ist, die in der Datenanalyse charakteristischen Geschwindigkeitsdynamiken zu erzeugen. Aus diesem Grund haben wir das Modell erweitert. Unser neues Modell (Gleichung 4.10) enthält sowohl direkte mechanische Interaktionen zwischen den Zellen, als auch gerichtete und ungerichtete Zellbewegung. Die Zellen an der Front werden stimuliert sich in Richtung der freien Fläche zu bewegen. Sie wirken dabei auf die Zellen in der Schicht dahinter und ziehen an diesen beziehungsweise polarisieren diese in die gleiche Richtung, wodurch eine progressive Aktivierung der Zellmotilität stattfindet. Die gerichtete Zellbewegung wird als Geschwindigkeit modelliert, die sich entsprechend der auf die Zelle einwirkenden Kraft über eine gewisse Zeit entspannt. Die Zeitskala der Entspannung spiegelt migratorische Persistenz ([114], [55]) wider. Der polarisierte Zustand wird hierbei durch intrazelluläre Signalübertragung aufrecht erhalten. Neue Lamellipodien werden in der Richtung der bereits existierenden Lamellipodien gebildet [9].

Das Modell in der neuen Version kann in Simulationen die mittels PIV gefundenen Geschwindigkeitsdynamiken erklären. Der Anstieg der Geschwindigkeit über die Zeit kommt durch das Gedächtnis der Zellen zustande, das sie einen mechanischen Stimulus über einen gewissen Zeitraum erinnern lässt. Es entsteht eine sequenzielle Aktivierung der Zellbewegung durch die Nachbarzellen. Unser Modell kann, abhängig von den Parametern, eine breite Vielfalt von beobachtetem qualitativen Migrationsverhalten erzeugen (siehe Abschnitt 4.4).

Theoretisch wäre es denkbar, dass der Spaltschluss auch durch reine Ausdehnung

beziehungsweise Vergrößerung der Zellen passiert (ohne Ziehen der Frontzellen an den Nachbarn). Durch die hohe Zelldichte würde hierfür eine Ausdehnung aller Zellen um ca. 20 Prozent genügen. Wir können allerdings durch Simulationen des Modells nachweisen, dass dies nicht der Fall ist, da reines Ausdehnen der Zellen nicht in der Lage ist, die beobachteten Geschwindigkeitsdynamiken zu erzeugen. Stärkere Adhäsion zwischen den Zellen bedeutet erhöhte Koordination zwischen den Zellen. Im Modell führt dies zu verlangsamter *Sheet Migration*. Dies entspricht den Ergebnissen in [28] und [154].

Modellbasierte Inferenz von Parametern. Anhand der Datenanalyse können wir Geschwindigkeitsfelder und weitere für die Migration typische Parameter direkt bestimmen. Allerdings lässt die Datenanalyse keinerlei Rückschluss auf interzelluläre Parameter, wie zum Beispiel die Stärke der Adhäsion zwischen den Zellen, zu. Um diese im Modell relevanten Parameter zu inferieren, können wir die Modellgleichung invertieren und eine Methode vorstellen, wie diese auch aus experimentellen Daten berechnet werden können. Durch das synergistische Zusammenwirken von Modellierung und Datenanalyse kann also ein breites Spektrum an für die kollektive Migration relevanten Parametern gewonnen werden.

Bei der Anwendung auf experimentelle Daten liegen Limitierungen aktuell in der Schwierigkeit für hohe Zelldichten ein verlässliches Einzel-Zell-Tracking zu erhalten, sowie in der Variabilität der experimentellen Replikate. In Abwesenheit dieser Limitierungen können mit der vorgestellten Methode für verschiedene Behandlungen, die das Migrationsverhalten beeinflussen, Unterschiede in einzelnen interzellulären Parametern inferiert werden.

Vergleich mit Modellen anderer Gruppen. Ein Modell von P. Vitorino *et al.* [153] modelliert zufällige Migration und Bewegung ebenfalls als Summe von Kräften, die Adhäsion und gerichtete Migration widerspiegeln, und ist insoweit unserem Modell ähnlich. Allerdings ist in diesem Modell kein Gedächtnis enthalten. Es kann somit auch keine Geschwindigkeitsdynamiken erzeugen, die den in unseren Daten auftretenden gleichen.

P. Vitorino und T. Meyer [154] haben *Sheet Migration* mit verschiedenen Zelldichten untersucht und die daraus resultierenden Zusammenhänge genutzt, um zu testen, ob der Effekt von siRNA verschiedener bekannter Regulatoren von Sheet Migration auf Zellmigration von Änderungen in der Zelldichte abhängig ist. Ein solcher Test erfordert eine Reihe von Experimenten mit verschiedenen Dichten. In unserem Modell geht die Zelldichte indirekt (über den natürlichen Zellradius) als Parameter ein. In unseren Experimenten und Simulationen ist deutlich zu sehen, dass die Zelldichte ein wichtiger Einflussfaktor ist. Die Dichte wirkt sich auf die Dekompression des Zellverbandes aus und steuert so die Migration. Andererseits führt zu geringe Zelldichte zur Inhibierung der Migration durch zu starke Adhäsion.

Es existieren zahlreiche Modelle, die auf einer Langevin-Gleichung basieren und in denen Zellbewegung als Summe von Kräften und zufälliger Zellbewegung beschrieben wird und in denen Teilaspekte unseres Modells enthalten sind. Ein wichtiger Aspekt in unserem Modell ist der Drift-Term, der die Zellen mechanische Stimuli für einen gewissen Zeitraum erinnern lässt. Ein ähnlicher Term für gerichtete Zellbewegung findet sich beispielsweise im Modell von B. Szabó *et al.* ([145]) zur Modellierung der Bewegung von Keratocyten (Gewebezellen aus Goldfischschuppen). Dort gleichen Zellen, die sich in verschiedene Richtungen bewegen, ihre Bewegungsrichtung aneinander an, wenn sie in Kontakt kommen. Sequentielle Aktivierung von Zellen wird im Modell von X. Serra-Picamal *et al.* [135] verwendet, allerdings handelt es sich dort um ein eindimensionales Modell. Unser Modell in dieser Form ist das einzige Modell, das speziell auf adhäsive Lungenkrebszellen (und Stimulation mit Wachstumsfaktoren/Inhibitoren) zugeschnitten ist und alle phänotypischen Charakteristiken und Geschwindigkeitsdynamiken reproduziert.

