

Kombinierte IR, Raman, CARS und TERS spektroskopische Untersuchungen an Darmkrebszellen der Linie HT29

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität von Diplom-Biologe

Marc Oliver Richter

geboren am 23.01.1977 in Warendorf

1. Gutachter: PD Dr. Volker Deckert

(Friedrich-Schiller-Universität Jena)

2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Popp

(Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.02.2012

*Für
meine Frau*

Inhaltsangabe

Verwendete Abkürzungen	8
1. Einleitung	9
2. Theoretischer Hintergrund	14
2.1. Die Zelle – Von Kompartimentierung bis Lipid- und Proteinbiosynthese 14	
2.1.1. Die Zellmembran – Membranproteine und Lipid Rafts.....	16
2.1.2. Integrine – vielseitige Rezeptoren.....	21
2.1.3. Das Integrin-Zell-Modell – Integrinaktivierung über LPS.....	24
2.2. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	28
2.3. Fluoreszenzmikroskopie	35
2.3.1. Einsatz von Farbstoffen.....	36
2.4. Schwingungsspektroskopische Verfahren	40
2.4.1. Infrarot-Spektroskopie.....	42
2.4.1.1. Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie.....	43
2.5. Raman-Spektroskopie	45
2.5.1. Lineare Raman-Spektroskopie.....	45
2.5.2. Nicht-lineare Ramanmikroskopie.....	51
2.5.3. Oberflächenverstärkte Raman-Streuung.....	54
2.5.3.1. Elektromagnetische Verstärkung.....	56
2.5.3.2. Chemische Verstärkung.....	59
2.5.4. Spitzenverstärkte Raman-Streuung („tip-enhanced Raman scattering“ – TERS).....	61
2.5.4.1. Rastersondenmikroskopie	62
2.5.4.2. Nahfeld-Optik.....	67
2.5.4.3. TERS-Spitzenproduktion.....	71
2.5.4.4. TERS-Aufbau.....	73
2.5.4.5. TERS-Instrumentierung.....	74
2.6. Multivariate Datenanalyse	76
2.6.1. Hauptkomponentenanalyse	77
2.6.2. N-FINDR	80
2.6.3. Support vector machine	81
3. Material und Methoden	82
3.1. Zellen und Zellzucht	82
3.2. PCR	82
3.3. Fluoreszenz	84
3.4. FT-IR	85
3.5. Raman	86
3.6. CARS	87
3.7. Tip-enhanced Raman Scattering	88
3.7.1. Spitzenproduktion	89
3.7.2. Positionierung der Spitze im Laserfokus.....	90
4. Ergebnis und Diskussion	91
4.1. Fluoreszenz	91
4.2. RT-PCR	93
4.3. IR-Spektroskopie	101
4.3.1. Datenverarbeitung/analyse	102
4.3.2. Statistische Auswertung der IR-Daten.....	104
4.4. Raman Messungen	109
4.4.1. Statistische Auswertung der Raman-Daten.....	110
4.4.2. Spektrale Auswertung der Raman-Daten.....	115

4.5. CARS	118
4.6. TERS	122
4.6.1. TERS-Kartierung von HT29-Zellen.....	122
4.6.2. TERS-Datenanalyse	126
4.6.2.1. HCA	126
4.6.2.2. N-FINDR.....	127
4.6.3. Biologische Zuordnung der N-FINDR-Ergebnisse	133
4.6.4. Variation des TERS-Messbereichs	137
4.6.5. Verteilung von Lipid- und Proteindomänen innerhalb der Zellmembran	138
4.6.6. Untersuchung LPS-behandelter Zellmembran.....	141
5. Zusammenfassung & Ausblick.....	145
6. Referenzliste	150
7. Abbildungsverzeichnis	168
8. Tabellenverzeichnis.....	177
A. Anhang	178
I. Weitere Abbildungen.....	178
II. Eigene Veröffentlichungen	190
II.1. Wissenschaftliche Artikel	190
II.2. Buchkapitel	190
II.3. Auszeichnungen	190
II.4. Wissenschaftliche Vorträge	191
II.5. Wissenschaftliche Poster	191
III. Lebenslauf	193
IV. Selbstständigkeitserklärung	194
Danksagung.....	195

Verwendete Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop	nm	Nanometer
ANN	Artificial Neuronal Network	NO	Stickstoffmonoxid
BSA	bovine serum albumin	NSOM	near-field scanning optical microscope
CARS	kohärente anti-stokes Raman-Spektroskopie	OPN	Osteopontin
cDNA	komplimentäre DNA	PBS	phosphate buffered saline
ct	cycle threshold	PC	principle component
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	PCA	Hauptkomponenten-analyse
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum	qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
FCS	fetal calf serum	RMieSc	resonante Mie-Streuung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	RNA	Ribonukleinsäure
FRET	Förster-Resonanzenergie-transfer	RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie	SERS	Surface-enhanced Raman Spectroscopy
HCA	hierarchische Cluster-Analyse	SIBLING	Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	SNOM	Scanning Near-field Optical Microscope
IR	Infrarot	SPP1	Osteopontin-Gen
ITGAV	Integrin α_v	Src	cytosolische Tyrosinkinase
ITGB3	Integrin β_3	SVM	Support Vector Machine
ITGB5	Integrin β_5	TAO	Tip assisted Optics module
LDA	Linear Discriminant Analysis	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
LPS	Lipopolysaccharid	TERS	Tip-enhanced Raman Scattering
mm	Millimeter	μm	Mikrometer
mRNA	messenger RNA		

1. Einleitung

Über Jahrzehnte wurde die Zellmembran als passiv und aus wissenschaftlicher Sicht als eher uninteressant angesehen. Dies änderte sich jedoch, als entdeckt wurde, dass die vorliegende Lipidasymmetrie innerhalb der Zellmembran dynamisch ist und auch aktiv kontrolliert wird¹. Der hierfür benötigte intrazelluläre Transport von Membranlipiden rückte somit in den Fokus der Wissenschaft. Damit einhergehend wurden die hierbei involvierten Signalkaskaden aufgedeckt. Im Laufe der Jahre wurden unzählige weitere Signalkaskaden neu entdeckt, genauer untersucht oder prognostiziert. Angefangen von Bakterien² bis hin zu eukaryotischen Zellen^{3,4} wurde die Bedeutung von Signalkaskaden für die Regulation zellulärer physiologischer Prozesse⁵, der Zellkommunikation⁶, der Zellmigration⁷ und für zelluläre Immunantworten offenkundig⁸. Diese Vorgänge beinhalten Kaskaden, welche zum einen Signale von innen nach außen gerichtet („inside-out“) weiterleiten oder Signale von außen aufnehmen und ins Zellinnere weitergeben („outside-in“)^{9,10}. Beide Prozesse beeinflussen physiologische Vorgänge innerhalb der Zelle und können so intrazelluläre Veränderungen hervorrufen. Diese können sich sowohl auf die Gesamtzusammensetzung von Zellbestandteilen wie Lipidmembranen oder lediglich auf die Aktivierung einzelner Membranproteine auswirken. Die hierdurch hervorgerufenen Effekte sind zum Beispiel Veränderung der Fluidität der Membran¹¹ mit einhergehender modulierter Permeabilität für Ionen oder auch die durch Aktivierung von Membranproteinen veränderte Proteinverteilung innerhalb der Zellmembran durch eine vermehrte Einlagerung von Membranproteinen in sogenannte „Lipid rafts“¹².

Da die zellulären Abläufe und Veränderungen von gesunden Zellen größtenteils bekannt sind, werden derzeit auftretende krankheitsinduzierte Abweichungen in der medizinische Forschung untersucht, um genauere Aufschlüsse über die Entstehung, den Ablauf, die Verbreitung und die Heilung von Krankheiten zu erhalten. In der klinischen Forschung werden eine Vielzahl unterschiedlicher Techniken verwendet, um Krankheiten zu untersuchen bzw. Medikamente zu entwickeln. So werden auf den Gebieten der Metabolomik (Metabolomics) und Proteomik (Proteomics) Techniken wie Massenspektrometrie (MS)¹³, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)¹⁴, Polymerase-Kettenreaktion (PCR)¹⁵ oder auf Elektrophorese basierende Methoden eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methoden oder darauf basierender Modifizierungen lassen sich Aussagen über die chemische Zusammensetzung der Probe und zum Teil auch quantitative Angaben über krankheitsbedingte Veränderungen der Zelle gewinnen. Alle diese Techniken arbeiten jedoch destruktiv, welches keine weiteren Analysen der Proben zulassen.

Eine nicht-destruktive und in der Biologie häufig eingesetzte Methode zur Untersuchung von Zellen ist die Fluoreszenzmikroskopie. Obwohl diese Technik nur in Ansätzen^{16,17} quantitativ auswertbar ist, wird sie sowohl für die Analyse der Gesamtzusammensetzung von Zellen als auch für die Analyse von Einzelproteinen eingesetzt. Vor allem auf dem Gebiet der Einzelmoleküluntersuchung werden auf Fluoreszenzmikroskopie basierende und weiterentwickelte Techniken wie Stimulated Emission Depletion (STED)¹⁸, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)¹⁹ und Photoactivated Localization Microscopy (PALM)²⁰ verwendet. Der Nachteil dieser Methoden

liegt zum einen in der eingeschränkten chemischen Information und zum anderen in der Verwendung von Fluoreszenzmarkern. Da für jede zu untersuchende Zielstruktur ein eigener Marker mit einer dementsprechenden Anregungswellenlänge verwendet werden muss, sind mögliche simultane Untersuchungen von mehreren Strukturen limitiert²¹. Des Weiteren kann die Verwendung von Markern, deren Größe die Zielstruktur erreichen oder sogar übertreffen können, Messungenauigkeiten bei Messungen im unteren Nanometerbereich mit sich bringen. Ein weiterer durch die Verwendung von Markermolekülen hervorgerufener Nachteil liegt in der Tatsache, dass bereits vor der eigentlichen Untersuchung Hintergrundwissen über die Probe vorhanden sein muss. Dies ist notwendig, da sich nur bekannte Moleküle markieren lassen.

Einen gänzlich anderen Ansatz liefern die in dieser Arbeit verwendeten schwingungsspektroskopischen Techniken der IR- und Ramanspektroskopie. Hierbei handelt es sich um nicht-destruktive und markerfreie Methoden, welche in Kombination mit multivariaten statistischen Datenanalysemethoden das Potenzial besitzen, die gängigen Analysemethoden zu ergänzen oder sogar zu übertreffen. So können markerfreie Analysen von Geweben bis hin zu Einzelzelluntersuchungen durchgeführt werden. Durch die Zuordnung der Raman- und IR-Banden zu spezifischen chemischen Gruppen, zellulären Bestandteilen oder Strukturen, lassen sich analog zu MS- oder HPLC-Untersuchungen chemische Informationen über die Probenbeschaffenheit und dementsprechend auch Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung von Zellen detektieren.

Um ein besseres Verständnis über biologische Abläufe zellulärer Bestandteile zu erlangen sind fundierte Kenntnisse über deren Funktionen bzw. den hierbei beteiligten biochemische und biophysikalische Prozessen wünschenswert. Ein präzises Wissen über das chemische Design sowie die räumliche Anordnung der einzelnen Moleküle zueinander ermöglicht hierbei einen Einblick in die Struktur-Aktivitäts-Abhängigkeit der biologischen Moleküle. Hierfür, ist es notwendig die Zusammensetzung und Struktur der jeweiligen Moleküle hochortsaufgelöst zu analysieren. Ein Ansatz für molekulspezifische Untersuchungen mit hoher Ortsauflösung stellen die so genannten nahfeld-optischen Methoden dar. Diese auch als „scanning near-field optical microscopy“ (SNOM)²² bekannte Methode ermöglicht Untersuchungen mit einer Auflösung unterhalb des Abbe-Limits. Bei der klassischen beugungslimitierten Mikroskopie ist das Auflösungsvermögen abhängig von der verwendeten Wellenlänge. Für sichtbares Licht kann eine theoretische Auflösung von 200 bis 300 nm erzielt werden. Durch die Verwendung einer submikroskopischen Lichtquelle (Nahfeldsonde) lässt sich eine Auflösung unterhalb von 100 nm erreichen. Die nah an die Probe herangebrachte Nahfeldsonde kann entweder aus einer apertur-basierenden Spitze, durch die das Licht geleitet wird oder aus einer so genannten Streu-SNOM-Spitze bestehen. Die aus einer Kombination von Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Ramanspektroskopie bestehende Technik TERS (tip-enhanced Raman spectroscopy) verwendet mit Silber beschichtete Streu-SNOM-Spitzen als Nahfeldsonden. Hierdurch wird zum einen eine hohe Ortsauflösung ermöglicht und zum andern durch die Verwendung von Silber das intrinsisch schwache Raman-Signal verstärkt. Auf diese Weise ermöglicht TERS eine markerfreie Charakterisierung von Probenoberflächen auf Nanometer-Ebene²³.

Methoden wie MS und Scanning Electron Microscopy (SEM) erreichen mittlerweile auch Auflösungen auf Nanometer-Ebene²⁴, sind jedoch konträr zu STED, STORM, PALM und TERS destruktiver Natur. Im Kontrast zu STED, STORM und PALM, kann bei TERS auf die Verwendung von Markern verzichtet werden, und es können simultan Informationen über die Topographie und die chemische Zusammensetzung der Probe gesammelt werden. Im Gegensatz zu PALM und STED ist TERS aufgrund der verwendeten TERS-Spitze auf Untersuchungen von Probenoberflächen beschränkt. TERS besitzt aber dafür das Potential wie Fluoreszenzmethoden, nämlich Messungen *in vivo* durchführen zu können^{25,26}, jedoch ohne dabei vergleichbaren Limitierungen in Bezug auf Anzahl der zu untersuchenden Molekülklassen als auch benötigtes Hintergrundwissen über die Probe zu unterliegen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, schwingungsspektroskopische Verfahren in Kombination mit multivariaten statistischen Methoden an biologischen Systemen anzuwenden und deren Potential in der biologischen oder medizinischen Forschung herauszuarbeiten. Hierfür sollen an einem generierten Zellmodell zum einen die Veränderungen der Gesamtkomposition der Zelle bei künstlicher Infektion mit Hilfe von Infrarot- und Ramanspektroskopie sowie der kohärenten Anti-Stokes-Ramanspektroskopie (CARS) analysiert werden; zum anderen sollen mit Hilfe von TERS Untersuchungen an dem generierten Zellmodell durchgeführt werden. Von Interesse ist hierbei die Unterscheidung und Verteilung von Proteinen und Lipiden innerhalb der Zellmembran, bzw. deren Veränderung durch die künstliche Infektion.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. *Die Zelle – Von Kompartimentierung bis Lipid- und Proteinbiosynthese*

Die Zelle bildet die elementare Einheit aller Lebewesen. Es gibt einzellige Organismen, die aus nur einer Zelle bestehen und Vielzeller, bei denen sich die Zellen zu einer funktionellen Einheit verbunden haben. Durch Spezialisierung der einzelnen Zellen entstehen unterschiedliche Gewebetypen. Hierbei wird die Selbstständigkeit der einzelnen Zelle weitgehend aufgegeben, sodass sie einzeln überwiegend nicht lebensfähig sind und nur unter künstlich kontrollierter Umgebung überleben können. Je nach Spezialisierung kann die Größe einer menschliche Zelle von 3 – 100 μm variieren. Im Laufe der Evolution haben sich zwei verschiedene Gruppen von Zellen entwickelt: die Prokaryonten (Archaeen und Bakterien) und die Eukaryonten. Im Gegensatz zu den vergleichbar einfach gebauten Prokaryonten liegt bei den Eukaryonten die DNA nicht frei im Cytoplasma, sondern als Chromosomen organisiert im Zellkern (Nukleus) vor (Abb. 2.1). Des Weiteren unterscheiden sich Eukaryonten von Prokaryonten durch das Vorhandensein unterschiedlicher Typen von Zellorganellen. Die Eukaryonten besitzen ein Endomembransystem bestehend aus der Nukleusmembran, den Lysosomen, dem Golgi-Apparat sowie dem rauen und glatten Endoplasmatischem Reticulum (ER). Aufgrund der Spezialisierung der einzelnen Organellen nehmen diese unterschiedliche Aufgaben wahr.

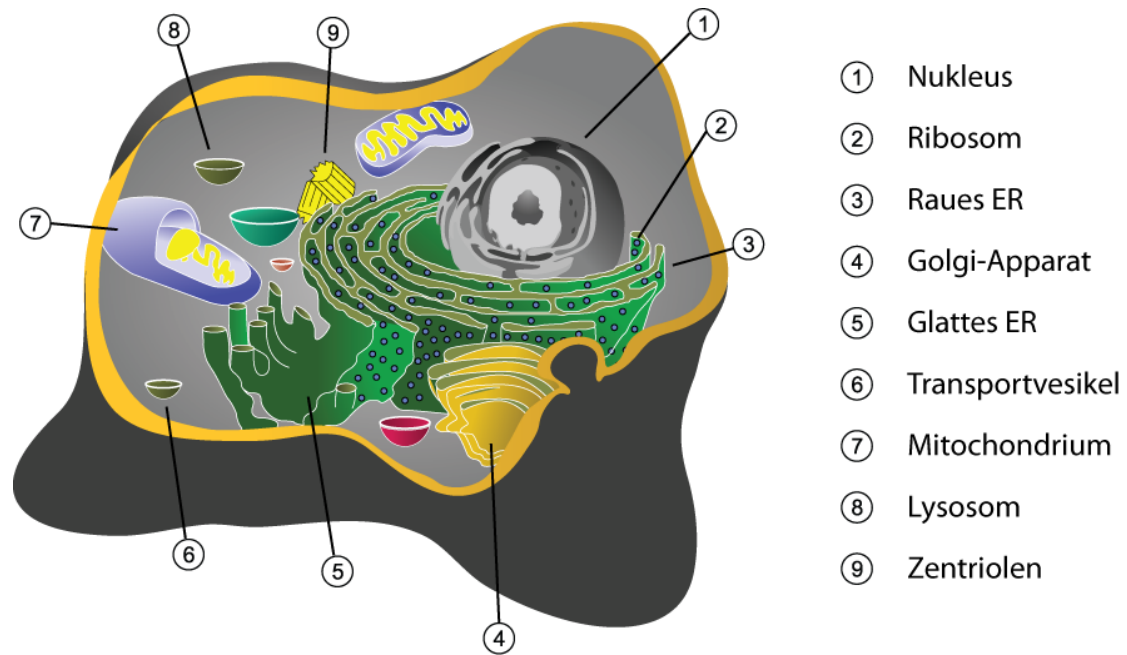


Abbildung 2.1: Übersicht über eine vereinfacht dargestellte humane eukaryontische Zelle. Dargestellt sind unter anderem der Zellkern (Nukleus), raues und glattes ER, der Golgi-Apparat, Mitochondrien und verschiedene Vesikel. (Abbildung basiert auf Ref. ²⁷⁾)

Die Lipidbiosynthese der Zelle findet fast ausschließlich im glatten ER statt. Dieses, auch transitorisch genannte ER, ist besonders in den auf Lipidstoffwechsel spezialisierten Zellen ausgebildet. Dahingegen hat das an der cytosolischen Seite mit membranverankerten Ribosomen bestückte raue ER eine zentrale Funktion in der Proteinbiosynthese von Transmembran- und wasserlöslichen Proteinen. Der ersten Schritt der Proteinbiosynthese beinhaltet die Transkription. Hierbei wird die Geninformation aus der DNA abgelesen und enzymatisch in messenger-RNA (mRNA) übersetzt. Der zweite Schritt der Proteinbiosynthese, die Translation, geschieht an den freien und im rauen ER gebundenen Ribosomen. Dort findet die Übersetzung der Basensequenz der RNA in die Aminosäuresequenz des produzierten Proteins statt. Am rauen ER werden die Proteine während der Translation (cotranslational) importiert, protein-spezifisch gefaltet und nach abgeschlossener Translation (posttranslational)

modifiziert. Anschließend werden die synthetisierten Proteine und Lipide in Transportvesikeln oder Organell-Bruchstücken zur weiteren Modifizierung und Sortierung in den Golgi-Apparat transportiert.

Modifizierungen wie Phosphorylierung und Glykosylierung leiten den Weitertransport an unterschiedliche Bestimmungsorte ein. Via Vesikeltransport werden die entstandenen Phospho- und Glykoproteine in die Lysosomen bzw. zur Zellmembran weitergeleitet. Die im Transportvesikel vorhandenen Lipide und Proteine können vom Zelltyp abhängig auf unterschiedliche Art und Weise mit der Zellmembran fusionieren und ihren Inhalt freigeben (Exozytose). Lediglich die auf Sekretion spezialisierten Zellen können Produkte wie Hormone, Neurotransmitter oder Verdauungsenzyme über einen regulierten Ausscheidungsweg freisetzen. Die zweite Möglichkeit der Exozytose ist der ungetriggerte (konstitutive) Ausscheidungsweg. Dieser benötigt keine spezifische Stimulanz, läuft in allen Zellen ab und ist für diese essentiell, da hierdurch die Zellmembran mit neuen Lipiden und Proteinen versorgt wird.