Limitierungen durch 2D-Ansatz. In den letzten Jahrzehnten haben sich 2D-Monolage-Zellkulturen als wichtiges und viel genutztes Instrument zur Analyse von Zellmigration etabliert. Auch unsere Ansätze basieren darauf. Wir nehmen also stillschweigend an, dass 2D-Monolage-Kulturen die Physiologie von realem Gewebe widerspiegeln. Tatsächlich stellen diese allerdings eine erhebliche Vereinfachung der Situation in realem Gewebe *in vivo* dar, da mechanische Einflüsse und Koordination/Kommunikation von Zellen in 3D hier möglicherweise teilweise verloren gehen. Zudem unterscheiden sich die Glas- und Plastik-Oberflächen, auf denen Zellen wachsen, von der Umgebung der Zellen in lebendigen Organismen. Auf experimenteller Seite könnte dies in Zukunft durch Analyse von 3D-Zellkultur-Modellen gelöst werden, die allerdings zu erhöhtem experimentellem Aufwand führen würden. Das Modell in der jetzigen Form kann mit nur geringen Modifikationen auf drei Dimensionen erweitert werden.

Der Effekt von *Leader*-Zellen. Das plötzliche Entfernen des Inserts und die damit verbundene plötzliche Freigabe von verfügbarem Substrat ist ausreichend um die Motilität der Zellen anzuregen [118], wie auch aus Beobachtung der experimentellen Daten hervorgeht. Da adhäsive Zell-Zell-Kontakte durch Cadherine stets bestehen [66], laufen die Zellen nicht individuell, sondern zeigen kollektives Migrationsverhalten. Während der Rand des Spaltes in den *Scratch-Assay*-Experimenten zu Beginn des Experimentes glatt ist, setzt in manchen Fällen während der Migration in die freie Fläche (gewöhnlich nach ca. 2 h) eine Bildung von „Fingern“ am Rand ein. Ein Beispiel in unseren Daten wird in Abbildung 1.4 gezeigt. Diese Finger werden von einer aktiven *Leader*-Zelle geführt, die in der Regel größer und länger ist als die folgenden Zellen [118]. Die Bildung von solchen Fingern wurde auch für andere Zellen unter verschiedenen Bedingungen

festgestellt, zum Beispiel für *Madin-Darby-canine-kidney* (MDCK)-Epithelzellen [113]. Solches phänotypisches Verhalten von MDCK-Zellen konnte in einem mathematischen Modell von N. Sepulvéda *et al.* durch Einführen von *Leader*-Zellen erfasst werden [134]. Diese werden dort als schnellere Zellen an der Front der Zellschicht mit vorgeschriebener fester Geschwindigkeit in Richtung der freien Fläche erschaffen.

In unserem Modell nehmen wir an, dass die Zellen am Rand des Spaltes bereits zu Beginn der Simulation stimuliert sind, in Richtung des Spaltes zu migrieren und diesen zu schließen und setzen die Anfangsbedingungen entsprechend. Die Einführung von *Leader*-Zellen per se ist in unserem Modell nicht notwendig. In Simulationen unseres Modells ist es möglich, dass die glatte Zellfront aufgelöst und Finger-artige Strukturen oder zelluläre Brücken entstehen. Dies geschieht in erster Linie, wenn die Parameter so gewählt sind, dass die Zellen durch Dekompression und Ausbreitung nicht in der Lage sind, die komplette verfügbare Fläche abzudecken. Hierbei ist (siehe Abbildung 4.12 für ein Beispiel) zu sehen, dass die Zelle (beziehungsweise der Massenmittelpunkt der Zelle) an der Front eines Fingers weiter von den benachbarten Zellen entfernt ist. Da die Zellen adhären, ist der Abstand zwischen zwei Zellen als Maß für ihre Größe zu verstehen, Zellen an der Spitze von Fingern sind in der Simulation also größer als Zellen in den hinteren Schichten. Unser Modell ist somit in der Lage *Leader*-Zellen zu erzeugen, ohne dass dafür einzelne Zellen als solche deklariert werden müssen. Dies entspricht den allgemeinen Beobachtungen, dass *Leader*-Zellen sich zunächst in keiner Weise von anderen Zellen unterscheiden und sich nur durch ihre exponierte Lage zu *Leader*-Zellen entwickeln. In unserem Modell wird dieser Effekt also realistischer erfasst als im Modell von N. Sepulvéda *et al.* [134], das zufällig ausgewählte Zellen an der Front mit abweichenden Eigenschaften einführen muss, um einen solchen Phänotyp zu erzeugen.

In experimentellen Daten ist nicht selten zu beobachten, dass einzelne Zellen sich vom kollektiv migrierenden Gewebeverband ablösen. Dies ist in vielen Modellen für kollektive Migration nicht möglich, im Modell von Sepulveda *et al.* [134] wird es durch einen Term, der die Bewegung einer Zelle der Bewegung der Nachbarzellen angleicht, verhindert. In Simulationen unseres Modells ist das Abreißen einzelner Zellen vom Verband jedoch häufig zu beobachten: Wird der Drift einzelner Zellen in Richtung einer zellfreien Fläche zu stark, so „überwindet“ er die Adhäsionskräfte zu den benachbarten Zellen im Hintergrund und die Zelle löst sich ab.

Wenn die Parameter für die Distanz, über die die interzellulären Kräfte wirken, entsprechend gewählt sind, interagieren die Zellen in unserem Modell nicht nur mit ihren direkten Nachbarn, sondern können durch die distanzbasierte Kraftfunktion auch mit weiteren Zellen, die sich „hinter“ den direkten Nachbarzellen befindet, interagieren. Dieser Aspekt ist möglicherweise nicht realistisch und wird in [134] anders gelöst, wo die mechanische Kraftübertragung auf direkte Nach-

barzellen beschränkt ist.

Ausblick

Von kollektiver Migration zu Eigenschaften individueller Zellen. Es ist geplant, die vorgestellten Methoden zu verwenden, um für experimentelle Daten interzelluläre Parameter zu inferieren. Viele Methoden zur Auswertung experimenteller Migrationsdaten liefern lediglich Auskunft über gesteigerte beziehungsweise beschleunigte Bewegung der Zellen in der jeweiligen experimentellen Methode. Die Kräfte zwischen zwei Zellen sind nicht direkt messbar. Unsere Methode hingegen bietet die Möglichkeit zur Berechnung von interzellulären Kräften aus experimentellen Daten. Zusätzlich zum Gesamteffekt auf die Migration können die Elastizität, die Adhäsion zwischen Zellen, die Persistenz der Zellen, die gegenseitige Anregung beziehungsweise Mechanotransduktion der Zellen und der natürliche Zellradius bestimmt werden. Dies verschafft die Möglichkeit für Medikamenten-Scans. Für eine Population von Zellen können (in vergleichsweise günstigen) *Scratch-Assay*-Experimenten viele verschiedene Medikamente (beziehungsweise Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren) getestet werden. Hierbei kann der Einfluss der Medikamente auf die einzelnen Zelleigenschaften bestimmt werden und explizit herausgearbeitet werden, welche Parameter sich konkret ändern. Dies ermöglicht eine Klassifizierung von Medikamenten und ihrer Wirkung auf unterschiedliche mutierte Krebszellen ohne Benutzung von Mikroarrays. Die Methoden zur Auswertung können weitgehend automatisiert implementiert werden und eine schnelle Analyse garantieren. Die Zuverlässigkeit der inferierten Parameter kann durch Vergleich mit Tests an simulierten Daten bestimmt werden.