2.1.1. Die Zellmembran – Membranproteine und Lipid Rafts

Die Plasmamembran umschließt die Zelle und erhält die lebenswichtige Trennung zwischen Cytosol und extrazellulärer Umgebung aufrecht. Bei den membranumschlossenen Organellen sorgen die Membranen für charakteristische Unterschiede zwischen dem Inhalt des jeweiligen Organells und dem Cytoplasma. Die Membran wird aus einer Lipiddoppelschicht, bestehend aus amphipathischen Molekülen, geformt. Diese Lipide besitzen eine

hydrophile Kopfgruppe und hydrophobe, langkettige Kohlenwasserstoffreste. Phospholipide und Glykosphingolipide (Abb. 2.2) sind die am häufigsten vorkommenden Membranlipide. Phospholipide sind mit den Fetten strukturell verwandt, besitzen aber nur zwei statt drei Fettsäureketten (4, 5, 7 und 8 in Abb. 2.2). Die Länge der Fettsäuren kann variieren, sie können sowohl gesättigt, einfach ungesättigt als auch mehrfach ungesättigt vorliegen. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins (3 in Abb. 2.2) ist mit einer Phosphatgruppe verbunden, welche eine negative elektrische Ladung trägt. Abbildung 2.2 zeigt die Struktur des zu den Phospholipiden gehörenden Phosphatidylcholins. Hier ist ein Cholinrest als polare funktionelle Gruppe an die Phosphatgruppe gebunden.

Weitere zu den Phospholipiden zählende Lipide sind unter anderem Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol. Diese Phospholipide unterscheiden sich hauptsächlich in der gebundenen polaren funktionellen Gruppe an der Phosphatgruppe. Ein Derivat der Sphingolipide ist Sphingomyelin, bei dem der Zuckerrest eines Glykosphingolipids durch eine Cholingruppe ersetzt ist. Bedingt durch einen höheren Anteil an Lipiden mit ungesättigten Fettsäureresten steigt die Fluidität der Membran. Der daraus resultierenden Veränderung der Permeabilität kann durch die Einlagerung von Cholesterin (Abb. 2.2) entgegengewirkt werden. Dies ist notwendig, da einige Membrantransport- und Membranproteinprozesse zum Erliegen kommen, wenn die Viskosität der Doppelmembran über einen gewissen Schwellenwert hinaus erhöht wird.

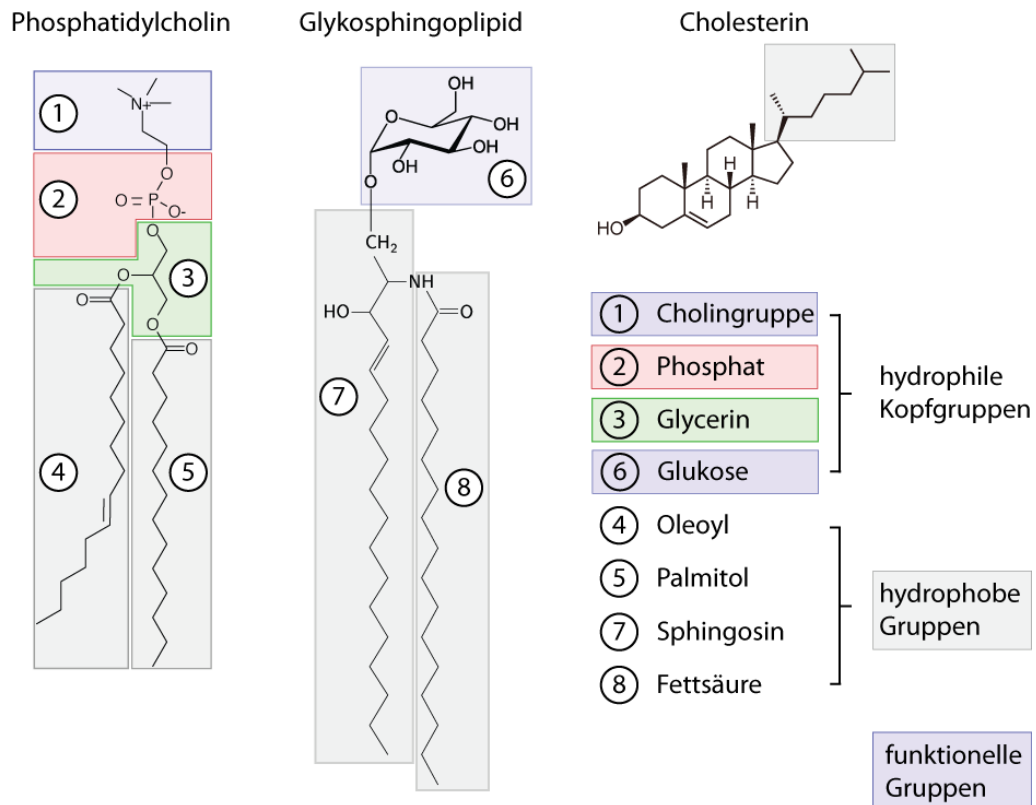


Abbildung 2.2: Aufbau Bestandteile der Lipidmembran einer eukaryontischen Zelle: Phospholipid (am Beispiel von Phosphatidylcholin), Glykosphingolipid und Cholesterol. Die Strukturformeln des Phosphatidylcholins und des Glykosphingolipids verdeutlichen die Unterteilung der Lipide in ihre hydrophilen, hydrophoben und funktionellen Gruppen. (Abbildung basiert auf Ref.²⁸)

Während sich die Lipide in der Membranebene recht schnell bewegen können, ist die Mobilität der Membranproteine aufgrund ihrer Größe und durch Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett der Zelle eingeschränkt bzw. komplett unterbunden²⁹.

Die Membranproteine sind für die meisten spezifischen Funktionen der Membran verantwortlich und verleihen der Zellmembran ihre charakteristische funktionelle Eigenschaft. Membranproteine lassen sich in integrale und periphere Membranproteine unterscheiden (Abb. 2.3). Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten der Assoziation von Membranproteinen mit der

Lipiddoppelschicht. Zu der Gruppe der integralen Proteine gehören zum einen Membranproteine, die über Lipidgruppen in der Membran verankert sind und zum anderen Transmembranproteine, deren hydrophobe Region in die Lipidmembran eingelagert sind. Die hydrophile Region des Proteins reicht dabei in das Cytosol bzw. in die extrazelluläre Matrix. Transmembranproteine können enzymatische Aufgaben übernehmen oder als Transport- oder Rezeptorproteine fungieren. Sie können als Kanal für den selektiven Transport diverser Moleküle dienen oder auch bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. Andere Transmembranproteine dagegen sind für die Zell-Zell-Erkennung oder für die Aneinanderkopplung benachbarter Zellen notwendig. Im Gegensatz zu den integralen Membranproteinen haben die peripheren Membranproteine keinen Kontakt mit dem hydrophoben Inneren der Lipidmembran und sind lediglich durch hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen an die Membran gebunden. Dabei dienen sie hauptsächlich als Ankerpunkte für das Cytoskelett oder extrazelluläre Fasern.

Die Zusammensetzung der äußeren und inneren Membranschicht ist unterschiedlich und spiegelt die diversen Funktionen der beiden Seiten der Zellmembran wieder. Dies gilt nicht nur für Membranen unterschiedlicher Zelltypen sondern auch innerhalb einer eukaryotischen Zelle. So kommt es zum Beispiel zur Bildung von Mikrodomänen, sogenannten „lipid rafts“, in der Plasmamembran (Abb. 2.3).

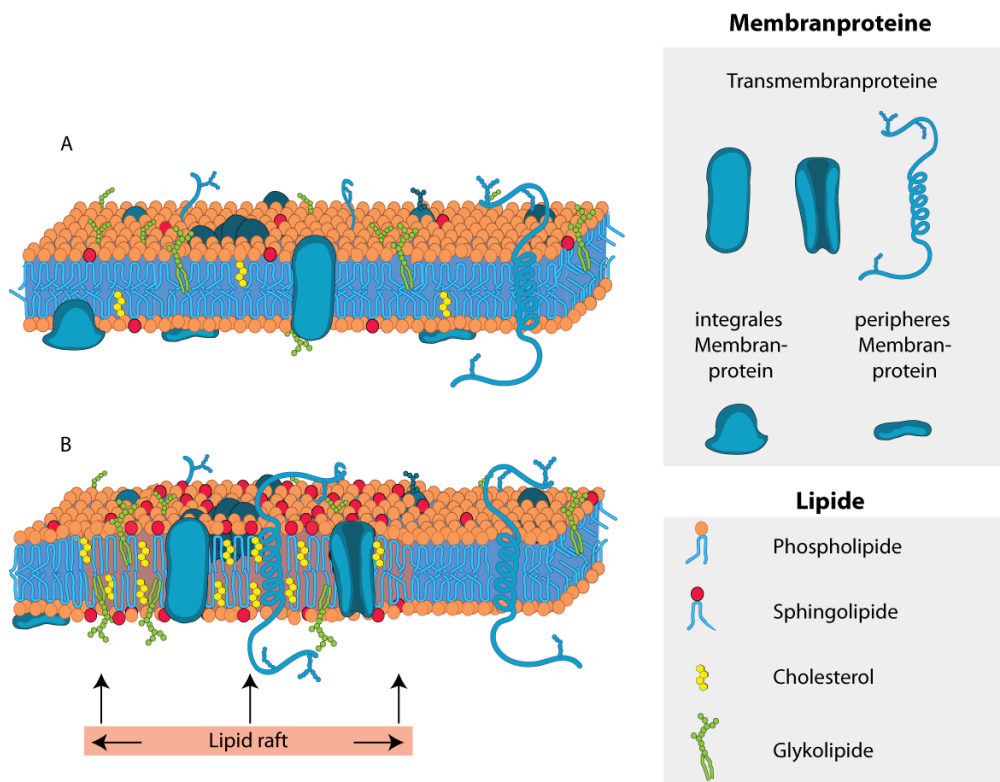


Abbildung 2.3: Ansicht auf die Zellmembran einer menschlichen Zelle (A) und auf ein ‚Lipid Raft‘ in der Membran (B). Die vermehrte Akkumulation von Cholesterin und Sphingolipiden als auch die Einlagerung von Membranproteinen in das ‚Lipid Raft‘ sind deutlich zu erkennen. (Abbildung basiert auf Ref.³⁰)

In diesen Domänen liegen Sphingolipide und Cholesterin konzentriert vor und halten benachbarte Moleküle in kleinen Mikrodomänen zusammen. Diese Domänen wurden 2006 auf dem Keystone-Symposium of Lipid Rafts and Cell Function wie folgt definiert³¹: „Lipid Rafts sind kleine (10-200 nm), heterogene, hoch dynamische Domänen“. Die Größe von Lipid Rafts und die Proteinzusammensetzung innerhalb der Domäne können sich durch intra- und extrazelluläre Stimuli verändern³². Durch die Einlagerung von Membranproteinen in Lipid Rafts wird die funktionelle Aktivität der Proteine beeinflusst³³. Analysen der eingelagerten Proteine verdeutlichen die große Vielfalt an signaltransduktion-spezifischen Proteinen. So wurden unter anderem T-Zell-Rezeptoren³⁴, Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankerte Proteine³⁵,

Rezeptoren für epidermale Wachstumsfaktoren³⁶, Insulin-Rezeptoren³⁷ und Integrine¹² in Lipid Rafts nachgewiesen.

2.1.2. Integrine – vielseitige Rezeptoren

Die Familie der Integrine besteht aus $\alpha\beta$ -Heterodimeren, die sich hauptsächlich in den extrazellulären Raum erstrecken (Ektodomäne). Lediglich ein kleiner Teil der Polypeptidkette ragt in das Cytosol bzw. ist in die Zellmembran eingelagert. Abbildung 2.4 verdeutlicht die unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten und die möglichen Dimerbildungen. Die 8 β -Untereinheiten können mit den 18 α -Untereinheiten 24 mögliche Integrine bilden, die nahezu in jedem Zelltyp vorhanden sind und für eine Vielzahl von Molekülen aus der extrazellulären Matrix als Rezeptoren fungieren.

Im Zusammenspiel mit ihren Liganden sind Integrine unter anderem involviert in die Zellentwicklung, Immunantwort, Leukozytentransport, Hämostase, Krebsentstehung, genetische und autoimmun-bedingte Krankheiten³⁸ und chronische Darmerkrankungen³⁹.

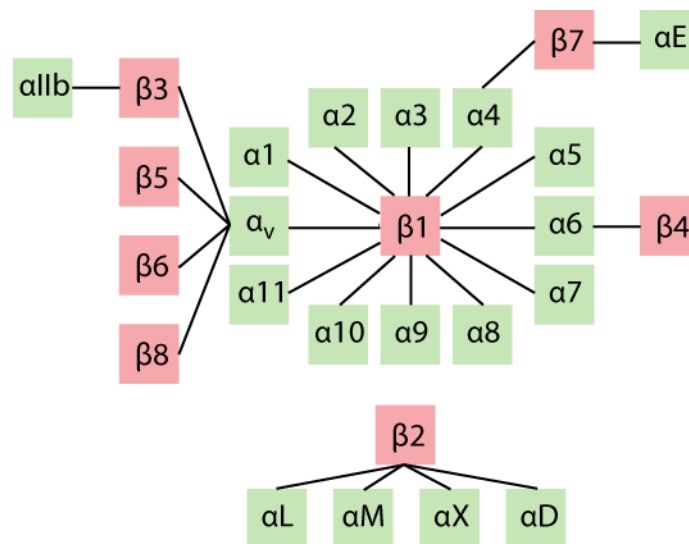


Abbildung 2.4: Integrine liegen in der Zellmembran als Dimere vor, bestehend aus α - und β -Untereinheiten. Es gibt verschiedene Integrinkombinationen, denen im menschlichen Körper vielfältige und biologisch essenzielle Aufgaben zugesprochen werden³⁸.

Die transportierten Signale können zum einen von außen nach innen gerichtet sein („outside-in“), als auch umgekehrt („inside-out“). Viele Integrine sind nach ihrer Expression und Einlagerung in die Zellmembran in einem inaktiven Zustand und sind so nicht in der Lage, Liganden zu binden bzw. Signale weiterzuleiten (Abb. 2.5). In diesem so genannten ‚low-affinity state‘ liegen die Ektodomängruppen der α - und β -Untereinheiten in einer gefalteten Konfiguration vor⁴⁰. Durch die Aktivierung der Integrine beim ‚inside-out‘-Transport von Signalen entfalten sich die Untereinheiten, und es kommt zu einem Auseinanderwandern der Transmembran- und Cytosoluntereinheiten⁴¹. Diese allosterische Bewegung kann unter anderem durch die Bindung eines Effektors an der cytosolischen Seite der α - und β -Untereinheiten eingeleitet werden^{42,43}. Nach der Entfaltung des Dimers bindet die β -Untereinheiten durch die Vermittlung eines Cytoplasma-Adapterproteins an das Aktin-Cytoskelett⁴⁴.

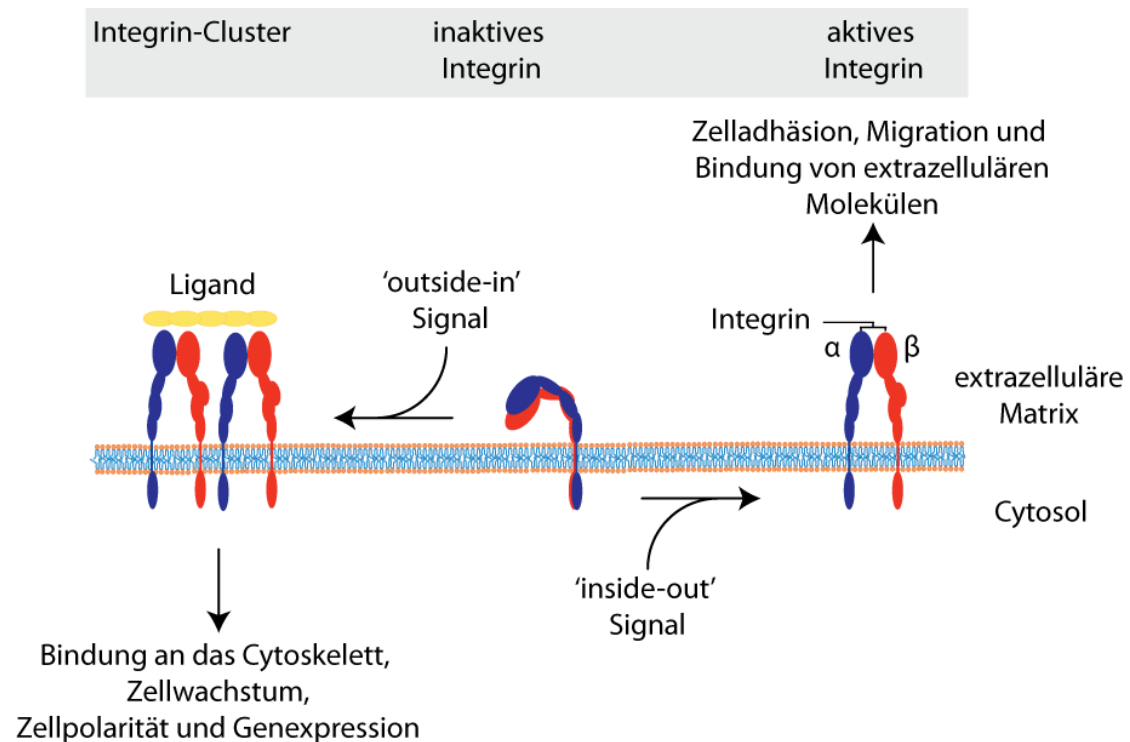


Abbildung 2.5: Integrine existieren in verschiedenen Formen auf der Zellmembran. Sie können entweder inaktiv, aktiv oder in Form von Clustern vorliegen. Dabei können sowohl ‚outside-in‘- als auch ‚inside-out‘-Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Obwohl beide Prozesse hier getrennt erwähnt werden, sind sie oft miteinander verknüpft.

Bei ‚outside-in‘ gerichteten Signalen können Integrine unterschiedliche cytosolische Wachstumsfaktoren und sekundäre Botenstoffe rekrutieren und so Signalkaskaden in Gang setzen⁴⁵. Durch die Bindung extrazellulärer Liganden kommt es auch hier zu einer Konformationsänderung der Integrine. Da Integrine multivalent sind, kommt es zusätzlich zur Bildung von Integrin-Clustern⁴⁶.

Obwohl beide Arten der Signaltransduktion getrennt voneinander betrachtet werden, können sie miteinander interagieren. So kann eine ‚inside-out‘-Aktivierung eine vermehrte Bindung an extrazellulären Liganden verursachen und so ‚outside-in‘-Signale hervorrufen. Umgekehrt kann die Bindung extrazellulärer Liganden ‚inside-out‘-Signale induzieren.

Die Störung der Integrin-Signaltransduktion geht mit verschiedenen Krankheiten einher und liefert so Ansätze für voneinander abweichende medizinische Therapien. Diese reichen von Immunotherapien gegen postoperatives Metastasenwachstum⁴⁷, akute Durchblutungsstörungen der Herzkranzgefäße (akutes Koronarsyndrom)⁴⁸, Multiple Sklerose⁴⁹ bis hin zur Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa^{50,51}.

2.1.3. Das Integrin-Zell-Modell – Integrinaktivierung über LPS

Um in der Medizin den Ablauf einer Krankheit auf Protein-Level analysieren zu können, sind künstlich erzeugte Modellorganismen notwendig. Anhand dieser Modelle lassen sich die verschiedensten Signalkaskaden untersuchen und auch deren Regulationsmechanismen detektieren. Diese Modellorganismen können zum einen aus gezüchteten Ratten und Mäusen^{52,53}, zum anderen aus Maus-Zelllinien⁵⁴ als auch aus menschlichen Zelllinien bestehen⁵⁵. In voneinander unabhängigen Studien wurden alle drei Modelle erfolgreich zur Untersuchung Integrin-induzierter Signalkaskaden verwendet, wobei verschiedene Regulations-Mechanismen beobachtet wurden.^{53,56-59} So wurde beispielsweise ein direkter Zusammenhang zwischen der Signalaktivität der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ und dem Cholesterol- bzw. Glykosphingolipid-Gehalt in der Zellmembran festgestellt⁶⁰. Aber nicht nur Lipide haben einen regulatorischen Einfluss auf die Integrine, sondern auch eine Vielzahl von Proteinen. Unabhängige Untersuchungen zeigten, dass die Proteine der Ras-Subfamilie, welche den

kleinen GTPasen angehört, einen wichtigen Bestandteil der Regulation der Integrinfunktion darstellen⁶¹.