Die Anwendung der Methode auf experimentelle Daten ist allerdings bisher schwierig, da die Ergebnisse der Experimente recht inkonsistent sind und die Beschaffenheit der Daten meist kein verlässliches Einzel-Zell-Tracking zuließ. Um ein verlässliches Einzel-Zell-Tracking für diese Anwendung erstellen zu können, werden in Absprache mit unseren Kollaborationspartnern zusätzlich Datensätze mit höherer optischer Auflösung und kürzeren Intervallen zwischen den Aufnahmen angefertigt. Somit können die Schwierigkeiten beim Einzel-Zell-Tracking reduziert werden. Zur Berechnung des Trackings benutzen wir aktuell das Matlab-Tool *U-Track* [64], das in der Arbeitsgruppe von Gaudenz Danuser (Boston) entwickelt wurde. Dieses ist eine Software, die speziell konstruiert wurde, um einzelne Zellen in dichten Partikelfeldern zu tracken; die also für die Beschaffenheit unserer Daten gut geeignet ist. *U-Track* enthält Mechanismen, um fehlende Stellen in Trajektorien, die durch Tracking-Fehler zustande gekommen sind zu schließen und kann Teilung sowie Verschmelzung von Partikeln entdecken. Die Zuordnung von Zellen zu Trajektorien wird hier gelöst, indem die Korrespondenzprobleme als lineare Zuordnungsprobleme geschrieben werden und ein globales Optimum gesucht wird [64]. Eine andere Idee besteht darin, die Ergebnisse der PIV zu be-

nutzen, um ein Einzel-Zell-Tracking zu optimieren, wie wir im nächsten Abschnitt kurz beschreiben.

Ein PIV-basierter Algorithmus für Einzel-Zell-Tracking. Basierend auf den Geschwindigkeitsfeldern aus PIV wird ein neuer Ansatz zum Tracken einzelner Zellen vorgeschlagen. Klassische Einzel-Zell-Tracking-Algorithmen bestehen im Wesentlichen aus zwei Schritten: Im ersten Schritt werden die Zellen segmentiert, das heißt es werden auf jedem Bild alle einzelnen Zellen identifiziert. Im zweiten Schritt wird versucht, jede Zelle eines Bildes auf dem nächsten Bild wiederzufinden und so zu dokumentieren, wohin sie sich bewegt hat. Die Idee für unseren Algorithmus besteht nun darin, die Informationen aus der Particle Image Velocimetry zu nutzen, die angeben, wie weit und in welche Richtung die Zelle sich vermutlich bewegt hat, und gezielt dort nach der Zelle zu suchen.

Wie in jedem Algorithmus zum Tracken von einzelnen Zellen, werden zunächst einzelne Zellen auf den Bildern segmentiert und die Zellmittelpunkte bestimmt. Es bezeichne nun r den maximalen Radius einer Zelle. Wir betrachten eine bestimmte segmentierte Zelle auf dem ersten Bild. Es wird eine rechteckige Box der Größe $2 \cdot \alpha \cdot r \times 2 \cdot \alpha \cdot r$ um den Mittelpunkt der Zelle definiert. Hierbei ist $\alpha \geq 1$.

Aus den Berechnungen mit PIV ist bekannt, in welche Richtung die Zelle sich wahrscheinlich fortbewegt hat und somit kann eine ungefähre Zielposition der Zelle vorausgesagt werden. Es werden nun alle Zellen in einem bestimmten Umkreis dieser vorgeschlagenen Zielposition der Zelle aufgelistet. Für jeden dieser „Kandidaten“ wird eine Box der Größe $2 \cdot r \times 2 \cdot r$ um den Mittelpunkt definiert. Für alle möglichen Überlagerungen dieser Box und der Box um die ursprüngliche Zelle wird die Kreuzkorrelation der Bildintensitäten (ähnlich wie bei PIV) berechnet und der maximale Wert gesucht. Hierbei würde ein Wert von 1 ein exaktes Übereinstimmen bedeuten, je kleiner der Wert, desto kleiner die Übereinstimmung. Dieser Schritt wird auch für alle anderen Kandidaten durchgeführt, die Zelle mit maximaler Korrelation wird ausgewählt. Dabei spielen auf natürliche Weise auch morphologische Eigenschaften, wie Form oder Größe einer Zelle sowie die Helligkeit auf den Bildern eine Rolle, was zusätzlich zu besserer Genauigkeit führt. Um keine doppelten Zuweisungen zu erhalten, wird die verwendete Zelle aus der Liste der Zellen auf Bild 2 gestrichen. Diese Schritte werden nun für alle weiteren auf dem ersten Bild segmentierten Zellen wiederholt. Falls für eine Zelle kein Kandidat in der vorgeschlagenen Umgebung mehr frei ist, so bricht die Trajektorie der Zelle an dieser Stelle ab. Dies ist ein Vorteil gegenüber manchen anderen Tracking-Algorithmen, da auf diese Weise kein systematisches Fortpflanzen von Fehlern beziehungsweise falschen Zuordnungen auftritt. Der Algorithmus wird aktuell in Kollaboration mit der Biomedical Computer Vision Group (PD Dr. Karl Rohr) weiterentwickelt.

Validierung mit Gen-Regulations-Netzwerken. In einem weiteren Teilprojekt, das im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgestellt wurde, wurden Mikroarray-Dynamiken der Zelllinie H1975 unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie HGF, EGF, IGF ausgewertet. Mit Hilfe von Mikroarray-Zeitreihen für die gleichen Behandlungen wie in den Migrationsassays können die Ergebnisse der Datenanalyse und Modellierung weiter validiert werden. Wenn die Gabe eines Wachstumsfaktor die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht, so ist anzunehmen, dass in diesem Fall auch Migrationsgene höher exprimiert sind. Mit Hilfe von kombiniertem Clustering (nach *Gene-Ontology*-Annotation und Expressionsdynamik) [141] können wir funktionelle Gruppen von Genen und den zeitlichen Verlauf ihrer Expression bestimmen. Dies liefert Informationen, wie sich Eigenschaften der Zelle, die als Parameter im Modell eingehen, über die Zeit ändern. Bei der Methode zur Parameterinferenz in der vorgestellten Form nehmen wir allerdings stillschweigend an, dass sich alle Parameter über die Zeit nicht ändern. Die Parameter werden aus den Daten des gesamten Versuchszeitraumes ermittelt. In der Realität ist aber eine zeitliche Dynamik in den Parameterwerten wahrscheinlich. Wenn ausreichend viele Datenpunkte vorliegen, kann alternativ die Datenmenge in mehrere Zeitintervalle aufgeteilt werden, für die jeweils die Parameterkombination bestimmt wird, die die Daten am besten beschreibt. Anstatt anzunehmen, dass alle Parameter über die Zeit unverändert bleiben, kann so eine zeitliche Dynamik in den Parametern inferiert werden. Die Auswirkungen von Parameteränderungen über die Zeit können in Simulationen des Modells getestet werden.