Eine Möglichkeit, um Untersuchungen der Integrin-Signalkaskade durch die Veränderungen des Lipidgehaltes der Zellmembran oder die Modifizierung der Ras GTPase-Aktivität darzustellen, besteht in der genetischen Veränderung des Modellorganismus. So lassen sich gezielt Interaktionen einzelner Komponenten beobachten. Der Nachteil eines Modells mit transfizierten oder genetisch veränderten Zellen besteht allerdings darin, dass nur ein bestimmter Zustand der Zelle betrachtet wird (z.B. Überexpression eines bestimmten Proteins oder Lipids). Für die Untersuchung der gesamten Integrin-Signalkaskade müssten somit mehrere Modelle erzeugt werden, wodurch diese Methode eher für die Grundlagenforschung der Integrine in Frage kommt.

Eine weitere Kehrseite dieser modifizierten Modelle sind deren Inkompatibilität mit der Entwicklung von medizinisch relevanten Medikamenten, da sich die veränderten Modelle zu sehr von den medizinisch realistischen Organismen unterscheiden. Um die Kohärenz zwischen Modell und realem Organismus zu gewährleisten, wird in dieser Arbeit auf die Modifizierung der Zellen verzichtet und lediglich bereits bekannte Regulationsmechanismen der Integrin-Signalkaskade durch die Zugabe von extrazellulären Signalmolekülen bzw. Endotoxinen induziert.

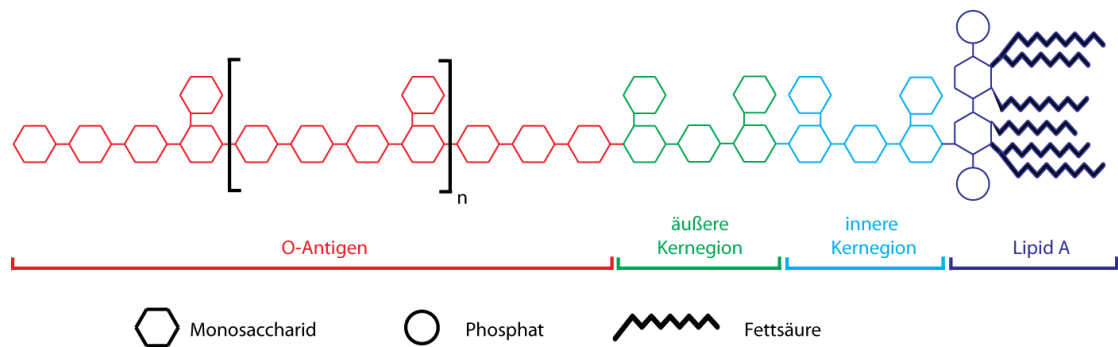


Abbildung 2.6: Struktur von Lipopolysaccharid. Das Molekül setzt sich aus der O-Antigen- und den äußeren und inneren Kernregion-Untereinheiten zusammen, welche aus Monosacchariden aufgebaut sind. Zusätzlich zu Monosacchariden beinhaltet die Lipid-A-Gruppe Phosphat- und Fettsäurereste. (Abbildung basiert auf Ref.⁶²)

So ist es möglich, durch die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) Einfluss auf die Integrinaktivität zu nehmen. Lipopolysaccharide sind die Hauptbestandteile gram-negativer Bakterien und wirken als starke Stimulatoren für Entzündungen⁶³(Abb. 2.6). Als Reaktion auf dieses bakterielle Endotoxin kommt es in der Zelle durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) zu einer LPS-vermittelten intrazellulären Produktion von Stickstoffmonoxid (NO)⁶⁴. Für die Regulation der NO-Synthese dient NO selbst als Inhibitor und führt sowohl zu einer erhöhten Promoteraktivität als auch zu einer vermehrten Transkription des Proteins Osteopontin (OPN)^{65,66}. Osteopontin ist ein sezerniertes, nicht kollagenes Phosphoglykoprotein der ‚SIBLINGs‘-Familie (small integrin binding ligand N-linked glycoprotein‘). Die durch LPS-induzierte und hochregulierte OPN-Expression ist vergleichbar mit dem entzündlichen oder kanzerogenen Zustand einer Zelle bzw. verschiedener Organe wie Lunge, Leber und Darm.^{54,63,67-69} In mehreren Untersuchungen konnte die regulatorische Auswirkung von OPN im Zusammenspiel mit diversen Proteinen auf die Integrinaktivität in menschlichen Zellen nachgewiesen werden.

Mögliche OPN-Bindungsstellen können hierbei sowohl Integrine als auch das zur Superfamilie der Immunglobuline gehörende Transmembranprotein CD44 sein^{66,70}.

Molekularbiologische Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktionen an menschlichen Darmkrebszellen (Zelllinie HT29) konnten die Auswirkungen von OPN auf die Integrinaktivität im Detail darstellen. Hierbei wurde festgestellt, dass OPN durch die Bindung an CD44 ein ‚inside-out‘-Signal über die Aktivierung einer cytosolischen Tyrosinkinase (Src) induziert wird, welches zu einer robusten Integrinaktivierung führt⁶⁹ (Abb. 2.7).

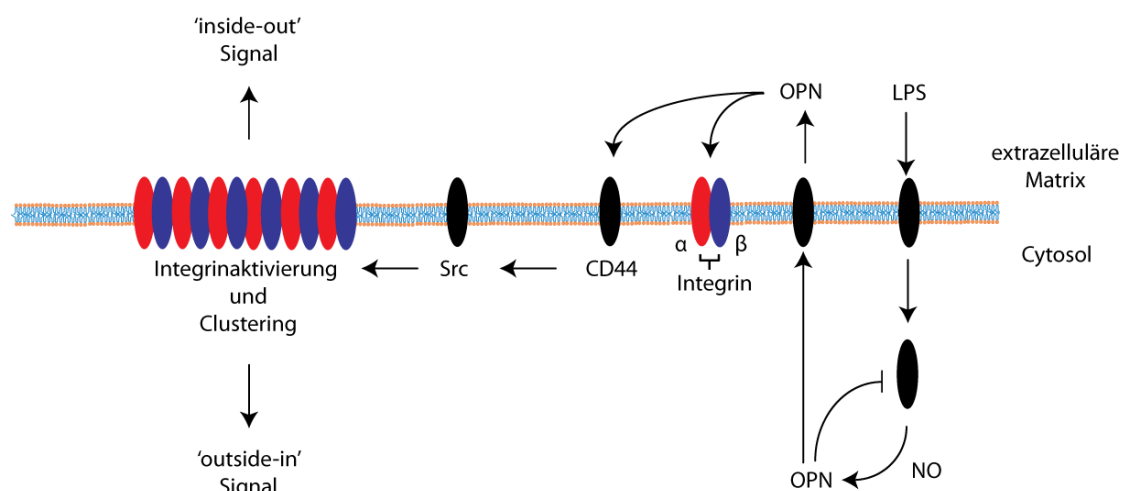


Abbildung 2.7: Die Lipopolysaccharid-(LPS)-induzierte Osteopontin-(OPN)-Überexpression in den HT29-Zellen hat unter der Einbeziehung spezifischer Signalmoleküle (CD44 und Src) die Aktivierung und das Clustering der $\alpha_v\beta_3$ Integrine in Lipid Rafts zur Folge.

Neben dieser Aktivierung verursacht die Bindung des CD44 eine Reorganisation von Lipid Rafts, wobei es zur Einlagerung von CD44, Src und anderen Membranproteinen wie den Integrinen kommt. Innerhalb der Lipid Rafts befindet sich daraufhin der CD44-Src-Komplex in unmittelbarer Nähe zu den eingelagerten Integrinen und leitet deren Aktivierung ein⁷¹.

Hierbei ist weithin bekannt, dass die Aktivierung von Integrinen und deren Anordnung mit einer Cluster- und Aggregations-Bildung einhergeht (Clustering)^{72,73}. Diese Integrin-Cluster sind definiert als Heterooligomere, welche durch ‚inside-out‘ induzierte Interaktionen von Heterodimeren geformt werden⁷⁴. Darüber hinaus ist bekannt, dass dieses Clustering ein wichtiger Bestandteil des Regulationsmechanismus für die Integrinfunktion darstellt und in den Lipid Rafts vorkommt⁷⁵.

Folglich lassen sich für den in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismus, bestehend aus LPS-aktivierten HT29-Zellen mehrere Vorhersagen bezüglich der $\alpha_v\beta_3$ Integrinaktivität treffen: einerseits wird durch die LPS-Aktivierung ein erhöhter Anteil an aktivierten Integrindimeren erreicht und zum anderen erfolgt ein erhöhtes Clustering der Integrine innerhalb der Lipid Rafts.

2.2. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Durch die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in die Systembiologie vor mehr als 25 Jahren wurden große Bereiche der Genom- und der Proteomikforschung revolutioniert. So war es fortan möglich, Einblicke in die Funktionalität und Entwicklung biologischer Organismen zu erhalten. Mittlerweile hat sich die PCR zu einer der wichtigsten Techniken in der modernen Molekularbiologie weiterentwickelt. Sie dient unter anderem zur Erkennung von Erbkrankheiten, Bestimmung der Viruslast nach einer viralen Infektion, Analyse der Genexpression sowie der Erstellung und Überprüfung

genetischer Fingerabdrücke. Die PCR wurde von Kary Mullis erstmals 1985 publiziert⁷⁶ und ermöglicht die Vervielfältigung der Erbsubstanz DNA *in vitro*. Das natürliche Prinzip der DNA-Replikation nachahmend, basiert die PCR auf der zyklisch wiederholten Verdopplung von DNA mit Hilfe von thermostabiler DNA-Polymerase und Nukleotiden. Ein Zyklus beinhaltet drei Schritte: 1. die Denaturierung, 2. die Primeranlagerung (Annealing) und 3. die Verlängerung (Elongation)(Abb. 2.8). Durch das Erhitzen auf 96°C wird zu Beginn eines jeden Zyklusses der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge getrennt. Im 2. Schritt lagern sich bei etwa 55-60°C zwei synthetische, gegenläufig orientierte Oligonukleotide (Primer) spezifisch an die komplementäre DNA-Sequenz an. Bei der darauffolgenden Elongation (Schritt 3) dienen die Primer der verwendeten DNA-Polymerase als Startmolekül für das Auffüllen der Zielsequenz mit freien Nukleotiden. Die gewählte Temperatur hängt hierbei vom Arbeitsoptimum der verwendeten rekombinanten, hitzestabilen Polymerase ab. Da die am häufigsten verwendete DNA-Polymerase aus dem wärmeliebenden Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) stammt, findet die Verlängerung der Zielsequenz bei 72°C statt. Nach jedem Zyklus wird somit theoretisch die DNA-Zielsequenz verdoppelt und bei mehrfacher Wiederholung kommt es zu einer exponentiellen Replikation (Amplifikation) der Zielsequenz. Durch die Verwendung von Thermocyclern können die benötigten Temperaturprofile zyklisch, individuell programmierbar und automatisch eingestellt werden. Die am Anfang noch geringe Menge der DNA-Zielsequenz steigt zum Ende der PCR so stark an, dass es immer häufiger zu Hybridisierung von Fragmenten der PCR-Produkte kommt, welche die PCR hemmen (Plateauphase)(Abb. 2.8).

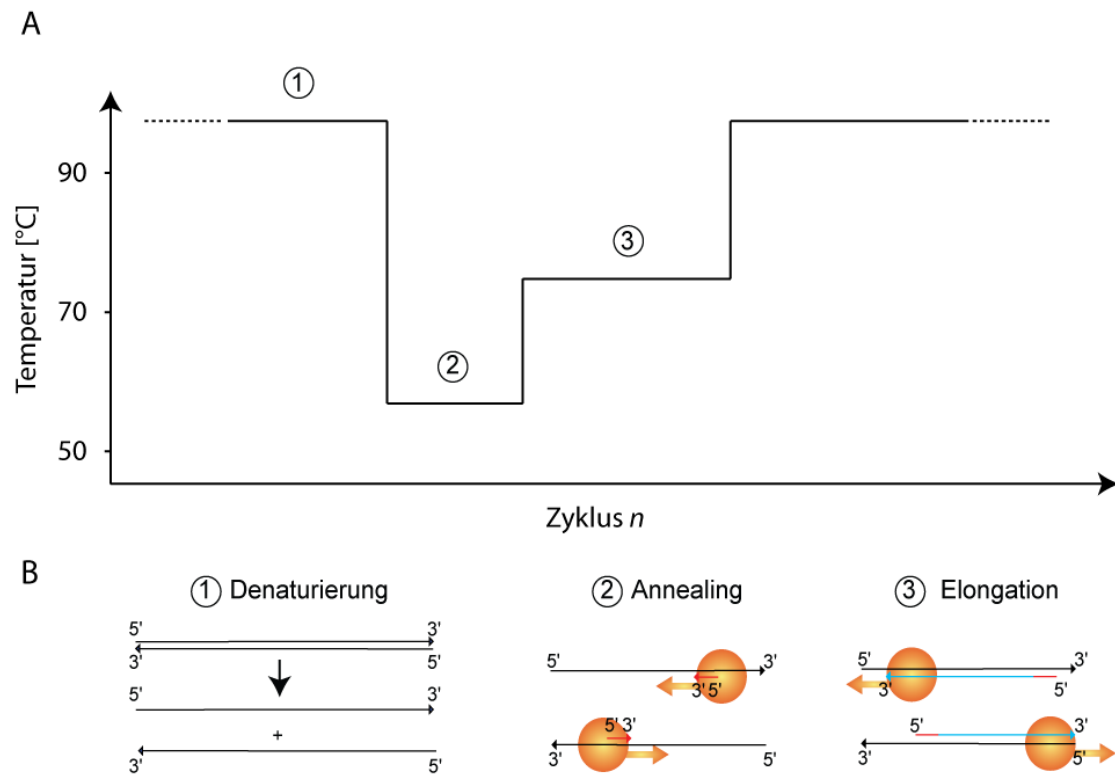


Abbildung 2.8: A) Schematische Darstellung eines Temperaturprofils eines PCR-Zyklus (n) mit den Schritten 1) Denaturierung, 2) Annealing und 3) Elongation. B) Während der Denaturierung kommt es temperaturbedingt zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs. Das darauf folgende Annealing beinhaltet die Anlagerung der Primer und der Taq-Polymerase, welche in der Elongationsphase die Zielsequenz verlängert.

Für die Analyse der Transkription einzelner Gene ist es notwendig, ein weiteres Enzym einzubinden, da die PCR DNA-abhängig ist und nicht die bei der Transkription entstandene RNA amplifizieren kann. Hierfür wird die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eingesetzt, um aus der RNA die komplementäre DNA (cDNA) zu erzeugen. Die cDNA wird anschließend in der PCR-Analyse als Zielsequenz amplifiziert.

Aufgrund der hohen Anzahl an schwer zu kontrollierenden Parametern, wie zum Beispiel die Menge des Startmaterials, die Anwesenheit etwaiger Inhibitoren und das Vorhandensein von Produkten resultierend aus unspezifischen Bindungen, ist die konventionelle PCR kaum für quantitative Analysen geeignet. Unter den

Oberbegriffen der quantitativen PCR (qPCR) und der quantitativen Echtzeit-PCR (RT-qPCR) wurde dieser Nachteil durch die Implementierung von Fluoreszenzmarkern behoben. Da bei diesen Techniken die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt, ist eine Quantifizierung der PCR-Produkte möglich. Im Gegensatz zur qPCR wird bei RT-qPCR die Zunahme der PCR-Produkte (in diesem Fall anhand der Fluoreszenz) nicht erst am Ende der PCR sondern nach jedem Zyklus ermittelt (daher „real-time“). Im Laufe der letzten Jahre haben sich mehrere Fluoreszenzmarker bzw. Sonden als Standard durchgesetzt. Eine mögliche Form der RT-qPCR verwendet den „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET)⁷⁷ für die Detektion von PCR-Produkten⁷⁸. Die Energie eines angeregten Donors wird hierbei über den Förster-Resonanzenergietransfer abstandsabhängig auf einen Akzeptor übertragen⁷⁹. Bei Hybridisierungs sonden⁸⁰ werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotidmarker verwendet, die nebeneinander an die Zielsequenz binden. Während einer der beiden Marker am 3'-Ende das Donor-Fluorochrom besitzt, ist am 5'-Ende des anderen Markers das Akzeptor-Fluorochrom gebunden. Der geringe Abstand beider Marker zueinander an der Zielsequenz ermöglicht die Energieübertragung und steigt proportional mit der Konzentration komplementärer DNA. Weitere auf FRET basierende Methoden verwenden zum einen Oligonukleotide („molecular beacons“)^{81,82} oder Hydrolisierungs sonden (TaqManTM-Sonden)^{83,84}. In beiden Fällen sind die Sonden sowohl mit einem Fluorophor als auch einem Quencher markiert. Der Nachteil fluoreszenzmarkierter Primer ist deren sehr begrenzte Haltbarkeit.

Eine weitaus einfachere und kostengünstigere Methode für den quantitativen Nachweis von PCR-Produkten ist die Verwendung von interkalierenden Farbstoffen wie zum Beispiel „SYBR green I“.^{85,86} Die Einlagerung dieses Fluoreszenzfarbstoffes in die doppelsträngige DNA resultiert in der Emission eines Fluoreszenzsignals und liefert eine hohe Sensitivität für die Detektion der PCR-Produkte (Abb. 2.9 a). Im Vergleich zu fluoreszenzmarkierten Primern zeichnen sich interkalierende Farbstoffe durch eine geringere Spezifität aus. Die hierdurch verursachte Bindung an eventuell entstandene Primer-Dimere oder PCR-Nebenprodukte kann allerdings sehr einfach durch eine Schmelzkurvenanalyse (Abb. 2.9 b) oder eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte am Ende der PCR überprüft werden.

Hierbei werden durch die schrittweise Erhöhung der Temperatur die Einzelstränge der amplifizierten DNA wieder voneinander getrennt, wobei der im DNA-Doppelstrang eingelagerte Farbstoff wieder freigesetzt wird. Die Fluoreszenzabnahme erreicht ihr Maximum, wenn beide Stränge vollständig getrennt vorliegen. Bei der Schmelzkurvenanalyse visualisiert die Darstellung der ersten Ableitung der Fluoreszenzabnahme ein Maximum für spezifische Primer (Abb. 2.9 b). Dahingegen resultieren unspezifische Bindungen der Primer in Nebenprodukte und werden aufgrund ihrer geringeren Schmelztemperatur als weitere Maxima in der Schmelzkurvenanalyse sichtbar.

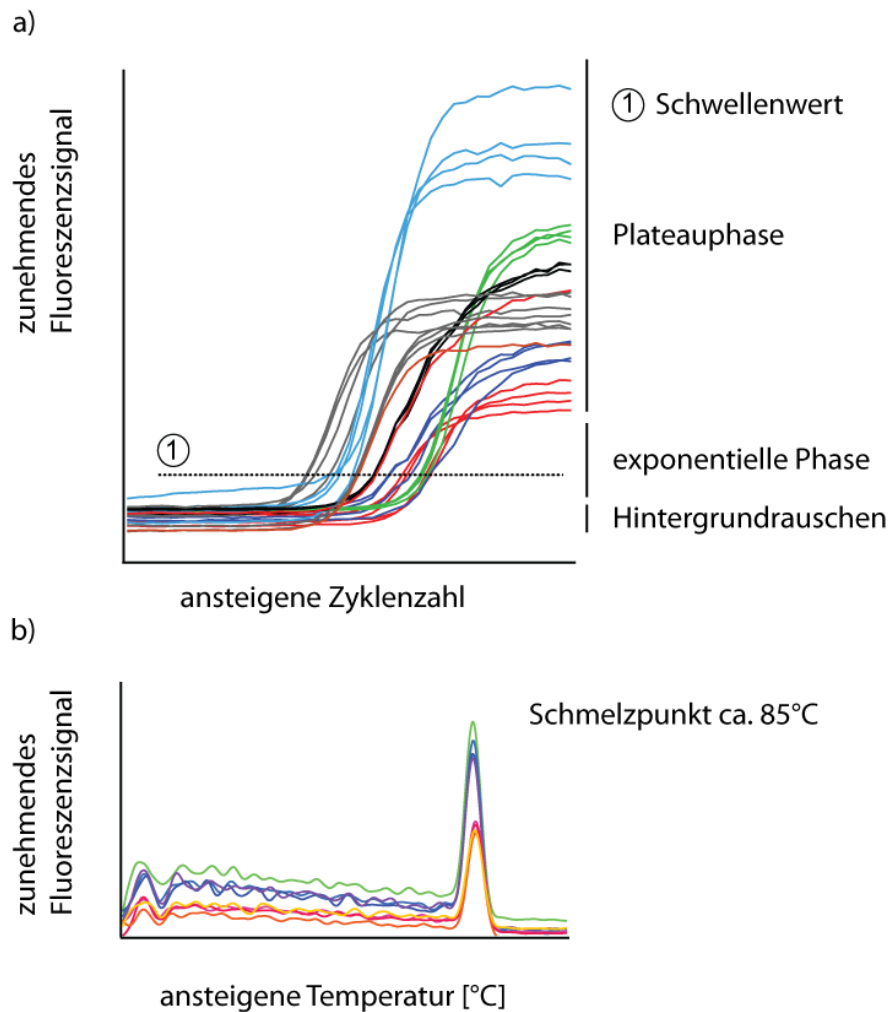


Abbildung 2.9: a) Schematische Darstellung der durch die Amplifizierung der PCR-Produkte hervorgerufenen Zunahme des Fluoreszenzsignals einer SYBR green I RT-qPCR. Deutlich lassen sich die exponentielle und die Plateauphase erkennen. Zusätzlich eingezeichnet ist der Schwellenwert für die Bestimmung der für die relative Quantifizierung benötigten CT-Werte. b) Im Anschluss an die Plateauphase durchgeführte Schmelzkurve der PCR-Produkte zwecks Überprüfung der Bindungsspezifität von SYBR green I. Beim Auftragen der ersten Ableitung der Fluoreszenzabnahme würden unspezifische Bindungsereignisse weitere Peaks in der Schmelzkurve mit geringerem Schmelzpunkt (hier <85°C) hervorrufen.

Für die Analyse der mittels RT-qPCR gewonnenen Ergebnisse stehen zwei generelle Quantifizierungsstrategien zur Verfügung. Einen möglichen Analyseansatz liefert die so genannte absolute Quantifizierung. Da diese jedoch nur anhand einer externen Kalibrierkurve durchgeführt werden kann⁸⁷, wird stattdessen meistens die so genannte relative Quantifizierung verwendet.

Hierbei wird eine interne Kontrolle (ein nicht reguliertes Referenzgen, „housekeeping gen“) verwendet, um die Genexpression der Zielgene zu normalisieren⁸⁸. Als Referenzgene eignen sich alle Gene, die sich sowohl durch eine homogene als auch stabile Expression ausweisen und sich somit von experimenteller Behandlung oder Variationen im Zellzyklus nicht beeinflussen lassen. Gängige housekeeping-Gene sind zum Beispiel GAPDH^{87,89,90}, G6PD⁹¹ oder ACTB⁸⁵. Sie können entweder einzeln oder zusammen als Referenz dienen⁹².

Für die Analyse von PCR-Daten wird, wie bereits beschrieben, das Fluoreszenzsignal mit der Menge amplifizierter DNA korreliert. Hierfür wird ein sogenannter ct-Wert („cycle threshold“) bestimmt. Dieser Wert beschreibt, ab welchem Zyklus in der PCR das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal der Fluoreszenz signifikant überschreitet. Diese Überschreitung wird durch die Festlegung eines Schwellenwertes definiert und für die gesamte PCR festgelegt. Als eine geeignete Methode, um relative Unterschiede in der Genexpression zwischen einer behandelten und einer Kontroll-Probe zu erhalten, hat sich die als „delta delta ct“-Methode (oder auch $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode)⁹³ bewährt. Zunächst werden die ct-Werte des housekeeping-Gens (Referenzgen) von den ct-Werten der zu untersuchenden Gene (Zielgen) abgezogen (Δct) und anschließend die Differenz zwischen behandelter und unbehandelter Probe (Kontrolle) gebildet ($\Delta\Delta ct$). Die relativen Expressionsunterschiede lassen sich als Verhältnis aus folgender Gleichung bestimmen:

$$\text{Verhältnis} = 2^{-((ct_{\text{Zielgen_behandelt}} - ct_{\text{Referenzgen_behandelt}}) - (ct_{\text{Zielgen_Kontrolle}} - ct_{\text{Referenzgen_Kontrolle}}))} \quad \text{Gl. 1}$$

Diese Berechnungsmethode setzt eine optimale PCR-Effizienz voraus, was einer Verdopplung der DNA-Menge nach jedem Zyklus entspricht.

2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Detaillierte Kenntnisse über die Interaktionen und Modifikationen zellulärer Bestandteile, wie den Proteinen und Lipiden, sind Grundvoraussetzung für das Verstehen zellulärer Vorgänge und Zellentwicklung. Zudem ist es notwendig, Informationen über die Verteilung dieser Bausteine und deren Dynamik zu erhalten. Seit der Entwicklung des Mikroskops vor rund 400 Jahren spielt es eine grundlegende Rolle in der Zellbiologie. Einfache Mikroskope wurden anfangs genutzt, um die ersten vergrößerten Abbildungen von Insekten, Pilzsporen oder Zellen zu erzeugen. Durch die technische Weiterentwicklung und Verbesserung der optischen Elemente, sowie der verwendeten Feinmechanik, konnte mit der Zeit diese Methode immer kleinere Objekte und Strukturen bis hin zur optischen Auflösungsgrenze abbilden. Die Auflösung wird rein physikalisch durch Beugung begrenzt und beträgt für sichtbares Licht in etwa 300 nm. Bereits im späten 19. Jahrhundert wurde der physikalische Hintergrund der Auflösungsgrenze von Ernst Abbe sowie durch Lord Rayleigh postuliert^{94,95}. Dieses auch als Rayleigh-Kriterium bezeichnete Postulat (Gl. 2) zeigt, wie die kleinste auflösbare Distanz zwischen zwei Objekten d mit der Wellenlänge des einstrahlenden Lichtes λ und der numerischen Apertur NA (Gl. 3) der Linse zusammenhängt.

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad \text{Gl. 2}$$

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad \text{Gl. 3}$$

2.3.1. Einsatz von Farbstoffen

Schon früh wurden zur Kontrastverstärkung und zur Markierung einzelner Zellbestandteile absorptive Färbemittel eingesetzt. Eine in der Biologie weit verbreitete Methode zur Visualisierung bestimmter Strukturen durch Kontrastverbesserung ist das spezifische Anfärben mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. So existieren für das Anfärben von Zellen verschiedene etablierte Methoden. Die am häufigsten angewandten Methoden sind zum einen das Einbringen von organischen Proteinmarkern (Fluorophore), zum anderen die Verwendung von autofluoreszierenden Proteinen (green fluorescent protein - GFP) und letztendlich die Immunhistologie. Während beim Einbringen von Fluorophoren lediglich das benötigte Zielprotein durch die Zelle exprimiert wird, wird bei der Anwendung von autofluoreszierenden Proteinen ein bestimmtes Protein mit einem fluoreszierenden Marker von der Zelle selbst synthetisiert. Seit der Etablierung von GFP als genspezifischen Marker im Jahr 1994⁹⁶ ist es möglich, die Verteilung spezifischer Proteine innerhalb der Zelle zu beobachten.

Dahingegen kommt der immunologische Ansatz ganz ohne den Eingriff in das Erbgut der Zelle aus. Diese Methode macht sich die spezifische Bindung der Antikörper zunutze. Hierfür werden die Zellen zusammen mit einem passenden Antikörper inkubiert, welcher an das zu untersuchende Protein bindet (Antigen), wobei zwischen direkter und indirekter Proteinmarkierung unterschieden wird (Abb. 2.10).

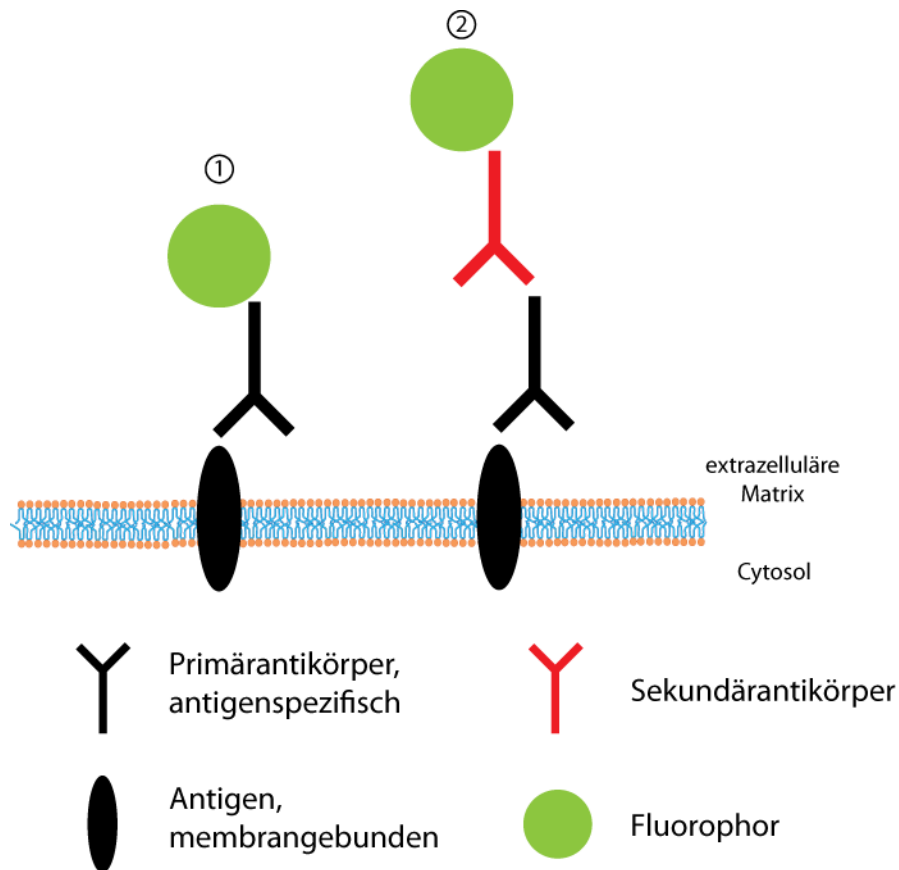


Abbildung 2.10: Darstellung von direkter (1) und indirekter (2) Fluoreszenzmarkierung an einer Zellmembran

Während bei der direkten Markierung der Antikörper unmittelbar mit der fluorophoren Gruppe verbunden ist, wird bei der indirekten Markierung ein zweiter Antikörper zwischengeschaltet (Sekundärantikörper). Dieser ist nicht, wie der erste Antikörper (Primärantikörper), gegen das Zielprotein gerichtet, sondern spezifisch für den Primärantikörper. Auf diese Weise wird das Zielprotein mit einer fluorophoren Gruppe markiert. Für die Visualisierung der angefärbten Strukturen und Proteine wird ein Fluoreszenzmikroskop benötigt (Abb. 2.11).

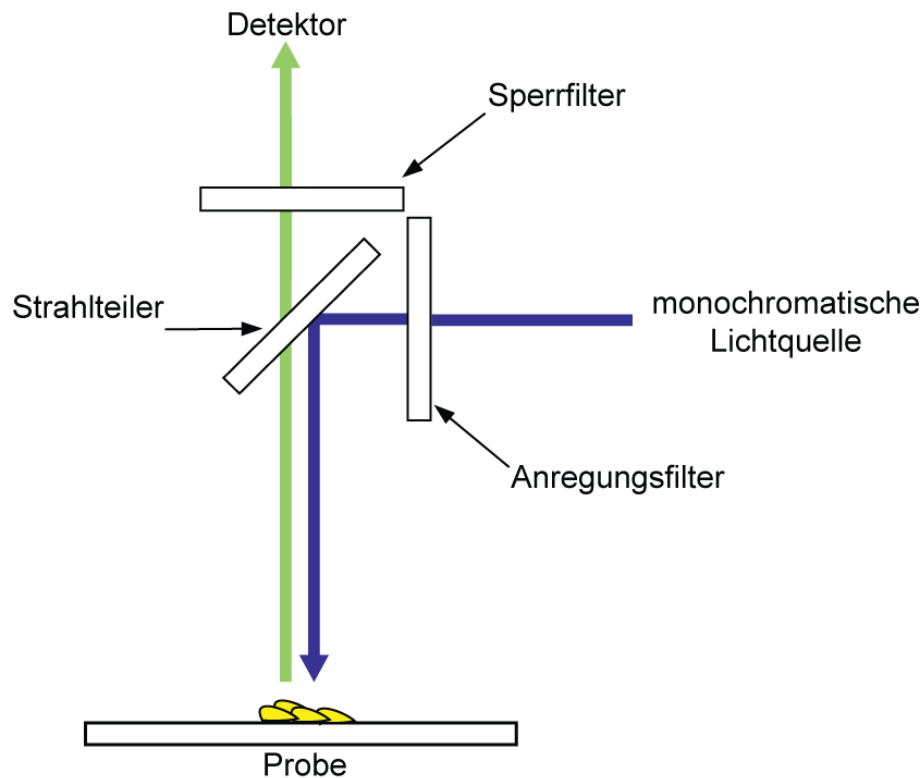


Abbildung 2.11: Vereinfacht dargestellter Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops, bestehend aus Lichtquelle, Detektor und im Mikroskop eingebaute (auf das Fluorophor abgestimmte) Filtersätze.

Dabei wird die Probe von einer Lichtquelle mit geeigneter Wellenlänge angeregt. Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert das eingestrahlte Licht und wird dabei vom elektronischen Grundzustand (S_0) in den elektronisch angeregten Zustand (S_1 oder S_2) angehoben (Abb. 2.12). Zunächst erfolgt ein strahlungsloser Übergang in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 durch Vibration, Relaxation oder interner Konversion. Durch spontane Emission erreicht das Molekül wieder den elektronischen Grundzustand, wobei das emittierte Licht aufgrund der Schwingungsrelaxation energieärmer ist (rotverschoben). Dieser Effekt wird als Stokesverschiebung bezeichnet und ermöglicht durch passende Filtersätze oder dichroitische Strahlteiler die Trennung des emittierten Lichtes vom Anregungslicht (Abb. 2.11).

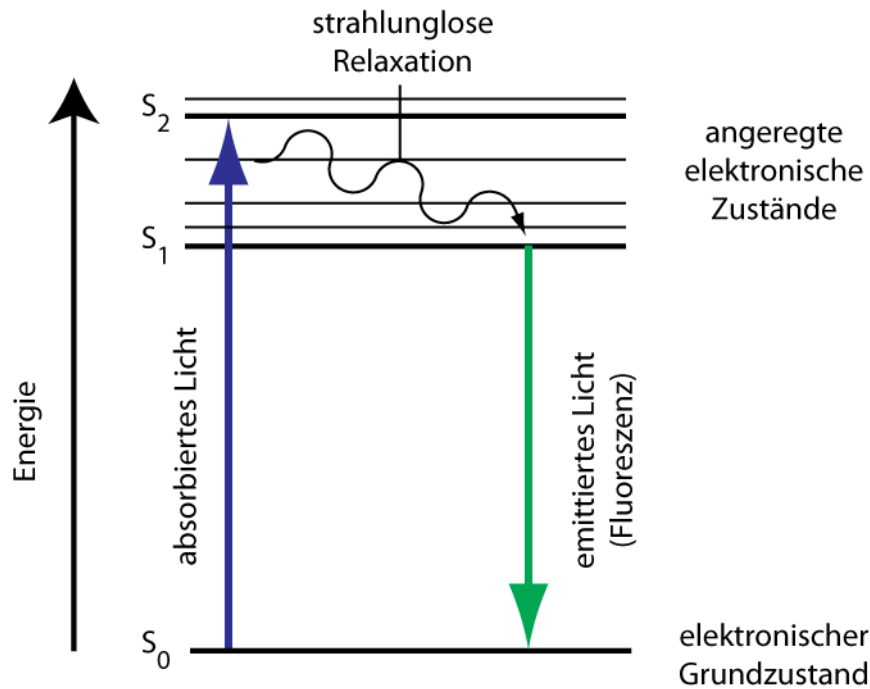


Abbildung 2.12: Termschema eines Fluorophors mit möglichen Übergängen. Die Energie des absorbierten Lichtes (Blau) versetzt das Molekül in den elektronisch angeregten Zustand (S_1 und S_2). Nach Anregung in die schwingungsangeregten Zustände S_1 bzw. S_2 erfolgt eine strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand S_1 . Von hier aus wird durch Emission (Grün) wieder in den elektronischen Grundzustand S_0 zurückgekehrt.

Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie eine etablierte und weit verbreitete Methode darstellt, hat sie den Nachteil der verwendeten Fluoreszenzmarker. Ungeachtet deren Einsatzes für *in vivo*-Untersuchungen stellt sich die Frage nach möglichen unerwünschten Interaktionen zwischen Marker und den zu untersuchenden Zellen. Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, reagieren und interagieren Zellen durch von außen kommende Stimuli sehr unterschiedlich. Da ein bindender Antikörper als ein extrazellulärer Stimuli angesehen werden kann, muss dieses bei der Erstellung eines Modellorganismus bedacht werden.

Darüber hinaus benötigt diese Methode für jeden Fluoreszenzmarker eine spezifische Anregungswellenlänge. Bei der simultanen Verwendung von

mehreren Fluoreszenzmarkern werden folglich mehrere Anregungswellenlängen verwendet. Des Weiteren müssen die dazugehörigen Emissionsspektren bezüglich einer eventuellen Überlagerung überprüft werden, um die erhaltene Kontrastinformationen klar auftrennen zu können. Aufgrund der Entwicklung neuer Fluoreszenzmarker ist es heutzutage möglich, bis zu sieben unterschiedliche Marker zeitgleich in einer Probe zu verwenden²¹, jedoch ist dadurch bei weitem noch nicht die Komplexität der Zelle und deren Proteinvielfalt darstellbar.

Auch besitzt diese Methode den Nachteil, dass das zu untersuchende Protein bekannt sein muss, da es sonst nicht angefärbt werden kann. Aus diesem Grund ist eine Untersuchung von Proben mit unbekanntem Proteinvorkommen nicht durchführbar.

2.4. Schwingungsspektroskopische Verfahren

In der Schwingungsspektroskopie wird die Anregung der Eigenschwingung von Molekülen durch deren Wechselwirkung mit elektromagnetischen Feldern (Licht) untersucht. Sowohl bei der hierzu zählenden Infrarot-Spektroskopie als auch bei der Raman-Spektroskopie ist es möglich, auf diese Weise molekulare Eigenschaften zu charakterisieren und dadurch molekulare Bestandteile zu identifizieren.

Für die Anregung einer Schwingung wird das Molekül unter Absorption eines Lichtquants vom Schwingungszustand mit der Quantenzahl n in einen höheren Zustand übergehen, zum Beispiel mit der Quantenzahl $n + 1$. Dabei lässt sich für

ein mehratomiges Molekül (N Atome) ableiten, dass aufgrund der drei unabhängigen Raumkoordinaten jedes Atoms das Molekül $3N$ Bewegungsfreiheitsgrade besitzt. Wobei jedoch die Zahl der eigentlichen Schwingungsfreiheitsgrade (Z)

$$Z = 3N - 6 \qquad \text{Gl. 4}$$

beträgt, da durch die drei Translationsbewegungen des Moleküls und durch die Rotationen um die drei Hauptträgheitsachsen insgesamt 6 der Freiheitsgrade bereits benutzt sind.

Lineare Moleküle dahingegen besitzen nur zwei Rotationsfreiheitsgrade, wodurch lineare Moleküle einen Schwingungsfreiheitsgrad mehr besitzen:

$$Z = 3N - 5 \qquad \text{Gl. 5}$$

Mit den Gleichungen 4 und 5 lässt sich die Gesamtheit aller Schwingungen eines Moleküls berechnen. Diese wird als Normalschwingung bezeichnet und besteht aus verschiedenen Schwingungsformen (Abb. 2.13) wie der Valenzschwingung (Veränderung der Bindungslänge) und der Deformationsschwingung (Veränderung der Bindungswinkel bei konstanter Bindungslänge). Eine weitere Unterteilung liefert das Symmetrieverhalten der jeweiligen Schwingungen. Folglich lässt sich zwischen symmetrischer (unveränderte Molekülsymmetrie) und asymmetrischer (Verlust einer oder mehrerer Symmetrieeigenschaften) Schwingung unterscheiden.