Es ist geplant, in Fortführung der Arbeit die Modellparameter mit einem Gen-Netzwerk zu verknüpfen und mittels *Gene-Ontology*-Analysen Gene zu finden, die entsprechende Funktionen regulieren und somit die Effekte von verschiedenen experimentellen Bedingungen auf die Migration zu bestimmen. Hierfür wurde unter anderem eine neue Methode entwickelt, um Gen-Netzwerke zu inferieren, die als Zwei-Schritt-Verfahren auf einer Kombination eines Booleschen und eines kontinuierlichen Ansatzes beruht.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Abercrombie. The croonian lecture, 1978: The crawling movement of metazoan cells. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 207:129–147, 1980.
- [2] R. Adrian. Twenty years of particle image velocimetry. *Experiments in Fluids*, 39:159–169, 2005.
- [3] R. J. Adrian. Image shifting technique to resolve directional ambiguity in double-pulsed velocimetry. *Appl. Optics*, 25:3855–3858, 1986.
- [4] M. Alber, N. Chen, P. M. Lushnikov, and S. Newman. Continuous macroscopic limit of a discrete stochastic model for interaction of living cells. *Physical Review Letters*, 99:168102, 2007.
- [5] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, J. Lewis, M. Ralf, and K. Roberts. *Molecular Biology of the Cell*, 5. Auflage. Taylor & Francis, 2007.
- [6] S. Alexander, G. E. Köhl, M. Hirschberg, E. K. Geissler, and P. Friedl. Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochemical Cell Biology*, 130:1147–1154, 2008.
- [7] Z. C. Allen, T. D. and, K. D. Jones, N. Yanagawa, M. S. Tsao, and J. M. Bishop. Interaction between myc and mcl1 in the genesis and outcome of non-small-cell lung cancer. *Cancer Research*, 71:2212–2221, 2011.
- [8] J. D. Amack and M. L. Manning. Knowing the boundaries: extending the differential adhesion hypothesis in embryonic cell sorting. *Science*, 338:212–215, 2012.
- [9] N. Andrew and R. H. Insall. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of ptdins 3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nature Cell Biology*, 9:193–200, 2007.
- [10] A. Angermann, M. Beuschel, M. Rau, and U. Wohlfarth. *Matlab - Simulink - Stateflow. Grundlagen, Toolboxen, Beispiele*. Oldenbourg Verlag, München, 2001.

- [11] N. J. Armstrong, K. J. Painter, and J. A. Sherratt. A continuum approach to modelling cell-cell adhesion. *Journal of Theoretical Biology*, 243:98–113, 2006.
- [12] D. Balli, V. Ustiyani, Y. Zhang, I. C. Wang, A. J. Masino, X. Ren, J. A. Whitsett, V. V. Kalinichenko, and T. V. Kalin. Foxm1 transcription factor is required for lung fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO Journal*, 32:231–244, 2013.
- [13] B. Baum, J. Settleman, and M. P. Quinlan. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19:294–308, 2008.
- [14] H. C. Berg. *Random walks in biology*. Princeton University Press, 1993.
- [15] B. Bugyi and M.-F. Carrier. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annual review of Biophysics*, 39:449–470, 2010.
- [16] C. Carmona-Fontaine, H. K. Matthews, S. Kuriyama, M. Moreno, G. Dunn, M. Parsons, C. D. Stern, and R. Mayor. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456:957–961, 2008.
- [17] G. Carpenter and S. Cohen. Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:7709–7712, 1990.
- [18] A. Cavazzoni, M. Galetti, C. Fumarola, R. R. Alfieri, L. Roz, F. Andriani, P. Carbognani, M. Rusca, G. Sozzi, and P. Petronini. Effect of inducible fhit and p53 expression in the calu-1 lung cancer cell line. *Cancer Letters*, 246:69–81, 2007.
- [19] D. A. Chapnick and X. Liu. Leader cell positioning drives wound-directed collective migration in tgf-beta-stimulated epithelial sheets. *Molecular Biology of the cell*, 25:1586–1593, 2014.
- [20] P. Clark. Modulation of scatter factor/hepatocyte growth factor activity by cell-substratum adhesion. *Journal of Cell Science*, 107:1265–1275, 1994.
- [21] G. Cory. Scratch-wound assay. *Methods in Molecular Biology*, 769:25–30, 2011.
- [22] J. M. Coupland and N. A. Halliwell. Particle image velocimetry: Estimation of measurement confidence at low seeding densities. *Optics and Lasers in Engineering*, 9:201–210, 1988.
- [23] J. Crank. *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, 1975.

- [24] G. Danuser, J. Allard, and A. Mogilner. Mathematical modeling of eukaryotic cell migration: Insights beyond experiments. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29:501–528, 2013.
- [25] P. A. DiMilla, K. Barbee, and D. Lauffenburger. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophysical Journal*, 60:15–37, 1991.
- [26] D. Drasdo and G. Forgacs. Modeling the interplay of generic and genetic mechanisms in cleavage, blastulation, and gastrulation. *Developmental Dynamics*, 219:182–191, 2000.
- [27] D. Drasdo, R. Kree, and J. S. McCaskill. Monte carlo approach to tissue-cell populations. *Physical Review E*, 52:6635–6657, 1995.
- [28] F. Drees, S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson, and W. I. Weis. Alpha-catenin is a molecular switch that binds e-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123:903–915, 2005.
- [29] O. du Roure, A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:2390–2395, 2005.
- [30] R. Duncan, L. Bazar, G. Michelotti, T. Tomonaga, H. Krutzsch, M. Avigan, and D. Levens. A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new dna-binding motif. *Genes & Development*, 8:465–480, 1994.
- [31] Ebimage. <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/EBImage.html>. Abgerufen am 13.08.2014.
- [32] R. Farooqui and G. Fenteany. Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of Cell Science*, 118:51–63, 2005.
- [33] G. Fenteany, P. Janmey, and T. Stosse. Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Current Biology*, 10:831–838, 2000.
- [34] A. Finney and M. Hucka. Systems biology markup language: Level 2 and beyond. *Biochemical Society Transactions*, 31:1472–1473, 2003.
- [35] B. Flaherty, J. P. McGarry, and P. E. McHugh. Mathematical models of cell motility. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 49:14–28, 2007.