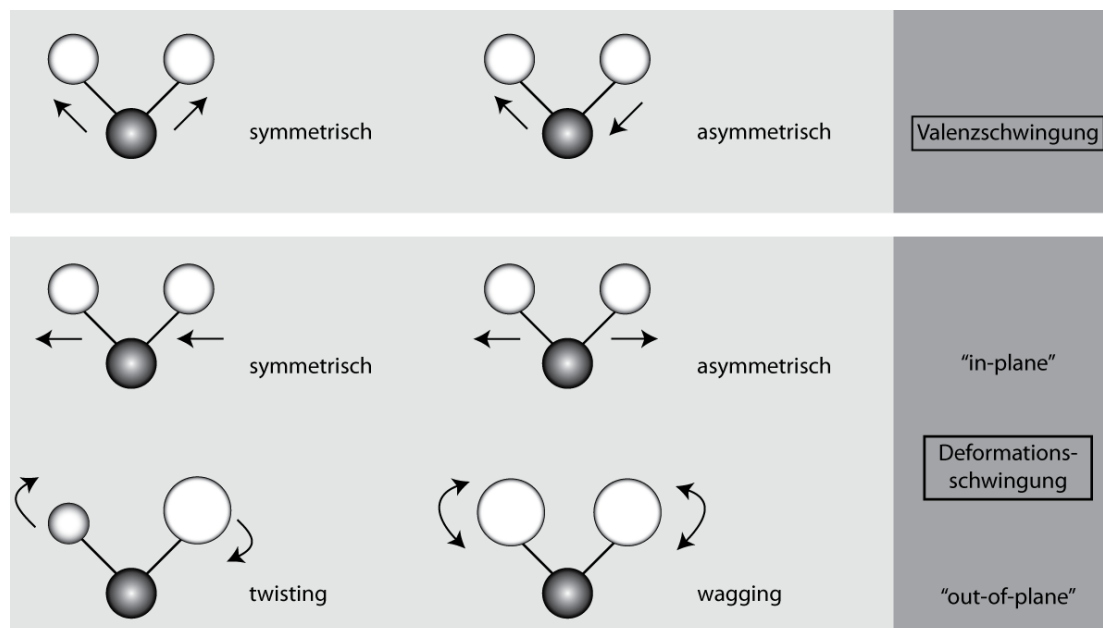


Abbildung 2.13: An einer CH₂-Gruppe lassen sich die unterschiedlichen Arten der Schwingung verdeutlichen. Möglich sind unter anderem symmetrische und asymmetrische Schwingungen, Schwingungen, welche mit Veränderung der Bindungslänge (Valenzschwingung) bzw. der Bindungswinkel (Deformationsschwingung) einhergehen und Schwingungen aus der Molekülebene heraus („out-of-plane“).

2.4.1. Infrarot-Spektroskopie

Die IR-Spektroskopie ist eine seit langem etablierte Methode in der chemischen Analytik. So wird diese spektroskopische Methode in der Biologie zum Beispiel für die Identifizierung von Substanzklassen angewandt. Die Infrarot-Region des elektromagnetischen Spektrums setzt sich zusammen aus dem nah (12500 – 4000 cm⁻¹), dem mittel (4000-400 cm⁻¹) und dem fern Infrarot (400 – 10 cm⁻¹). Bei der herkömmlichen IR-Spektroskopie wird der mittlere Infrarot-Bereich verwendet. Aus historischen Gründen wird in der IR-Spektroskopie die Einheit Wellenzahlen (Reziproke der Wellenlänge, [cm⁻¹]) verwendet, welche zur Frequenz und damit zur Energie proportional ist. Hierbei ist eine höhere Wellenzahl gleichbedeutend mit einem höheren Energieniveau. Das

physikalische Prinzip der IR-Spektroskopie beruht auf der diskreten Absorption einer eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung durch verschiedene Moleküle, welche dadurch in definierte, angeregte Schwingungs- und Rotationszustände versetzt werden. Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und dem Molekül können jedoch nur auftreten, wenn das Molekül entweder ein veränderbares oder ein induzierbares Dipolmoment aufweist, d.h. IR-aktiv ist.

Das IR-Spektrum einer Probe erhält man, indem die Intensität der IR-Strahlung vor (I_0) und nach Durchtritt durch die Probe aufgenommen wird (I). Dabei stellt das erhaltene IR-Spektrum die Transmission bzw. die Absorption als Funktion der Wellenzahl dar. Meist wird die Absorption als Synonym der Extinktion E bevorzugt. Diese ist proportional zur Probenkonzentration c , der Schichtdicke d , dem molaren wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ε und wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben (Gl. 6). Es gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Gl. 6}$$

2.4.1.1. Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

Bei der konventionellen IR-Spektroskopie wird das IR-Licht einer polychromatischen IR-Quelle mit Hilfe von Gittern oder Prismen in die einzelnen spektralen Bestandteile aufgespalten. Im Gegensatz dazu wird bei der FTIR-Spektroskopie mittels eines Interferometers das Spektrum durch die Fourier-Transformation eines gemessenen Interferogramms berechnet. Der grundlegende Aufbau eines Interferometers wird in Abbildung 2.14 anhand

eines nach seinem Entwickler benannten Michelson-Interferometers dargestellt. Das physikalische Prinzip beruht auf der Aufspaltung des Gesamt-IR-Strahls mittels eines Strahlteilers. Die hierbei entstehende optische Weglängendifferenz beider interferierender Teilstrahlen kann durch den beweglichen Spiegel moduliert werden. Am Detektor wird die Intensität des IR-Lichtes als Funktion der optischen Weglängendifferenz der Teilstrahlen aufgezeichnet, wodurch das Interferogramm folglich die Strahlungsintensität in Abhängigkeit der Position des beweglichen Spiegels darstellt. Durch die anschließende Fourier-Transformation kann die gewünschte Intensitäts-Frequenz-Verteilung des IR-Signals berechnet werden.

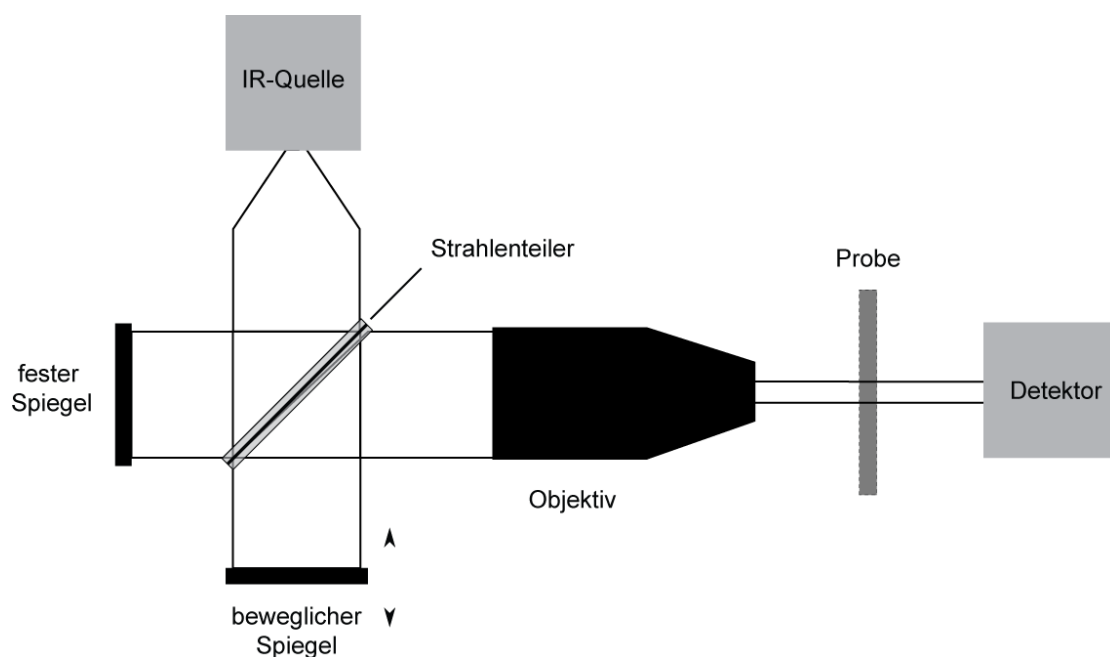


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers und dessen Implementierung in einen FTIR-Aufbau.

Die überwiegenden Vorteile von FTIR liegen zum einen in dessen guter Signalqualität und zum anderen in der quantitativen Einsatzmöglichkeit von FTIR. Durch den Verzicht auf den bei dispersiven Spektrometern notwendige Eintrittsspalt wird eine Optimierung der Strahlungsintensität gewährleistet (Jaquinot-Vorteil).

2.5. Raman-Spektroskopie

2.5.1. Lineare Raman-Spektroskopie

Im Jahre 1928 beobachtete der Inder Chandraskhara Venkata Raman die inelastische Streuung von Licht, den nach ihm benannten Raman-Effekt.⁹⁷ Er entdeckte, dass, wenn fokussiertes Licht auf eine Probe fällt, sich das gestreute Licht aus zwei wesentlichen Bestandteilen zusammensetzt: der elastischen Streuung (Rayleigh-Streuung) und der allgemein als Raman-Streuung bezeichneten inelastischen Streuung (Stokes- und Anti-Stokes-Streuung). Da der Anteil an inelastisch gestreuten Photonen sehr gering ist (lediglich ein Photon von 10^8 Photonen), verwendete Raman als Anregungsquelle die damals intensivste Lichtquelle: das Sonnenlicht. Die Erfindung des Lasers 1960 (LASER: „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“, dt. „Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung“)⁹⁸ vereinfachte weitere Untersuchungen des Raman-Effekts erheblich.

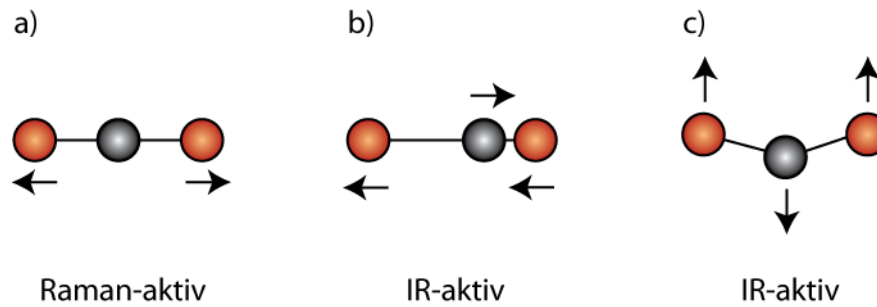


Abbildung 2.15: Die symmetrische Valenzschwingung von CO₂ ist Raman-aktiv (a), wohingegen die asymmetrische Valenzschwingung (b) und die Deformationsschwingung IR-aktiv sind (c).

Bei der Raman-Spektroskopie wird durch die Interaktion von Licht mit der Elektronenwolke des Moleküls die Polarisierbarkeit α des Moleküls verändert. Anders ist es bei der IR-Spektroskopie, in der eine Veränderung des Dipolmomentes des Moleküls induziert wird. In Abbildung 2.15 wird der Unterschied zwischen einer Raman-aktiven und einer IR-aktiven Schwingung am Beispiel eines CO₂-Moleküls verdeutlicht.

Bei der Raman-Streuung muss zwischen der linearen und der nicht-linearen Streuung unterschieden werden, da nur bei der linearen Streuung die Intensität des Raman-Signals linear von der Intensität des Anregungslichtes abhängt. Es handelt sich hierbei um die Modulation des Lichtes mit der Eigenschwingung des Moleküls (Normalmode). In diesem Zusammenhang lassen sich im Rahmen der klassischen Physik qualitative Aussagen über den linearen Raman-Effekt treffen.

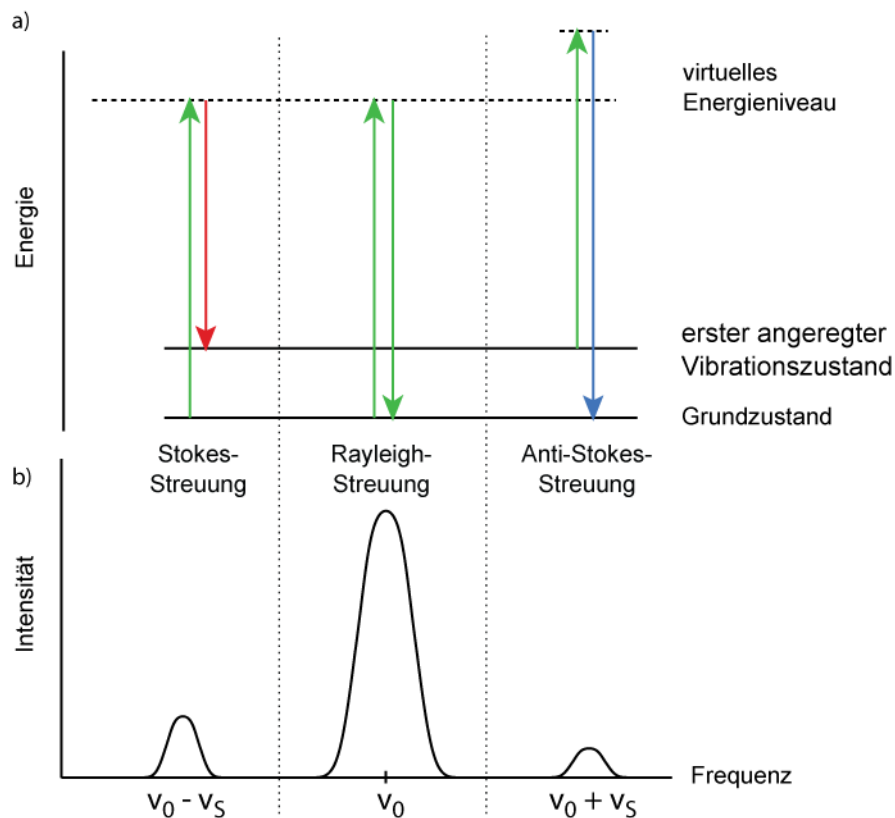


Abbildung 2.16: a) Darstellung des Termschemas für die elastische und inelastische Streuung. b) Durch die unterschiedlichen Vibrationstypen variieren die Intensitäten der Stokes- (rot-verschoben), der Rayleigh- und der Anti-Stokes-Streuung (blau-verschoben).

Wird ein Molekül von monochromatischem Licht (E_0 entspricht der maximalen Amplitude) der Frequenz ν angeregt, so gilt für das elektrische Feld E :

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \quad \text{Gl. 7}$$

Im Molekül werden durch das oszillierende elektrische Feld die Elektronen gegen die Atomkerne verschoben und induziert hierbei ein oszillierendes Dipolmoment μ_{ind} (Gl. 8):

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha E \quad \text{Gl. 8}$$

Die Polarisierbarkeit des Moleküls α ist ein Tensor und stellt in der klassischen Polarisierbarkeitstheorie eine phänomelogische Größe dar. Bei Anregungsfrequenzen entfernt von Vibrations-Resonanzen im Molekül, lässt sich die Polarisierbarkeit als Funktion der Normalkoordinate q mit Hilfe einer Taylor-Reihe darstellen.

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q + \dots \quad \text{Gl. 9}$$

In diesem Zusammenhang besitzt das Molekül eine Anfangspolarisierbarkeit α_0 in der Gleichgewichtslage ($q = 0$). Für kleine Vibrationsamplituden, kann das Molekül als harmonischer Oszillator betrachtet werden:

$$q = q_0 \cos 2\pi \nu_s t \quad \text{Gl. 10}$$

mit q_0 und ν_s für die Amplitude bzw. Frequenz einer Normalschwingung des Moleküls. Die Gleichungen 10, 9 und 8 lassen sich zusammenfassen und umformen zu:

$$\mu_{ind} = \underbrace{\alpha_0 \cdot E \cdot \cos 2\pi \nu_0 t}_{\text{Rayleigh}} - \frac{1}{2} \alpha_s E_0 t \cdot \left[\underbrace{\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_s)}_{\text{Anti-Stokes}} - \underbrace{\cos 2\pi(\nu_0 - \nu_s)}_{\text{Stokes}} \right] \quad \text{Gl. 11}$$

Aus der Gleichung 11 lassen sich drei Terme ablesen, welche die Möglichkeiten des induzierten Dipols darstellen, Photonen mit unterschiedlichen, aber charakteristischen Frequenzen zu emittieren (Abb. 2.16). Der erste Term beschreibt die Rayleigh-Streuung, welche die gleiche Frequenz wie das Anregungslicht besitzt (ν_0) und keine spektroskopische Information beinhaltet. Der zweite Term kennzeichnet die Anti-Stokes-Streuung, welche eine höhere Frequenz besitzt ($\nu_0 + \nu_s$), da sich das Molekül vor der Streuung bereits im

angeregten Schwingungszustand befindet. Existiert dahingegen das Molekül vor der Streuung in seinem elektronischen Grundzustand, wird so genannte Stokes-Streuung mit niedriger Frequenz emittiert ($\nu_0 - \nu_s$), welche in Gleichung 11 durch den dritten Term charakterisiert wird. Die unterschiedlichen Energien dieser drei Streuungsarten werden in Abbildung 2.16 verdeutlicht. Des Weiteren ergibt sich aus der Gleichung 11 eine wesentliche Bedingung für das Erscheinen von Ramanstreuung: sie tritt nur auf, wenn die molekulare Schwingung eine Veränderung in der Polarisierbarkeit des Moleküls bewirkt, folglich wenn α_s ungleich null ist.

Die klassische Raman-Theorie erklärt den linearen Raman-Effekt recht anschaulich und liefert auch die Möglichkeit, die Frequenzen der entstehenden Strahlung zu berechnen. Die Intensitäten der emittierten Strahlung lassen sich ähnlich beschreiben. Für die Intensität I der Raman-Streuung eines induzierten Dipols lässt sich folgende Abhängigkeit darstellen:

$$I = \frac{\nu^4}{32\pi^2 \epsilon_0 c^3} \cdot \mu_{ind}^2 \quad \text{Gl. 12}$$

Da der induzierte Dipol auch durch Gl. 8 definiert ist, ergibt sich für den oszillierenden Dipol folgende Streuintensität:

$$I = \frac{\nu^4}{32\pi^2 \epsilon_0 c^3} \cdot \alpha^2 \cdot E^2 \quad \text{Gl. 13}$$

Es gilt für die Frequenz des Stokes-Anteils: $\nu = \nu_0 - \nu_s$ und somit lässt sich die Streuintensität für den Stokes-Anteil durch das Einbringen des Polarisierbarkeitstensors $|\alpha|^2$ ausdrücken:

$$I_{Stokes} = const \cdot I_0 \cdot (\nu_0 - \nu_s)^4 \cdot |\alpha|^2 \quad \text{Gl. 14}$$

Wobei die Intensität I_0 und die Frequenz ν_0 durch das Anregungslicht gegeben sind.

Aus Gleichung 14 lässt sich erkennen, wie sich mehrere Möglichkeiten ergeben, die vorliegende geringe Stokes-Intensität in linearen Raman-Prozessen zu verstärken. So lässt sich zum Beispiel durch die Verwendung höherer Anregungsfrequenzen (kleinerer Wellenlängen) die Intensität erhöhen. Wenn die Anregungsfrequenz in Resonanz mit einem der elektrischen Übergänge im Molekül ist, kommt es zu einer Veränderung der Polarisierbarkeit im Molekül, wodurch sich die Streueffizienz um mehrere Größenordnungen erhöhen kann (Resonanz-Raman-Effekt).

Der allgemeine Aufbau eines Raman-Systems, basierend auf den notwendigen 4 Hauptkomponenten, wird in Abbildung 2.17 dargestellt. Dieser besteht aus einer Anregungsquelle (a; Laser), einem Mikroskop (b) für die Probenbeleuchtung und die Sammlung des gestreuten Lichtes (Ramansignal), einem Spektrometer (c) und einer CCD-Kamera als Detektor (d).

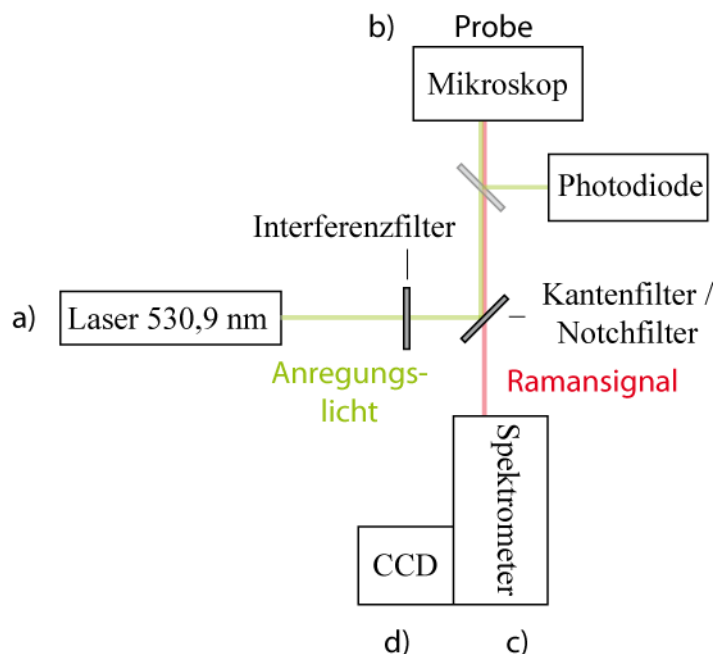


Abbildung 2.17: Schematische Darstellung eines Raman-Systems bestehend aus: a) Anregungslichtquelle, b) Optik für Probenbeleuchtung und Sammlung des gestreuten Lichtes, c) Spektrometer und d) CCD-Kamera. Des Weiteren eingezeichnet sind: die Position der Photodiode und die Position sowohl des Interferenz- als auch des Kantenfilters/Notchfilters.