- [36] D. A. Fletcher and J. A. Theriot. An introduction to cell motility for the physical scientist. *Physical Biology*, 1:T1–T10, 2004.
- [37] J. Fogh, J. M. Fogh, and T. Orfeo. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59:221–226, 1977.
- [38] P. Friedl and D. Gilmour. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10:445–457, 2009.
- [39] P. Friedl, Y. Hegerfeldt, and M. Tusch. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International Journal of Developmental Biology*, 48:441–449, 2004.
- [40] P. Friedl and B. Weigelin. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature Immunology*, 9:839–848, 2008.
- [41] M. Fukata, M. Nakagawa, and K. Kaibuchi. Roles of rho-family gtpases in cell polarisation and directional migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 15:590–597, 2003.
- [42] C. Gaggioli, S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J. F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for rhoGTPases in leading and following cells. *Nature Cell Biology*, 9:1392–1400, 2007.
- [43] C. W. Gardiner. *Handbook of stochastic methods*, volume 3. Springer Berlin, 1985.
- [44] C. C. Gillespie. Moment-closure approximations for mass-action models. *Systematic Biology*, 3:52–58, 2009.
- [45] C. A. Gómez-Urbe and G. C. Verghese. Mass fluctuation kinetics: capturing stochastic effects in systems of chemical reactions through coupled mean variance computations. *The Journal of Chemical Physics*, 126:024109, 2007.
- [46] R. C. Gonzales and R. E. Woods. *Digital image processing*. Addison-Wesley, 1992.
- [47] N. S. Gov. Collective cell migration patterns: Follow the leader. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:15970–15971, 2007.
- [48] F. Graner and J. A. Glazier. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical Review Letters*, 69:2013–2016, 1992.

-
- [49] R. Grima. Multiscale modeling of biological pattern formation. *Current Topics in Developmental Biology*, 81:435–460, 2008.
- [50] R. Grima. A study of the accuracy of moment-closure approximations for stochastic chemical kinetics. *The Journal of Chemical Physics*, 136:154105, 2012.
- [51] M. Guix, A. C. Faber, S. E. Wang, M. G. Olivares, Y. Song, S. Qu, C. Rinehart, B. Seidel, D. Yee, C. L. Arteaga, and J. A. Engelman. Acquired resistance to egfr tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of igf-binding proteins. *The Journal of Clinical Investigation*, 118:2609–2619, 2008.
- [52] B. M. Gumbiner. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:622–634, 2005.
- [53] C. Halin, J. R. Mora, C. Sumen, and U. H. von Andrian. In vivo imaging of lymphocyte trafficking. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21:581–603, 2005.
- [54] N. Harder, F. Mora-Bermúdez, W. J. Godinez, A. Wünsche, R. Eils, J. Ellenberg, and K. Rohr. Automatic analysis of dividing cells in live cell movies to detect mitotic delays and correlate phenotypes in time. *Genome Research*, 19:2113–2124, 2009.
- [55] B. Harms, G. Bassi, A. Horwitz, and D. Lauffenburger. Directional persistence of egf-induced cell migration is associated with stabilization of lamellipodial protrusions. *Biophysical Journal*, 88:1479–1488, 2005.
- [56] D. P. Hart. PIV error correction. *Experiments in Fluids*, 29:13–22, 2000.
- [57] J. S. Harunaga and K. M. Yamada. Cell-matrix adhesions in 3d. *Matrix Biology*, 30:363–368, 2011.
- [58] C. C. Haudenschild and S. M. Schwartz. Endothelial regeneration. ii. restitution of endothelial continuity. *Laboratory Investigation*, 41:407–418, 1979.
- [59] A. R. Horwitz and J. T. Parsons. Cell biology: Cell migration-movin’ on. *Science*, 286:1102–1103, 1999.
- [60] N. Howlader, A. Noone, M. Krapcho, J. Garshell, D. Miller, S. Altekruse, C. Kosary, M. Yu, J. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D. Lewis, H. Chen, E. Feuer, and K. Cronin. Seer cancer statistics review, 1975-2011. National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, 2014. Abgerufen am 12.09.2014.

- [61] M. Hucka, A. Finney, H. M. Sauro, H. Bolouri, J. C. Doyle, H. Kitano, A. P. Arkin, B. J. Bornstein, D. Bray, A. Cornish-Bowden, A. A. Cuellar, S. Dronov, E. D. Gilles, M. Ginkel, V. Gor, I. I. Goryanin, W. J. Hedley, T. C. Hodgman, J.-H. Hofmeyr, P. J. Hunter, N. S. Juty, J. L. Kasberger, A. Kremling, U. Kummer, N. Le Novère, L. M. Loew, D. Lucio, P. Mendes, E. Minch, E. D. Mjolsness, Y. Nakayama, M. R. Nelson, P. F. Nielsen, T. Sakurada, J. C. Schaff, B. E. Shapiro, T. S. Shimizu, H. D. Spence, J. Stelling, K. Takahashi, M. Tomita, J. Wagner, and J. Wang. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics*, 19:524–531, 2003.
- [62] Invitrogen. www.invitrogen.com.au/assets/Uploads/ProductImages/IBI80206-1.jpg. Abgerufen am 01.10.2014.
- [63] N. Irwin, V. Baekelandt, L. Goritchenko, and L. I. Benowitz. Identification of two proteins that bind to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of GAP-43 mRNA. *Nucleic Acids Research*, 25:1281–1288, 1997.
- [64] K. Jaqaman, D. Lörke, M. Mettlen, H. Kuwata, S. Grinstein, S. L. Schmid, and G. Danuser. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature methods*, 5:695–702, 2008.
- [65] S. T. Johnston, M. J. Simpson, and R. Baker. Mean-field descriptions of collective migration with strong adhesion. *Physical Review*, E85:051922, 2012.
- [66] Y. Kametani and M. Takeichi. Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nature Cell Biology*, 9:92–98, 2007.
- [67] R. Keane and R. Adrian. Optimization of particle image velocimeters. I. Double pulsed systems. *Meas. Sci. Tech.*, 1:1202–1215, 1990.
- [68] R. Keane and R. Adrian. Optimization of particle image velocimeters. II. Multiple pulsed systems. *Meas. Sci. Tech.*, 2:963–974, 1991.
- [69] R. Keane and R. Adrian. Theory of Cross-correlation analysis of PIV images. *Appl. Sci. Res.*, 49:191–215, 1992.
- [70] E. Khain, C. M. Schneider-Mizell, M. O. Nowicki, E. A. Chiocca, S. E. Lawler, and L. M. Sander. Pattern formation of glioma cells: Effects of adhesion. *Europhysics Letters (EPL)*, 88:28006, 2009.
- [71] A. A. Khalil and P. Friedl. Determinants of leader cells in collective cell migration. *Integrative Biology*, 2:568–574, 2010.

- [72] A. Kim, Y. K. Bae, M. J. Gu, J. Y. Kim, K. Jang, H. I. Bae, H. J. Lee, and S. M. Hong. Epithelial-mesenchymal transition phenotype is associated with patient survival in small intestinal adenocarcinoma. *Pathology*, 45:567–573, 2013.
- [73] S. Kippenberger, S. Loitsch, J. Müller, M. Guschel, A. Ramirez-Bosca, R. Kaufmann, and A. Bernd. Melanocytes Respond to Mechanical Stretch by Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). *Pigment Cell Research*, 13:278–280, 2001.
- [74] J. G. Kirkwood. Statistical mechanics of fluid mixtures. *J. Chem. Phys.*, 3:300, 1935.
- [75] P. Klöden and E. Platen. *Numerical Solution of Stochastic Differential Equations*. Springer, Berlin, 1999.
- [76] J. Kolega. Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture. *Journal Cell Biology*, 102:1400–1411, 1986.
- [77] K. Königsberger. *Analysis 2*. Springer, Berlin, 2004.
- [78] V. Lauder, George. Function of the caudal fin during locomotion in fishes: Kinematics, flow visualization, and evolutionary patterns. *American Zoologist*, 40:101–122, 2000.
- [79] J. M. Lee, S. Dedhar, R. Kalluri, and E. W. Thompson. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, 172:973–981, 2006.
- [80] C.-J. Li, Y.-C. Li, D.-R. Zhang, and J.-H. Pan. Signal transducers and activators of transcription 3 function in lung cancer. *Journal of Cancer research and therapeutics*, 9:67–73, 2013.
- [81] S. Li, J.-L. Guan, and S. Chien. Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7:105–150, 2005.
- [82] C.-C. Liang, A. Y. Park, and J.-L. Guan. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2:329–333, 2007.
- [83] C. T. Lim, E. H. Zhou, and S. T. Quek. Mechanical models for living cells - a review. *Journal of Biomechanics*, 39:195–216, 2006.
- [84] J. Liu, S. Bátkai, P. Pacher, J. Harvey-White, J. A. Wagner, B. F. Cravatt, B. Gao, and G. Kunos. Lipopolysaccharide Induces Anandamide Synthesis in Macrophages via CD14/MAPK/Phosphoinositide 3-Kinase/NF- κ B

- Independently of Platelet-activating Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:45034, 2003.
- [85] J. Liu, F. Kouzine, Z. Nie, H. J. Chung, Z. Elisha-Feil, A. Weber, K. Zhao, and D. Levens. The FUSE/FBP/FIR/TFIIH system is a molecular machine programming a pulse of c-myc expression. *EMBO Journal*, 25:2119–2130, 2006.
- [86] C. Lo, H. Wang, M. Dembo, and Y. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, 79:144–152, 2000.
- [87] J. Loscalzo. Personalized cardiovascular medicine and drug development: Time for a new paradigm. *Circulation*, 125:638–645, 2012.
- [88] P. M. Lushnikov, N. Chen, and M. Alber. Macroscopic dynamics of biological cells interacting via chemotaxis and direct contact. *Physical Review*, E 78:061904, 2008.
- [89] P. Maini, D. McElwain, and D. Leavesley. Travelling waves in a wound healing assay. *Applied Mathematics Letters*, 17:575–580, 2004.
- [90] I. V. Maly and G. G. Borisy. Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:11324–11329, 2001.
- [91] M. Malz, M. Bovet, J. Samarin, U. Rabenhorst, C. Sticht, M. Bissinger, S. Rössler, J. L. Bermejo, M. Renner, D. F. Calvisi, S. Singer, M. Ganzinger, A. Weber, N. Gretz, M. Zörnig, P. Schirmacher, and K. Breuhahn. Overexpression of far upstream element (FUSE) binding protein (FBP)-interacting repressor (FIR) supports growth of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 60:1241–1250, 2014.
- [92] M. Malz, F. Pinna, P. Schirmacher, and K. Breuhahn. Transcriptional regulators in hepatocarcinogenesis - key integrators of malignant transformation. *Journal of Hepatology*, 57:186–195, 2012.
- [93] Y. Matsubayashi, M. Ebisuya, S. Honjoh, and E. Nishida. ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Current Biology*, 14:731–735, 2004.
- [94] K. Matsushita, T. Tomonaga, H. Shimada, A. Shioya, M. Higashi, H. Matsumura, K. Harigaya, F. Nomura, D. Libutti, D. Levens, and T. Ochiai. An essential role of alternative splicing of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor in carcinogenesis. *Cancer Research*, 66:1409–1417, 2006.

-
- [95] F. A. Meineke, C. S. Potten, and M. Löffler. Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell Proliferation*, 34:253–266, 2001.
- [96] R. Meuwissen, S. C. Linn, R. I. Linnoila, J. Zevenhoven, W. J. Mooi, and A. Berns. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell*, 4:181–189, 2003.
- [97] G. K. Michalopoulos and R. Zarnegar. Hepatocyte growth factor. *Hepatology*, 15:149–154, 1992.
- [98] A. M. Middleton, C. Fleck, and R. Grima. A continuum approximation to an off-lattice individual-cell based model of cell migration and adhesion. *Journal of Theoretical Biology*, 359:220–232, 2014.
- [99] G. R. Mirams, C. J. Arthurs, M. O. Bernabeu, R. Bordas, J. Cooper, A. Corrias, Y. Davit, S.-J. Dunn, A. Fletcher, D. Harvey, M. Marsh, J. M. Osborne, P. Pathmanathan, J. Pitt-Francis, J. Southern, N. Zemezmi, and D. Gavaghan. Chaste: An open source c++ library for computational physiology and biology. *PLoS Computational Biology*, 9:e1002970, 2013.
- [100] T. J. Mitchinson and L. P. Cramer. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84:371–379, 1996.
- [101] A. Mogilner and L. Edelstein-Keshet. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophysical Journal*, 83:1237–1258, 2002.
- [102] F. Morgillo, W.-Y. Kim, E. S. Kim, F. Ciardiello, W. K. Hong, and H.-Y. Lee. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clinical Cancer Research*, 13:2795–2804, 2007.
- [103] B. Müller*, M. Bovet*, Y. Yin*, D. Stichel*, M. Malz, A. Middleton, V. Ehemann, J. Schmitt, T. Muley, M. Meister, E. Herpel, S. Singer, A. Warth, P. Schirmacher, D. Drasdo, F. Matthäus, and K. Breuhahn. Quantitative analysis of far upstream element (FUSE) binding protein (FBP) interacting repressor (FIR)-induced migration and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Pathology*, 2015. to appear, *: Authors contributed equally.
- [104] J. D. Murray. *Mathematical Biology: I. An Introduction*. Springer, New York, 2002.
- [105] J. D. Murray. *Spatial models and biomedical applications*. Springer, New York, 2003.