2.5.2. Nicht-lineare Ramanmikroskopie

Eine Verstärkung des Raman-Signals lässt sich auch in nicht-linearen Raman-Prozessen beobachten. Zu den nicht-linearen Raman-spektroskopischen Techniken gehört unter anderem die kohärente Anti-Stokes-Raman-Spektroskopie (Coherent anti-Stokes Raman Scattering, CARS). Der CARS-Effekt wurde 1965 von Terhune und Maker⁹⁹ entdeckt und hat sich bis heute zu einer der bedeutendsten nicht-linearen Raman-Technik entwickelt¹⁰⁰⁻¹⁰³. Diese Technik findet mittlerweile Anwendung sowohl im Life Science Sektor¹⁰⁴⁻¹⁰⁸, den Materialwissenschaften^{109,110} als auch in der Analytik^{111,112}. Wegen ihrer hohen Leistungsdichte werden bei dieser Technik zwei gepulste Laser verwendet (Zwei-Farben-CARS).

Während der Pump-Laser die Frequenz ω_1 besitzt, gilt für den zweiten Laser (Stokes-Laser ω_{Stokes}) $\omega_{\text{Stokes}} < \omega_1$. Durch die Modulation der beiden Frequenzen lässt sich die Differenz $\omega_1 - \omega_{\text{Stokes}}$ beeinflussen bzw. so wählen, dass die Raman-aktive Schwingung des Moleküls (ω_{vib}) kohärent angeregt wird. Das dabei entstehende CARS-Signal ω_{CARS} setzt sich dementsprechend wie folgt zusammen:

$$\omega_{\text{CARS}} = \omega_1 + \omega_{\text{vib}} \quad \text{Gl. 15}$$

Der CARS-Prozess stellt einen so genannten Vier-Photonen-Prozess dar. In Abbildung 2.18 ist ein vereinfachtes Energieniveauschema für den CARS-Prozess dargestellt. Ausgehend vom elektronischen Grundzustand des Moleküls wird dieses durch den Pump-Laser (ω_1) und das Stokes-Signal (ω_{Stokes}) in den ersten schwingungsangeregten Zustand versetzt. Das auf diese Weise angeregte Molekül erfährt eine weitere Anregung (ω_1), woraufhin ein CARS-Photon (ω_{CARS}) erzeugt wird. Durch die Veränderung von ω_{Stokes} lassen sich in biologischen Systemen verschiedenste Molekülarten durch die Anregung charakteristischer Schwingungen sichtbar machen.

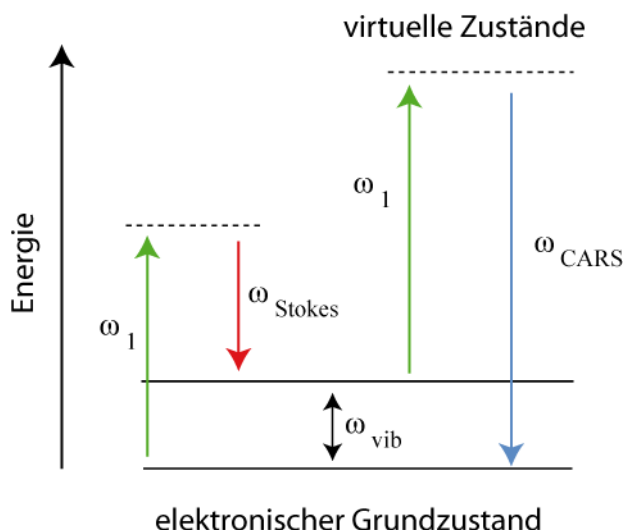


Abbildung 2.18: Termschema für den CARS-Prozess. Ausgehend vom elektronischen Grundzustand erreicht das Molekül durch den Pump-Laser (ω_1) und das Stokes-Signal (ω_{Stokes}) den ersten schwingungsangeregten Zustand (ω_{vib}). Durch eine weitere Anregung (ω_1) wird ein CARS-Photon (ω_{CARS}) erzeugt.

So lassen sich zum Beispiel Lipide durch deren charakteristische CH_2 -Bande im Bereich von $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ gut darstellen¹¹³. Ein Vorteil der CARS-Spektroskopie gegenüber der linearen Raman-Spektroskopie liegt in der höheren Signalintensität (bis zu acht Größenordnungen). Ein weiterer Vorteil ist, dass die bei biologischen Proben häufig auftretende Fluoreszenz nicht das CARS-Signal überlagern kann, da dieses Signal auf der Anti-Stokes Seite, also der Fluoreszenz abgewandten Seite der Anregungswellenlängen, liegt. Trotz dieser Vorteile ist die Anwendung der CARS-Spektroskopie zur Verbesserung der Signalintensität aufgrund des hochkomplexen instrumentellen Aufwandes nicht optimal, da zum einen aufwändige Datenanalysen für eine quantitative Evaluierung von CARS-Daten erforderlich sind¹¹⁴.

2.5.3. Oberflächenverstärkte Raman-Streuung

Eine weit verbreitete Methode, um die Raman-Streuintensität zu erhöhen, ist der Einsatz von rauen Münzmetalloberflächen als Substrat (Ag, Au oder auch Cu). Nach Absorption der Probe erhält man einen Signalverstärkungseffekt, welcher das erste Mal von Fleischmann et al.¹¹⁵ entdeckt und später von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt und detaillierter erläutert wurde^{116,117,118}. Hierbei stellte sich heraus, dass die Verstärkung des Raman-Signals von der rauen Oberfläche des verwendeten Metalls herrührt. Seitdem wird die Methode als oberflächenverstärkte Raman-Streuung („surface-enhanced Raman scattering“, SERS) bezeichnet. Um die benötigte Oberflächenrauigkeit zu erzeugen, lassen sich Metalloberflächen durch Oxidations-Reduktions-Zyklen aufrauen (z.B. Metallelektroden)¹¹⁹ oder spezielle Oberflächen bzw. Substrate wie zum Beispiel Kolloide¹²⁰ oder Nanodrähte¹²¹ herstellen (Abb. 2.19), um nur zwei Partikelspecies zu nennen.

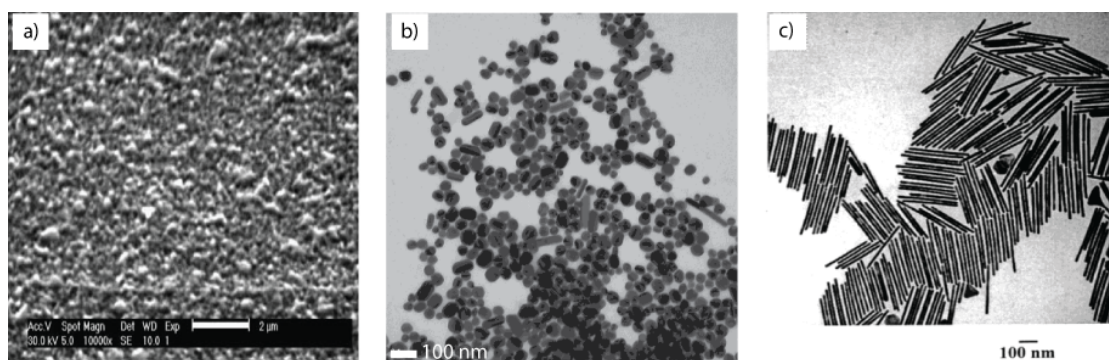


Abbildung 2.19: Elektronenmikroskopieaufnahmen von a) der Oberfläche einer Metallelektrode (Gold)¹²², b) Kolloiden (Silber)¹²⁰ und c) Nanodrähten (Gold)¹²¹.

In Verbindung mit der entsprechenden Anregungswellenlänge sind die größten Verstärkungen bei Silbersubstraten zu beobachten. Durch die Entdeckung des SERS-Effektes wurden einige Nachteile der Raman-Spektroskopie kompensiert.

Neben den Fluoreszenz-quencheden Eigenschaften wird durch SERS die schwache Streuintensität von Raman um Verstärkungsfaktoren zwischen 10^6 und 10^{15} erhöht^{123,124} und ermöglicht somit die Untersuchung von Proben mit sehr geringer Probenkonzentration bis hin zur Einzelmolekülcharakterisierung¹²⁵⁻¹³⁰. Es stellt sich heraus, dass mehrere Faktoren Einfluss auf den Verstärkungsfaktor besitzen: die in direkter Korrelation zum Verstärkungsfaktor stehenden optischen Eigenschaften der SERS-Partikel sind abhängig von dessen Material, Form, Beschaffenheit der Oberflächen und der Distanz zwischen angrenzenden Nanopartikeln. Die Wahl des verstärkenden Materials hängt zudem noch von der gewählten Anregungswellenlänge ab, da die verwendeten Edelmetalle Silber (Ag) und Gold (Au) voneinander abweichende Absorptionscharakteristika aufweisen. Seit der Entdeckung von SERS wurde diese Technik und damit einhergehend die Produktion der SERS-Substrate in den letzten Jahre immer weiter verbessert.

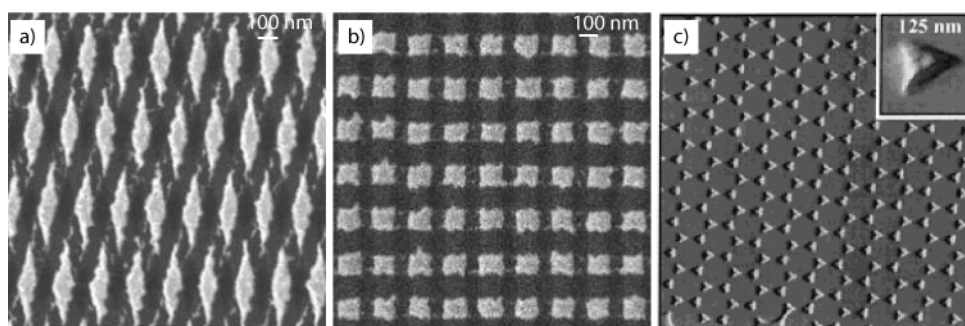


Abbildung 2.20: Lithographisch hergestellte SERS-Substrate in Form von Rhomben (a)¹³¹, Rechtecken (b)¹³¹ und Dreiecken (c)¹³².

Die Mechanismen des SERS-Effektes sind bis heute noch nicht vollständig aufgeschlüsselt. Es gibt lediglich weitestgehend akzeptierte Modelle, welche näherungsweise den SERS-Effekt beschreiben und hierfür zwei Komponenten betiteln: die elektromagnetische und die chemische Verstärkung.

2.5.3.1. Elektromagnetische Verstärkung

Für die Beschreibung dieser Art der Verstärkung wird im einfachsten Fall das SERS-Partikel als isolierte Kugel quasistatisch betrachtet. Durch das elektromagnetische Feld des Anregungslichtes erfahren die im Vergleich zum fixen Kern freien Elektronen an der Oberfläche des SERS-Nanopartikels eine kollektive Oszillation gegen den Hintergrund des kationischen Metallrumpfes (Abb. 2.21). Die dadurch erzeugten lokalisierten Oberflächenplasmonen (‘localized surface plasmons’, LSP) stellen demzufolge die Fluktuation der Elektronenwolke an der Metall-Umgebungsgrenze dar, auch bezeichnet als evaneszentes Feld. Dieses erreicht das Maximum, wenn sich die Plasmonen in Resonanz mit der Anregungsfrequenz befinden (Plasmonen-Resonanz-Wellenlänge). Bei den Metallen Silber, Gold und Kupfer wird diese Plasmonen-Resonanz-Bedingung im sichtbaren Bereich des Lichtes erfüllt.

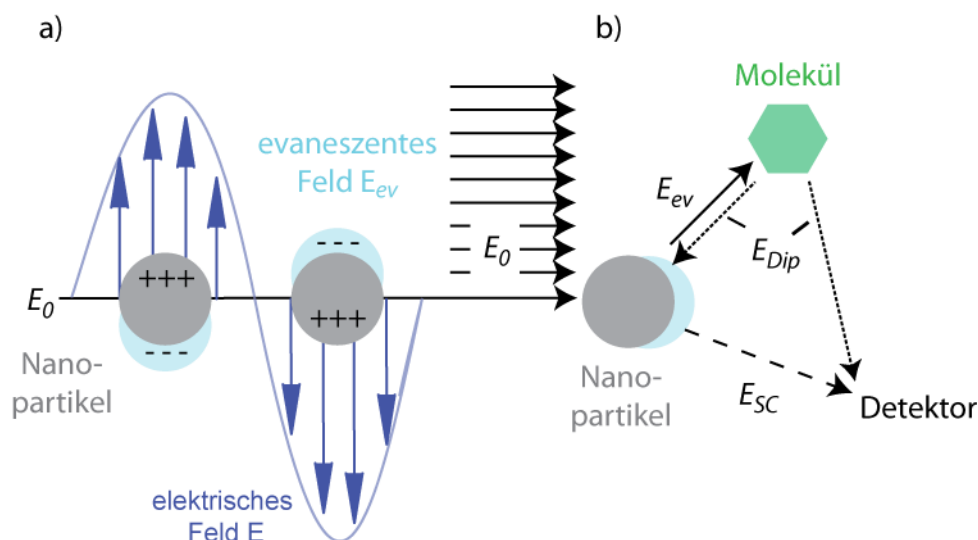


Abbildung 2.21: a) Darstellung induzierter LSP bzw. eines evaneszenten Feldes E_{ev} durch das elektromagnetische Feld des Anregungslichtes E_0 . b) Mechanismus der elektromagnetischen SERS-Verstärkung. Sowohl E_0 als auch E_{ev} wirken auf das Molekül und induzieren die Dipolstrahlung E_{Dip} , welche zum einen direkt detektiert werden und zum anderen eine zweite Verstärkung erfahren kann (E_{sc}). (Abbildung basiert auf Ref.¹³³)

Die elektromagnetische Welle E_0 induziert die Emission eines evaneszenten Feldes E_{ev} (Abb. 2.21), welches an der Oberfläche des Partikels am größten ist und bei der Ausbreitung in den Raum hinein exponentiell abfällt. Diese Distanzabhängigkeit ist dabei proportional zu der Größe des Partikels, wohingegen die Feldverstärkung von der Partikelgröße unabhängig bleibt. Die Stärke des elektromagnetischen Feldes E_{ev} ist hierbei proportional zur Wurzel der detektierbaren Raman-Intensität und wird durch folgende Formel beschrieben:

$$E_{ev}^2 = E_0^2 [1 - |g|^2 + 3 \cos^2 \theta] \quad \text{Gl. 16}$$

mit E_0 als Amplitude des elektromagnetischen Feldes des einfallenden Lichtes, θ als Winkel bezüglich der Einfallsrichtung des Lasers und

$$g = \frac{\varepsilon_i - \varepsilon_0}{\varepsilon_i + 2\varepsilon_0} \quad \text{Gl. 17}$$

wobei ε_i und ε_0 die Dielektrizitätskonstanten des Partikels bzw. des umgebenden Mediums darstellen. Folglich lässt sich eine maximale Feldintensität für E_{ev} feststellen, wenn $\theta = 0$ bzw. 180° beträgt und g maximal wird. Dies wird erreicht, wenn $\varepsilon_i \approx -2\varepsilon_0$ entspricht. Für die komplexe Dielektrizitätskonstante, bestehend aus einem Realteil (Re) und einem Imaginärteil (Im), gilt:

$$\varepsilon_i = \text{Re}(\varepsilon(\omega)) - i \cdot \text{Im}(\varepsilon(\omega)) \quad \text{Gl. 18}$$

Gleichung 18 zeigt die Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes (ω) und der Größe und Form des Partikels, was zur Plasmonen-Resonanz-Bedingung führt. Ferner wird auch ersichtlich,

dass die Plasmonen-Resonanz-Wellenlänge nicht nur vom Metall sondern auch von der Dielektrizitätskonstanten des umgebenden Mediums ϵ_0 abhängig ist.

Auf das Molekül wirken sowohl das einfallende Feld E_0 als auch das verstärkte Feld E_{ev} und so besteht die Möglichkeit (Abb. 2.21), dass die emittierte Strahlung direkt detektiert wird (E_{Dip}) oder aufgrund der Nähe zum Partikel noch eine zweite Verstärkung erfährt E_{SC} . Folglich wird das additive Signal, das sich aus E_{Dip} und E_{SC} zusammensetzt, detektiert.

Eine weitere Abhängigkeit besteht zwischen der Oberfläche bzw. der Krümmung eines Partikels und der Gegebenheit, ob eine Anregung von LPS möglich ist. Da die Ausbreitungsrichtung von LSP auf einer glatten Oberfläche parallel zum Metall ist, entsteht in diesem Fall kein evaneszentes Feld. Bei Kolloiden bzw. rauen Oberflächen ist die Ausbreitungsrichtung jedoch nicht mehr vorgegeben und die LSP können sich auch senkrecht zur Oberfläche ausdehnen. Hierbei bewirkt das durch die Form des Kolloides (Vorsprüngen oder Spitzen) hervorgerufene evaneszente Feld die beste Verstärkung („Lightning-rod“-Effekt)¹³⁴.

Daher können, je nach Metall, Beschaffenheit der Oberfläche und Aggregationszustand, Verstärkungsfaktoren im Bereich zwischen 3 und 14 Größenordnungen auftreten (im Vergleich zu konventionellen Raman-Messungen)¹²⁶.

2.5.3.2. Chemische Verstärkung

Die chemische Verstärkung beruht auf der Tatsache, dass sich bei der Interaktion von Probe und Metalloberfläche ein Molekül-Metall-Komplex bildet. Hierdurch kommt es zu so genannten „charge-transfer“-Effekten, wobei neue Energieniveaus gebildet werden bzw. bereits vorhandene verschoben und verbreitert werden können¹³⁵. Als Folge dieser Veränderung in der elektronischen Struktur des Moleküls ist eine resonante Anregung in den elektronisch angeregten Zustand des Moleküls möglich (Resonanz-Raman). Im Gegensatz zur Fluoreszenz handelt es sich hierbei um ein virtuelles Energieniveau und nicht um ein diskretes Niveau. Das Molekül relaxiert anschließend aus dem elektronisch angeregten Zustand in ein schwingungsangeregtes Niveau im elektronischen Grundzustand. Hierbei wird im Vergleich zum Anregungslicht rot verschobenes Licht emittiert (Stokes-Signal) bzw. blau verschoben im Falle des Anti-Stokes-Signals. Durch die Bildung des Molekül-Metall-Komplexes ist diese Art der Verstärkung nur auf die oberste Lage von Molekülen begrenzt, welche mit dem verstärkenden Partikel in Berührung kommen. Die hierbei erreichbare Verstärkung liegt im Bereich von 2 Größenordnungen.

Sowohl die elektromagnetische als auch die chemische Verstärkung sind in der Lage, einzelne Moden unterschiedlich stark zu verstärken. Dadurch können Abweichungen zwischen SERS-Spektrum und Raman-Spektrum auftreten. Dies kann sich sowohl in Form von Bandenverschiebungen einzelner Moden als auch in Form von Veränderung in der Bandenintensität zeigen. Obwohl die Bandenverschiebung bis zu mehreren cm^{-1} betragen kann und eine Zuordnung

dadurch nicht einfach ist, lassen sich mit Hilfe von Standard-Raman-Spektren alle Moden zuordnen. Darüber hinaus können durch die SERS-Verstärkung aber auch Banden beobachtet werden, die kaum Raman-aktiv sind¹³⁶. Diese Veränderungen der relativen Intensitäten im SERS-Spektrum können sowohl auf eine Aufweichung der spektroskopischen Auswahlregeln als auch durch neue Oberflächenauswahlregeln erklärt werden^{136,137,138}. Im Allgemeinen sind die Banden abhängig von der Symmetrie des Raman-Tensors der jeweiligen Mode (siehe Gl. 9, Seite 48), der Orientierung des Moleküls zum SERS-Partikel bzw. Substrat und letztendlich der Orientierung des SERS-Partikels selbst zur Polarisation des einfallenden Lichtes. Bei den Oberflächenauswahlregeln betrachtet man den Polarisierbarkeitstensor eines Moleküls an einer Metalloberfläche, um die Richtungsabhängigkeit der Polarisierbarkeit zu untersuchen. Dabei wird deutlich, dass Schwingungen mit dynamischem Dipol senkrecht zur Oberfläche (z-Richtung) verstärkt werden. Schwingungen, welche lediglich einen geringen Anteil in z-Richtung besitzen, erfahren eine geringere Verstärkung, und Schwingungen parallel zur Metalloberfläche werden nicht verstärkt^{137,138}.