- [106] P. J. Murray, C. M. Edwards, M. J. Tindall, and P. K. Maini. Classifying general nonlinear force laws in cell-based models via the continuum limit. *Physical Review*, E 85:021921, 2012.
- [107] T. Nakamura. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Progress in Growth Factor Research*, 3:67–85, 1991.
- [108] T. J. Newman and R. Grima. Many-body theory of chemotactic cell-cell interactions. *Physical Review*, 2004, e70:051916, 2004.
- [109] D. L. Nikolić, A. N. Böttiger, D. Bar-Sagi, J. D. Carbeck, and S. Shvartsman. Role of boundary conditions in an experimental model of epithelial wound healing. *American Journal of Physiology*, 291:68–75, 2006.
- [110] T. Omelchenko, J. M. Vasiliev, I. M. Gelfand, H. H. Feder, and E. M. Bonder. Rho-dependent formation of epithelial leader cells during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:10788–10793, 2003.
- [111] A. Papoulis. *Signal analysis*. Mc Graw Hill, New York, 1977.
- [112] A. Papoulis. *Probability, Random Variables and Stochastic Processes*. Mc Graw Hill, New York, 1991.
- [113] L. Petitjean, M. Reffay, E. Grasland-Mongrain, M. Poujade, B. Ladoux, A. Buguin, and P. Silberzan. Velocity fields in a collectively migrating epithelium. *Biophysical Journal*, 98:1790–1800, 2010.
- [114] R. J. Petrie, A. Doyle, and K. Yamada. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10:538–549, 2009.
- [115] R. M. Phelps, B. E. Johnson, D. C. Ihde, A. F. Gazdar, D. P. Carbone, P. R. McClintock, R. I. Linnoila, M. J. Matthews, P. A. Bunn, D. Carney, J. D. Minna, and J. L. Mulshine. Nci-navy medical oncology branch cell line data base. *Journal of cellular biochemistry. Supplement.*, 24:32–91, 1996.
- [116] C. J. D. Pickering and N. A. Halliwell. Particle image velocimetry: improving fringe signal-to-noise ratio with a two-step photographic process. *Journal of the Optical Society of America A*, 2:610–615, 1985.
- [117] E. Platen. An introduction to numerical methods for stochastic differential equations. *Acta Numerica*, 8:197–246, 1999.
- [118] M. Poujade, E. Grasland-Mongrain, A. Hertzog, J. Jouanneau, P. Chavrier, B. Ladoux, A. Buguin, and P. Silberzan. Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *PNAS*, 104:15988–15993, 2007.

-
- [119] A. K. Prasad, R. Adrian, C. Landreth, and P. Offutt. Effect of resolution on the speed and accuracy of particle image velocimetry interrogation. *Experiments in Fluids*, 13:105–116, 1992.
- [120] The R project. <http://www.r-project.org>. Abgerufen am 13.08.2014.
- [121] M. Raffel, C. Willert, and J. Kompenhans. *Particle image velocimetry. A practical guide*. Springer, 1998.
- [122] M. Raftopoulou and A. Hall. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, 265:23–32, 2004.
- [123] R. Rami-Porta, V. Bolejack, and P. Goldstraw. The new tumor, node and metastasis staging system. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 32:44–51, 2011.
- [124] M. Reffay, M. C. Parrini, O. Cochet-Escartin, B. Ladoux, A. Buguin, S. Coscoy, F. Amblard, J. Camonis, and P. Silberzan. Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nature Cell Biology*, 16:217–225, 2014.
- [125] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302:1704–1709, 2003.
- [126] J. Riss, C. Khanna, S. Koo, G. V. Chandramouli, H. H. Yang, Y. Hu, D. E. Kleiner, A. Rosenwald, C. F. Schäfer, S. A. Ben-Sasson, L. Yang, J. Powell, D. W. Kane, R. A. Star, O. Aprelikova, K. Bauer, J. R. Vasselli, J. K. Maranchie, K. W. Kohn, K. H. Buetow, W. M. Linehan, and J. N. Weinstein. Cancers as wounds that do not heal: Differences and similarities between renal regeneration/repair and renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 66:7216–7224, 2006.
- [127] P. Rørth. Collective guidance of collective cell migration. *Trends in Cell Biology*, 17:575–579, 2007.
- [128] P. Rørth. Collective cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25:407–429, 2009.
- [129] R. Sancho, M. A. Calzado, V. Di Marzo, G. Appendino, and E. Muñoz. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Molecular Pharmacology*, 63:429–438, 2003.
- [130] F. Scarano and M. L. Riethmüller. Iterative multigrid approach in PIV image processing with discrete window offset. *Experiments in Fluids*, 26:513–523, 1999.

- [131] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rüdén, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 97:676–682, 2012.
- [132] S. Schmitt, K. Safferling, K. Westphal, M. Hrabowski, U. Müller, P. Angel, L. Wiechert, V. Ehemann, B. Müller, S. Holland-Cunz, D. Stichel, N. Harder, K. Rohr, G. Germann, F. Matthäus, P. Schirmacher, N. Grabe, and K. Breuhahn. Stathmin regulates keratinocyte proliferation and migration during cutaneous regeneration. *Plos One*, 8:e75075, 2013.
- [133] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceire. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:671–675, 2012.
- [134] N. Sepúlveda, L. Petitjean, O. Cochet, E. Grasland-Mongrain, P. Silberzan, and V. Hakim. Collective cell motion in an epithelial sheet can be quantitatively described by a stochastic interacting particle model. *PLoS Computational Biology*, 9:e1002944, 2013.
- [135] X. Serra-Picamal, V. Conte, R. Vincent, E. Anon, D. Tambe, E. Bazellieres, J. P. Butler, J. Fredberg, and X. Trepast. Mechanical waves during tissue expansion. *Nature Physics*, 8:628–634, 2012.
- [136] M. Simpson and R. Baker. Corrected mean-field models for spatially dependent advection-diffusion-reaction phenomena. *Physical Review*, E83:051922, 2011.
- [137] M. J. Simpson, C. Towne, D. L. S. McElwain, and Z. Upton. Migration of breast cancer cells: understanding the roles of volume exclusion and cell-to-cell adhesion. *Physical Review*, E 82:041901, 2010.
- [138] S. Singer, M. Malz, E. Herpel, A. Warth, M. Bissinger, M. Keith, T. Muley, M. Meister, H. Hoffmann, R. Penzel, G. Gdynia, V. Ehemann, P. A. Schnabel, R. Kuner, P. Huber, P. Schirmacher, and K. Breuhahn. Coordinated expression of stathmin family members by far upstream sequence element-binding protein-1 increases motility in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 69:2234–2243, 2009.
- [139] G. Skibinski. The role of hepatocyte growth factor/c-met interactions in the immune system. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51:277–282, 2004.
- [140] M. L. Slattery, C. Sweeney, R. Wolff, J. Herrick, K. Baumgartner, A. Giuliano, and T. Byers. Genetic variation in IGF1, IGFBP3, IRS1, IRS2 and