Der eigentliche Nachteil der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie liegt in der Abhängigkeit der Signalverstärkung von der Partikelbeschaffenheit. Nur kleinste Veränderungen der Gestalt und der Oberfläche haben direkte Auswirkungen auf die Feldverstärkung und somit auf das Raman-Signal. Durch die inhomogene Verteilung der Feldverstärkung innerhalb ein und desselben Substrates entsteht eine Durchschnittsverstärkung, wodurch eine quantitative Analyse mit SERS-Filmen nahezu unmöglich gemacht wird.

Ein Ansatz, um dieses zu verbessern, stellt die Herstellung von reproduzierbaren SERS-Substraten mittels lithographischer Methoden dar (siehe Abbildung 2.20)^{131,139}.

2.5.4. Spitzenverstärkte Raman-Streuung (,tip-enhanced Raman scattering' – TERS)

In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit verwendeten Methoden AFM und TERS mit allen wichtigen Einzelkomponenten erläutert.

Bereits 1985 veröffentlichte Wessel¹⁴⁰ eine theoretische Lösung, mit welcher die quantitative Untersuchung von Oberflächen möglich zu sein schien. Grundgedanke dieser Überlegung war eine konstante Feldverstärkung zu erhalten, nicht indem ein homogener Film von SERS-Partikeln gebildet wurde, sondern lediglich ein einziges SERS-Partikel in Form einer Metallspitze für die Untersuchung der Probe verwendet wurde. Abbildung 2.22 zeigt den Entwurf des von Wessels beschriebenen „surface-enhanced optical microscope“. Voraussetzung für diesen Ansatz war, die Metallspitze an die Oberfläche der Probe anzunähern, damit der eintretende SERS-Effekt die gewünschte Signalverstärkung liefert. Diese Anforderung sollte mit Hilfe eines Rastersondenmikroskops (,scanning probe microscope', SPM) realisiert werden. Hierdurch kommt es zusätzlich zu einer verbesserten räumlichen Auflösung im untersten Nanometerbereich, welche durch SERS nicht erreicht werden kann.

Obwohl SPM-Technologien wie zum Beispiel das Rastertunnel-Mikroskop („scanning tunneling microscope“, STM) bereits erfolgreich im Einsatz war, dauerte es 15 Jahre, bis der theoretische Ansatz von Wessel im Experiment realisiert werden konnte.

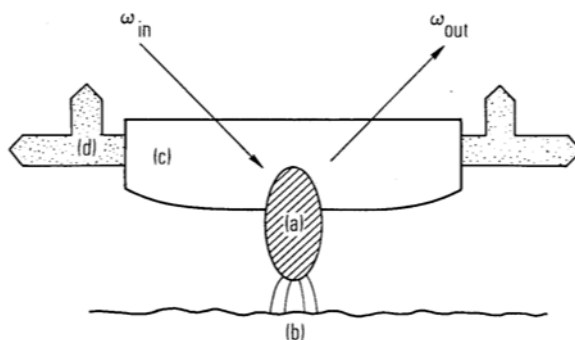


Abbildung 2.22: ‚Surface-enhanced optical microscope‘ als Lösungsansatz nach Wessel (Wessel 1985). Das verwendete SERS-Nanopartikel (a) interagiert mit dem einstrahlenden Laserlicht der Wellenlänge ω_{in} , und das von der Probe (b) stammende Ramansignal ω_{out} wird detektiert. Für das Abrastern der Probenoberfläche wird die optisch transparente Partikelhalterung (c) durch Piezo-Elemente (d) bewegt.

2.5.4.1. Rastersondenmikroskopie

Die Rastersondenmikroskopie (SPM) umfasst zwei grundsätzlich verschiedene Verfahren: die Rastertunnel-Mikroskopie („scanning tunneling microscopy“, STM) und die Rasterkraft-Mikroskopie („atomic force microscopy“, AFM). Die älteste SPM-Methode ist die 1982 von Binnig und Rohrer entwickelte Rastertunnel-Mikroskopie¹⁴¹. Hierbei wird eine leitfähige Spitze bis auf eine Entfernung von wenigen Ångström an die leitfähige Probe herangebracht. Durch die entstehende Potentialdifferenz zwischen der Spitze und der Probe fließt ein Tunnelstrom, dessen Stärke von dem Abstand der Spitze zur Probe abhängt. Hierbei kann die Messung der Topographie entweder bei konstanter Höhe

(Abstand zwischen Spitze und Probe) oder mit konstantem Tunnelstrom durchgeführt werden. Obwohl STM atomare Auflösung erzielt¹⁴², hat diese Methode einen großen Nachteil: sie benötigt leitende oder zumindest halbleitende Proben, um Untersuchungen durchführen zu können. Das 1986 entwickelten AFM¹⁴³ hingegen erreicht die gleiche laterale Auflösung wie ein STM und ermöglicht das Abbilden von Atomen und Molekülen auf elektrisch isolierten Oberflächen. Aus diesem Grund wird hauptsächlich das AFM für die Untersuchung von biologischen, organischen und anorganischen Proben verwendet.

Bei diesem Messprinzip werden die zwischen Spitze und Probe auftretenden Kräfte gemessen, wodurch *in-vivo* Messungen unter kontrollierten Umgebungsbedingungen ermöglicht werden. Das Abrastern der Probe in x- und y-Richtung als auch das Annähern und Nachführen der Spitze in z-Richtung wird durch die Verwendung von Piezoelementen ermöglicht. Über einen Regelkreis (feedback-loop), der meistens über einen Proportional-Integral-Regler betrieben wird, ist es möglich, die Spitze in einem definierten Abstand über die Probe zu führen. Hierfür werden heutzutage meist aus Silizium oder Siliziumnitrid gefertigte AFM-Spitzen verwendet. Diese bestehen aus einem Federbalken (Cantilever), an dessen Ende die Spitze angebracht ist und besitzen eine charakteristische Kraftkonstante. Aufgrund der adhäsiven und repulsiven Kräfte, die zwischen Spitze und Probe auftreten, wird der Cantilever je nach Kraftkonstante unterschiedlich stark in Richtung Probe (oder von ihr weg) ausgelenkt. Für die Detektion dieser Auslenkung hat sich das Lichtzeigerprinzip als standardmäßiges Verfahren durchgesetzt (Abb. 2.23).

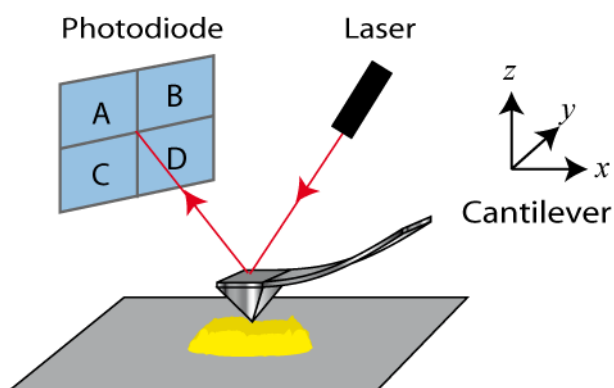


Abbildung 2.23: Detektion der lateralen und vertikalen Auslenkung des Cantilevers mit Hilfe einer Vier-Quadranten-Photodiode und dem Lichtzeigerprinzip. Hierbei wird die Auslenkung durch die Veränderung der gemessenen Ströme festgestellt.

Bei diesem Verfahren wird ein Laserstrahl so auf die Rückseite des Cantilevers positioniert, dass die Reflektion des Strahls auf eine Vier-Quadranten-Photodiode gelenkt wird. Als Messsignal dient hierbei der gemessene Photostrom der Diode I . Durch die Verwendung einer Vier-Quadranten-Diode ist es möglich, sowohl die vertikale als auch die laterale Auslenkung des Cantilevers zu detektieren¹⁴⁴. Auslenkungen in lateraler Richtung werden durch Reibungskräfte zwischen Probe und Spitze hervorgerufen und können Hinweise auf chemische Unterschiede der Probe liefern. Die vertikale Auslenkung wird als Differenz der beiden oberen (A und B) und der beiden unteren Quadranten (C und D) gemessen und ist proportional zum Verfahrweg z des Piezoelements mit der Proportionalitätskonstanten σ (Gl. 19).

$$(I_A + I_B) - (I_C + I_D) = \sigma \cdot z \quad \text{Gl. 19}$$

Dieses Auslenksignal fließt in den Regelkreislauf mit ein und ermöglicht somit verschiedene statische Messverfahren. Bei diesen auch als Kontakt-Modus (contact mode) bezeichneten Verfahren kann die Topographie auf zwei unterschiedliche Arten gemessen werden. Bei einem Abrastern der Probe mit

konstanter Höhe (constant height) wird die Höhe des Cantilevers nicht verändert und lediglich die hierbei variierenden Kräfte bzw. die Cantilever-Auslenkungen werden gemessen. Eine gängigere Methode stellt die Messung mit konstanter Kraft (constant force) dar¹⁴⁵. Hierbei wird der Cantilever mit Hilfe des Piezoelements entsprechend der Topographie der Probe so ausgerichtet, dass die beim Kontakt zwischen Spitze und Probe entstehende Kraft konstant bleibt. Da diese beiden Varianten des Kontakt-Modus eine ständige Berührung zwischen Spitze und Probe bedeutet und hierbei starke Kräfte auftreten können, ist diese Variante der Rasterkraftmikroskopie eher für stabile und harte Oberflächen geeignet und ist folglich für biologische Proben unangebracht. Für letztere bieten sich daher eher die dynamischen Varianten der Rasterkraftmikroskopie an, da die hier auftretenden Kräfte geringer sind¹⁴⁶. Bei diesem als „non-contact“ oder auch „intermittent-contact“ genannten Ansatz werden nicht die auftretenden Kraftveränderungen gemessen, sondern stattdessen die Veränderung der erzwungenen Oszillation des Cantilevers. Hierfür wird der Cantilever mit Hilfe eines Piezoelements zur Schwingung angeregt. Der dabei nahe seiner Resonanzfrequenz vertikal schwingende Cantilever oszilliert oberhalb der Probe und berührt diese lediglich bei maximaler Amplitude leicht. Durch Wechselwirkungen¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ zwischen Probe und Spitze kommt es zu einer Dämpfung der Schwingungsamplitude und damit einhergehend zu einer Phasenverschiebung^{147,150}. Sowohl die Veränderung der Amplitude als auch die auftretende Phasenverschiebung können für den Regelkreislauf als feedback-Signal zur Abstandskontrolle des Cantilevers verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Abstandsregelung über ein Amplituden-feedback geregelt und ist in Abbildung 2.24 genauer erörtert.

Dabei wird die Resonanzkurve in Abhängigkeit der Frequenz aufgezeichnet. Für das feedback-Signal wird die Amplitude bei einer Frequenz nahe der Resonanzfrequenz beobachtet. Treten während des Abrasterns einer Probe aufgrund der Probenmorphologie Veränderungen der Proben-Spitzen-Wechselwirkungen ein, so versucht die Regelung diese zu korrigieren. Wird durch einen Anstieg der Topographie der zuvor definierter Schwellenwert (Soll-Wert, schwarz markiert) unterschritten (Ist-Wert, rot), wird die Spitze über das Piezoelement zurückgezogen bis die Amplitude wieder dem Soll-Wert entspricht. Dementsprechend wird bei einer abnehmenden Probenhöhe (Ist-Wert, grün markiert) das Piezoelement ausgedehnt.

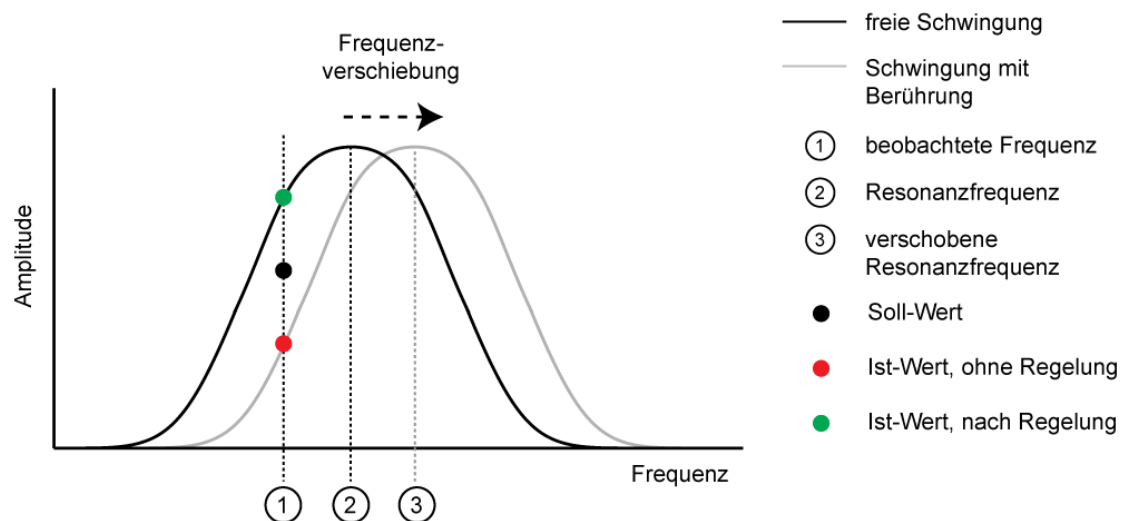


Abbildung 2.24: Aufgrund der auftretenden Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe verursacht die daraus resultierende Resonanzverschiebung eine Veränderung der gemessenen Amplitude bei der beobachteten Frequenz (gestrichelte Linie). Wird der Soll-Wert (schwarz) unterschritten bzw. überschritten (Ist-Wert, rot bei Zunahme der Probenhöhe bzw. grün bei Abnahme der Probenhöhe), wird die Position der Spitze via Piezoelement korrigiert, bis die Amplitude wieder über dem Soll-Wert entspricht.

Bei der Rasterkraftmikroskopie ist, wie bei allen Rastersondenverfahren, die Beschaffenheit der Spitze von großer Bedeutung. So können zum Beispiel mangelhafte Spitzen, die eine Doppelspitze besitzen, zu erheblichen

Messartefakten führen. Bei einer Doppelspitze interagieren mindestens 2 Bereiche der Spitze mit der Probe und liefern als Topographie eine Überlagerung der von beiden Bereichen gemessenen Höheninformation. Aber auch die Geometrie der Spitzen selbst muss berücksichtigt werden, da es bei Proben mit scharf abgrenzenden Stufen und mesoporösen Strukturen zu einer Überlagerung der Spitzengeometrie mit der Oberflächenstruktur kommen kann (Abb. 2.25). Hierdurch werden zum Beispiel scharfe Kanten abgerundet dargestellt. Um die Abweichung zwischen gemessener und realer Topographie zu minimieren, wird der Öffnungswinkel α und der Spitzendurchmesser d bei der Produktion von AFM-Spitzen möglichst klein gehalten.

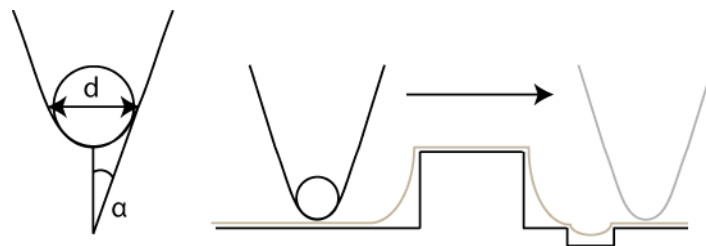


Abbildung 2.25: Durch die Beschaffenheit der Spitze können Artefakte in der Topographie vorkommen. Die relevanten Größen sind hierbei der Spitzendurchmesser d und der halbe Öffnungswinkel des Konus α . Die gemessene Topographie (grau) kann dadurch von der realen Topographie (schwarz) abweichen.

2.5.4.2. Nahfeld-Optik

Das optische Auflösungsvermögen herkömmlicher Mikroskope ist in etwa auf die Hälfte der verwendeten Anregungswellenlänge limitiert. Diese Auflösungsgrenze wurde 1873 von Abbe⁹⁴ wie folgt beschrieben:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha}$$

Gl. 20

wobei d die kleinstmögliche Distanz zwischen zwei voneinander unterscheidbaren Objekten ist. Diese Distanz ist dabei abhängig von der Anregungswellenlänge λ , dem Brechungsindex n des Mediums und dem Öffnungswinkel α des Objektivs. Der Brechungsindex und der Öffnungswinkel des Objektivs lassen sich als numerische Apertur (NA) zusammenfassen und sind für jedes Objektiv spezifisch. Somit ergibt sich bei einer Wellenlänge von 600 nm und einer NA von 0,9 eine maximale optische Auflösung von ca. 330 nm.

Im Jahr 1928 postulierte E. H. Synge²², dass es möglich sei das Beugungslimit zu umgehen, wenn der Beobachtungsabstand zu einem Objekt geringer als die Wellenlänge des genutzten Lichtes ist. Erst die bereits beschriebene Erfindung der Rastersondenmikroskopie ermöglichte die Entwicklung der optischen Rasternahfeldmikroskopie ('scanning near-field microscopy', SNOM oder auch NSOM¹⁵¹). Diese Kombination aus optischem Nahfeld und rasterndem Verfahren basiert auf dem Grundprinzip von Synge. Eine submikroskopische Lichtquelle, ausgestattet mit einer Apertur, welche kleiner ist als die Wellenlänge des anregenden Lichtes, wird in die unmittelbare Nähe der Probe gebracht. Das durch die Größe der Apertur induzierte evaneszente Feld ruft Wechselwirkungen mit der Probe hervor, welche eine sehr kurze Reichweite aufweisen und als optisches Nahfeld bezeichnet werden. Nahezu zeitgleich zeigten Pohl¹⁵² und Lewis¹⁵³, dass sich durch die Verwendung von Sonden mit Apertur eine Auflösung von ungefähr $\lambda/20$ erreichen lässt. Seitdem hat sich die SNOM-Technik stetig weiterentwickelt und eine Auflösung von ca. 20 nm kann erreicht werden¹⁵⁴. Die Kombination von SNOM mit weiteren spektroskopischen Methoden wie Fluoreszenz¹⁵⁵⁻¹⁵⁸, IR¹⁵⁹⁻¹⁶¹ oder Raman¹⁶² zeigen, dass sich SNOM

zu einer vielseitigen und fortschrittlichen analytischen Methode weiterentwickelt hat. Trotz der erwähnten Vielseitigkeit lässt sich SNOM in zwei Hauptkategorien unterteilen: dem Streu-SNOM („aperturless SNOM“, „scattering SNOM“)¹⁶³ und dem aperturbasierten SNOM (aperture SNOM)¹⁶⁴(Abb. 2.26).

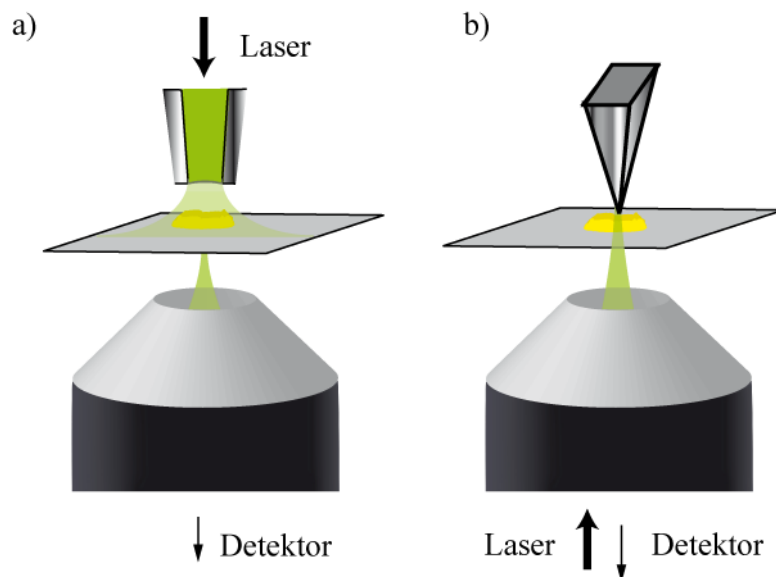


Abbildung 2.26: a) Bei der aperturbasierenden SNOM wird das evaneszente Feld durch die Apertur an der Spitze der submikroskopischen Lichtquelle erzeugt. Die Apertur hat hierbei gewöhnlich eine Größe von 50-70 nm^{165,166}. b) Bei der Streu-SNOM wird die Spitze durch eine normale Lichtquelle (Laser) beleuchtet. Dabei entsteht an der Metallspitze ein evaneszentes Feld.