- risk of breast cancer in women living in Southwestern United States. *Breast Cancer Research and Treatment*, 104:197–209, 2007.
- [141] N. Speer, C. Spieth, and A. Zell. A memetic co-clustering algorithm for gene expression profiles and biological annotation. *Evolutionary Computation*, 2:1631–1638, 2004.
- [142] M. R. Spiegel, S. Lipschutz, and D. Spellman. *Vector Analysis*. McGraw Hill, 2009.
- [143] T. Sütterlin, C. Kolb, H. Dickhaus, D. Jaeger, and N. Grabe. Bridging the scales: semantic integration of quantitative SBML in graphical multicellular models and simulations with EPISIM and COPASI. *Bioinformatics*, 29:223–229, 2013.
- [144] K. Sveen. An Introduction to MatPIV v.1.6.1. Eprint, 2004. ISSN 0809-4403. Online erhältlich unter <http://www.math.uio.no/jks/matpiv/>; abgerufen am 8. August 2013.
- [145] B. Szabo, G. J. Szollosi, B. Gonci, Z. Juranyi, D. Selmeczi, and T. Vicsek. Phase transition in the collective migration of tissue cells: experiment and model. *Physical Review*, E 74 (Dec):061908, 2006.
- [146] E. W. Thompson and E. D. Williams. Emt and met in carcinoma - clinical observations, regulatory pathways and new models. *Clinical and Experimental Metastasis*, 25:591–592, 2008.
- [147] P. L. Townes and J. Holtfreter. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *Journal of experimental zoology*, 128:53–120, 1955.
- [148] X. Trepat, M. R. Wasserman, T. E. Angelini, E. Millet, D. A. Weitz, J. P. Butler, and J. J. Fredberg. Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics*, 5:426–430, 2009.
- [149] S. Turner, J. Sherratt, K. Painter, and N. Savill. From a discrete to a continuous model of biological cell movement. *Physical Review*, E 69:021910, 2004.
- [150] S. Turner and J. A. Sherratt. Intercellular adhesion and cancer invasion: a discrete simulation using the extended potts model. *Journal of Theoretical Biology*, 216:85–100, 2002.
- [151] M. Vicente-Manzanares, C. K. Choi, and A. R. Horwitz. Integrins in cell migration - the actin connection. *Journal of Cell Science*, 122:199–206, 2009.

- [152] M. Vicente-Manzanares, D. J. Webb, and R. A. Horwitz. Cell migration at a glance. *Journal of Cell Science*, 118:4917–4919, 2005.
- [153] P. Vitorino, M. Hammer, J. Kim, and T. Meyer. A steering model of endothelial sheet migration recapitulates monolayer integrity and directed collective migration. *Molecular and Cellular Biology*, 31:342–350, 2011.
- [154] P. Vitorino and T. Meyer. Modular control of endothelial sheet migration. *Genes & Development*, 22:3268–3281, 2008.
- [155] A. Warth, R. Penzel, H. Lindenmaier, R. Brandt, A. Stenzinger, E. Herpel, B. Göppert, M. Thomas, F. J. Herth, H. Dienemann, P. A. Schnabel, P. Schirmacher, H. Hoffmann, T. Muley, and W. Weichert. EGFR, KRAS, BRAF and ALK gene alterations in lung adenocarcinomas: patient outcome, interplay with morphology and immunophenotype. *European Respiratory Journal*, 43:872–883, 2014.
- [156] D. J. Webb, H. Zhang, and A. F. Horwitz. Cell migration: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 294:3–11, 2005.
- [157] G. F. Weber, M. A. Bjerke, and D. W. DeSimone. A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Developmental Cell*, 22:104–115, 2012.
- [158] J. Westerweel. Efficient detection of spurious vectors in particle image velocimetry. *Experiments in fluids*, 16:236–247, 1994.
- [159] K. Wolf, Y. I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M. S. Stack, and P. Friedl. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 9:893–904, 2007.
- [160] M. Zhao, B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, T. Sasaki, A. Suzuki, J. V. Forrester, H. R. Bourne, P. N. Devreotes, C. D. McCaig, and J. M. Penninger. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 442:457–460, 2006.
- [161] D. V. Zhelev, A. M. Alteraifi, and D. Chodniewicz. Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants. *Biophysical Journal*, 87:688–695, 2004.
- [162] C. Zimmer, B. Zhang, A. Dufour, A. Thébaud, S. Berlemont, V. Meas-Yedid, and J. C. Olivo-Marin. On the digital trail of mobile cells. *IEEE Signal Processing Magazine*, 23:54–62, 2006.

Danksagung

Bei der Fertigstellung dieser Arbeit haben die Hilfe und die Unterstützung von einigen Personen und Institutionen eine große Rolle gespielt. Bei allen möchte ich mich herzlich bedanken.

An erster Stelle möchte ich gerne Prof. Dr. Ursula Kummer für die Betreuung meiner Arbeit als Erstgutachterin danken.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Franziska Matthäus, die meine Arbeit während der gesamten Zeit direkt betreut hat. Sie hatte immer ein offenes Ohr und auf ihre Unterstützung bei Fragen und Problemen konnte ich immer zählen.

Weiterhin danke ich Dr. Alistair Middleton für die gute Zusammenarbeit und den regelmäßigen Austausch - auch über seine Zeit in Heidelberg hinaus.

Ein herzlicher Dank gilt Benedikt Müller vom Pathologischen Institut für die tolle interdisziplinäre Zusammenarbeit und die vielen Treffen und langen Diskussionen. In diesem Sinne möchte ich auch Dr. Sabrina Schmitt, Dr. Margarita Gonzalez, PD Dr. Kai Breuhahn (Pathologisches Institut Heidelberg) sowie Dr. Sonja Depner und Prof. Dr. Ursula Klingmüller (DKFZ, Heidelberg) für die Zusammenarbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Complex Biological Systems-Arbeitsgruppe Stefano Belloni, Vineet Kumar, Kai Kopfer und Sarah Kaspar für eine abwechslungsreiche Zeit im Büro bedanken. Auch danke ich Peter Kumberger, Michael Gabel, Neha Thakre und Frederik Graw. Die regelmäßigen Treffen zum Grillen, Frühstücken, etc. haben zu einer angenehmen und entspannten Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Dirk-Peter Herten und Prof. Dr. Stefan Wiemann, die sich bereit erklärt haben, der Prüfungskommission anzugehören.

Zu guter letzt ein großes Dankeschön an Sonja Krausert, die immer für mich da war und mich auch in schwierigen Phasen stets bei allem unterstützt hat.