Bei der aperturbasierten SNOM wird in der Regel eine Glasfaser als Lichtquelle und AFM-Spitze verwendet. Hierbei ist der Radius der Spitze für die optische und die topographische Auflösung wichtig. Um eine Spitze mit geringem Öffnungswinkel zu erhalten, wird die Glasfaser modifiziert. Verschiedene Ansätze wie das Spitzen-Ziehen („heating and pulling method“)^{167,168} und das Ätzen von Spitzen („Turner method“¹⁶⁹ und „tube etching“^{170,171}) haben sich hierbei bewährt. Bei der „heating and pulling-Methode“ wird die Faser unter kontrolliertem Zug durch einen CO₂-Laser oder eine Heizspirale erwärmt. Der dabei eintretende adiabatische Prozess kann durch einstellbare Parameter wie

Temperatur, Heizlänge, Größe der Heizfläche und Einstellung der Zugkraft kontrolliert werden. Der Vorteil dieser Methode, Spitzen mit einem geringen Öffnungswinkel zu erhalten, kommt zwar dem topographischen Auflösungsvermögen zu gute, beinhaltet jedoch auch zugleich dessen Nachteil: in Bezug auf den Lichtdurchsatz durch die Faser ist ein größerer Öffnungswinkel wünschenswert, da dieser mit einer höheren Lichtdurchlässigkeit einhergeht.

Die populärste Methode der Spitzenherstellung stellt das Ätzen von Glasfasern mit Flusssäure dar. Die Turner-Methode ermöglicht durch die Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmittelschichten auf der Flusssäure die Herstellung von Spitzen mit großem Öffnungswinkel und hohem Lichtdurchsatz. Zusätzlich ermöglicht diese Methode die Massenproduktion von SNOM-Spitzen im Labor-Maßstab. Der Nachteil der Turner-Methode besteht in der Entstehung von mikroskopischen Unebenheiten in der Faseroberfläche, welche durch thermische Drift, Vibrationen und Turbulenzen an der Flüssigkeitsoberfläche hervorgerufen werden. Dies hat einen großen Einfluss auf den Lichtdurchsatz der Faser, da es bei dem späteren Beschichten der Spitze zu Löchern in der Beschichtung führen kann. Eine Weiterentwicklung der Methode nach Turner ist das so genannte ‚tube etching‘. Hierbei sorgt die säureresistente Ummantelung der Faser für eine verbesserte Toleranz gegenüber umweltbedingter Turbulenzen. Resultierend hieraus, lassen sich reproduzierbar Spitzen mit einem großen Öffnungswinkel und einer glatten Faseroberfläche herstellen. Diese sind hierdurch optimal für das Beschichten der Faser geeignet. Das Beschichten der Faser ist notwendig, um die Apertur zu formen und die Lichtdurchlässigkeit der Faser zu minimieren. Metalle wie Aluminium, Gold und Silber haben sich

aufgrund ihrer lichtabsorbierenden Eigenschaften als Beschichtung etabliert. Da lediglich ein geringer Prozentsatz des eingekoppelten Lichtes durch die Öffnung austritt und der Rest entweder reflektiert oder als Wärme abgegeben wird, sind aperturbasierende SNOM-Spitzen energetisch ungünstigen Bedingungen ausgesetzt. Zusätzliche Schichten von Chrom, Kobalt oder Nickel werden daher eingesetzt, um der bei höherem Lichtdurchsatz entstehenden Wärme entgegen zu wirken¹⁷².

Durch das Ätzen lassen sich sowohl Glasfasern für aperturbasierendes SNOM als auch Spitzen für streu-SNOM herstellen. Hierbei wird statt einer Lichtfaser ein dünner Metalldraht verwendet. Dessen dabei entstehende Spitzengröße kann aufgrund der stark lokalisierten Felder in erster Näherung als limitierender Faktor der Auflösung angesehen werden. Im Vergleich zu Apertur-SNOM besitzt Streu-SNOM eine höhere Intensität des im Nahfeld gestreuten Lichts. Der Nachteil dieses SNOM-Typs liegt in dessen höherem Untergrundsignal, welches durch die Belichtung der gesamten Probe hervorgerufen wird.

2.5.4.3. TERS-Spitzenproduktion

Die Umsetzung des von Wessel postulierten „surface-enhanced optical microscope“ gelang erstmalig im Jahre 2000 durch die Kopplung eines AFMs mit einem Raman-Mikroskop¹⁷³. Im selben Jahr wurde diese Technik in weiteren Arbeitsgruppen eingeführt^{174,175} und ist heutzutage unter dem Begriff spitzenverstärkte Raman-Streuung („tip-enhanced Raman scattering“, TERS) bekannt. Für die Produktion von TERS-Spitzen gibt es verschiedene Ansätze. Hierbei stellt die Reproduzierbarkeit und die Ausbeute an guten Spitzen die

größte Herausforderung dar. Die am meisten verwendete Technik zur Herstellung von TERS-Spitzen ist das elektrochemische Ätzen eines Metalldrahtes (Abb. 2.27). Dies stellt eine verbreitete Methode für die Produktion von STM-Spitzen dar. Durch leichte Modifikationen ist es möglich, mit dieser Methode Gold-¹⁷⁶ wie auch Silberspitzen herzustellen¹⁷⁷.

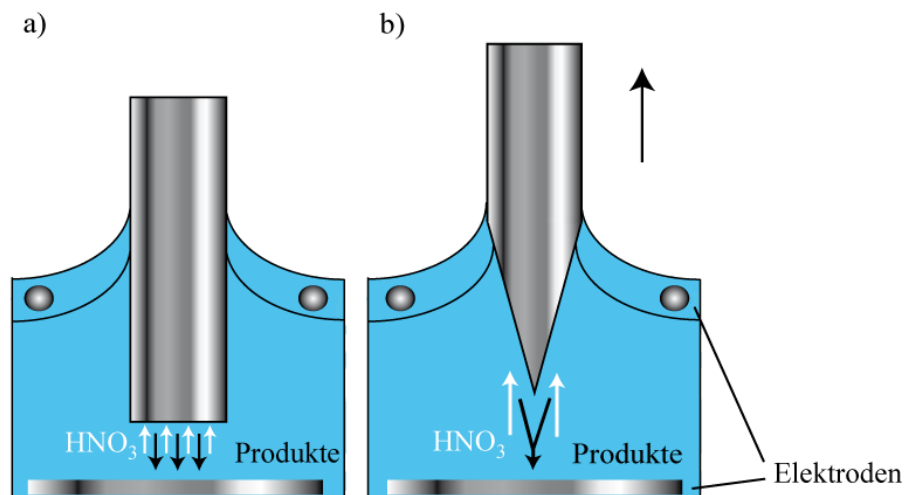


Abbildung 2.27: Schematische Darstellung des Ätzvorgangs eines Metalldrahtes für dessen Verwendung als STM- oder TERS-Spitze.

Einen gänzlich anderen Ansatz bietet die Verwendung kommerziell erhältlicher AFM-Spitzen, welche mit Silber beschichtet werden. Die einfachste Form der Beschichtung stellt die Bedampfung dar. Hierbei wird die Spitze im Ultrahochvakuum mit einer Metallschicht von weniger als 20 nm beschichtet. Es bildet sich hierbei ein Metallfilm ähnlich wie bei der Herstellung von Silberinseln¹⁷⁸. Abbildung 2.28 illustriert die Verteilung der Silber-Nanopartikel auf einer AFM-Spitze und verdeutlicht zugleich die Problematik dieser Form der TERS-Spitzenproduktion. Da die Anlagerung der Silberpartikeln an die AFM-Spitzen einen willkürlichen Prozess darstellt, besteht nur bedingt die Möglichkeit, eine reproduzierbare Qualität der TERS-Spitzen zu gewährleisten.

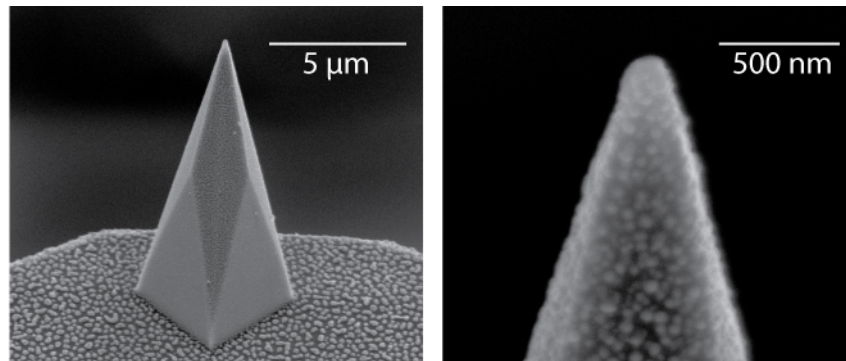


Abbildung 2.28: SEM-Abbildungen einer mit Silber bedampfter AFM-Spitze.

Obwohl es Verfahren wie das nachträgliche Modifizieren bedampfter TERS-Spitzen mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls („focused ion beam“, FIB) gibt, die eine definierte Form mit nahezu reproduzierbaren Eigenschaften liefert¹⁷⁹⁻¹⁸² und es auf diese Weise ermöglichen definierte optische Eigenschaften der Spitzen einzustellen, sind diese bei weitem zu komplex und zu kostenaufwändig, um eine TERS-Spitzenproduktion in benötigter Menge zu gewährleisten.

2.5.4.4. TERS-Aufbau

Die Kombination von Rasterkraftmikroskop mit einem Raman-Mikroskop kann auf unterschiedliche Arten erfolgen und hat einen großen Einfluss auf die Sammeleffizienz des experimentellen Aufbaus. So kann durch geeignete Wahl der optischen Geometrie ein besserer Kontrast zwischen dem bestehenden Raman-Fernfeld und dem von der TERS-Spitze generierten Nahfeld-Signal erzielt werden. Eine der verwendeten Geometrien ist die so genannte Reflektions-Geometrie (Abb. 2.29).

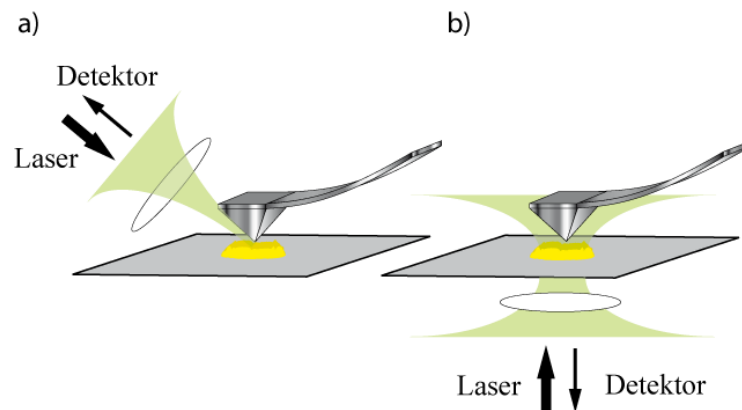


Abbildung 2.29: Schematische Darstellung eines TERS-Aufbaus in Reflexionsgeometrie (a) und in Transmission (b)

Wie in Abbildung 2.29 dargestellt, wird bei der Reflektions-Geometrie die TERS-Spitze von der Seite illuminiert und die entstehende Raman-Streuung von der Seite entweder durch dasselbe Objektiv oder durch zusätzliche Optiken detektiert. Der Vorteil dieser Anordnung liegt in der Möglichkeit, undurchsichtige Proben zu untersuchen. Dieser Vorteil wird dabei auf Kosten der Sammeleffizienz in Kauf genommen. Für die Verwendung von transparenten Proben, wie zum Beispiel Zellen und andere Mikroorganismen, kann stattdessen die Transmissions-Geometrie verwendet werden (Abb. 2.29 b). Diese optische Anordnung ist zwar auf eine gewisse Schichtdicke der Probe limitiert, hat aber den Vorteil, dass sie auf die Sammeleffizienz optimiert ist.

2.5.4.5. TERS-Instrumentierung

Die Kombination eines Rasterkraftmikroskopes mit einem inversen Mikroskop ermöglicht das Arbeiten in Transmissions-Geometrie. Abbildung 2.30 verdeutlicht den TERS-Aufbau, wie er für diese Arbeit verwendet worden ist. Das in Abbildung 2.30 a dargestellte Raman-System wurde bereits erläutert (Abb. 2.17, Seite 51) und wird lediglich am Mikroskop um das AFM erweitert.

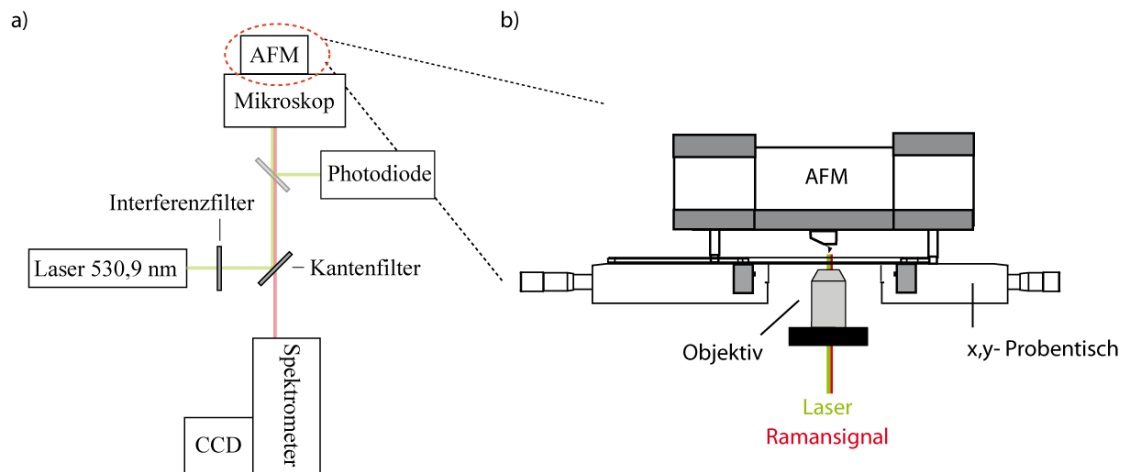


Abbildung 2.30: Schematische Darstellung eines TERS-Setups. a) Das Raman-Mikroskop wird um das AFM erweitert. b) Das AFM besteht bei einem TERS-Setup aus einem Probentisch und einem Rasterkraftmikroskop. Beide können sich Piezo-betrieben in x,y und z-Dimension bewegen.

In einem TERS-Setup setzt sich das AFM aus dem eigentlichen Rasterkraftmikroskop und einem Probentisch zusammen. Beide Komponenten sind Piezo-betrieben und zeichnen sich durch höchste Genauigkeit im Pikometerbereich aus. Aufgrund implementierter kapazitiver Sensoren ist es möglich, mittels eines Regelkreises das bei Piezo-Kristallen auftretende Hysterese-Verhalten zu umgehen (closed loop). Dieser Regelkreis ermöglicht es, bereits abgerasterte Bereiche einer Probe mit minimalster Abweichung ($< 1\text{nm}$) erneut anzusteuern. Zusätzlich zu dieser akkuraten Reproduzierbarkeit ist auch die Positionierung und Kontrolle der Spitze an einem Punkt gewährleistet. Bei Applikationen, wie zum Beispiel TERS, ist dies erforderlich, um die Spitze in den Fokus des Laserstrahls auszurichten. Hierfür wird die TERS-Spitze durch den Laserstrahl über die Probe gerastert und das vom Cantilever zurückgestreute Licht von der Photodiode detektiert (Abb. 2.31). Mit Hilfe des auf diese Weise optischen Refektionsbildes und der simultan gemessenen Ramanstreuung der Spitze wird die TERS-Spitze in den Laserfokus positioniert. Bei den darauf

folgenden Messungen wird die Spitze in dieser Position fixiert und statt dessen der Probenisch für das Bewegen der Probe in alle 3 Raumrichtungen verwendet.

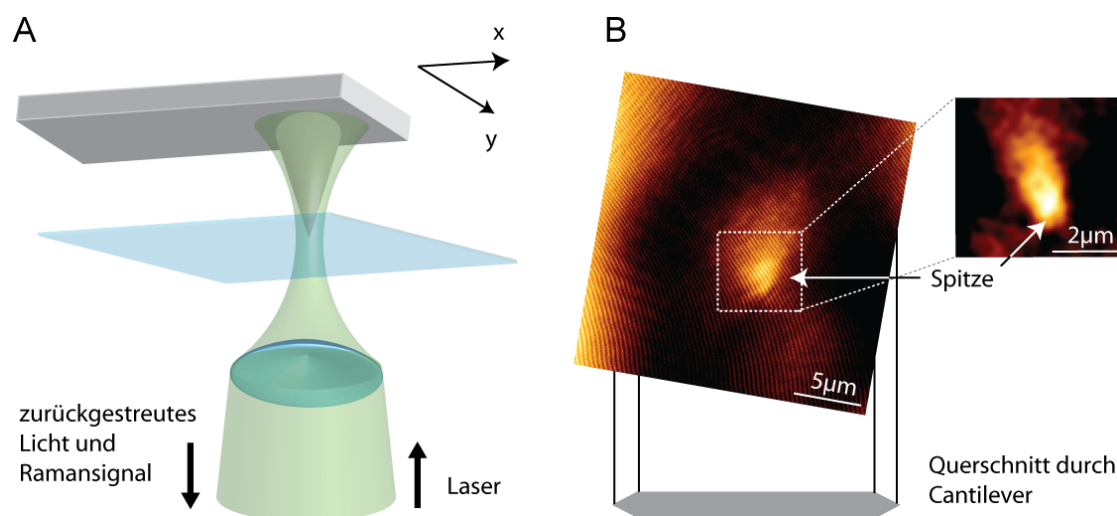


Abbildung 2.31: Durch das Rastern des Cantilevers durch den Laserfokus lässt sich anhand des zurückgestreuten Lichtes die TERS-Spitze lokalisieren. A) verdeutlicht schematisch das Rastern¹⁸³ und B) veranschaulicht die Lokalisierung der TERS-Spitze mit unterschiedlich räumlicher Auflösung.

2.6. *Multivariate Datenanalyse*

Unter dem Oberbegriff der multivarianten Datenanalyse lassen sich mehrere statistische Methoden zusammenfassen. Alle Verfahren zielen darauf ab, komplexe Datensätze durch die Näherung einer geringen Anzahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (Hauptkomponenten oder auch „endmember“) zu strukturieren, zu vereinfachen und zu visualisieren. Letzteres ist vor allem notwendig, da es Menschen schwer fällt, Muster und Regelmäßigkeiten in Zahlenmengen zu erkennen¹⁸⁴. Zur Analyse komplexer schwingungsspektroskopischer Datensätze in der Biologie fanden bis jetzt mehrere gängige Verfahren Anwendung, so z.B. die Hauptkomponentenanalyse („principal component analysis“, PCA)^{55,185,186}, Clusteranalyse (hierarchisches

Clustering)^{187,188}, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)^{189,190}, oder Stützvektormaschinen („supported vector machines“, SVM)^{191,192}. Eine dahingegen eher „junge“ Methode der Datenanalyse auf dem Gebiet der Spektroskopie stellt die so genannte spektrale Entmischung von Daten dar („Spectral Unmixing method“). Ursprünglich für die Analyse in der Geologie entwickelt¹⁹³, erhalten Algorithmen wie „Vertex Component Analysis“ (VCA)¹⁹⁴ und N-FINDR¹⁹⁵ immer häufiger Einzug in die Raman-^{23,196,197} und FT-IR-Spektroskopie¹⁹⁸.

Generell wird hier zwischen überwachter und unüberwachter Klassifizierung unterschieden. Methoden mit unüberwachten Klassifizierungen wie zum Beispiel PCA, VCA und N-FINDR eignen sich, um Informationen über Datensätze ohne vorherige Betrachtung zu erhalten. Methoden mit überwachter Klassifizierung, wie die PLS-DA, setzen ein bereits bestehendes Verständnis und Grundwissen über die Probe voraus.

2.6.1. Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde 1901 von dem britischen Mathematiker Karl Pearson¹⁹⁹ eingeführt und über die Jahrzehnte von verschiedenen Wissenschaftlern weiterentwickelt. Die PCA wurde zunächst in der Biologie angewandt und fand erst mit der zunehmenden Verfügbarkeit von Computern ihren Einzug in viele Teilgebiete der Wissenschaft. Heutzutage ist die PCA weitverbreitet und kaum mehr zu entbehren.

Das Prinzip der Hauptkomponentenanalyse liegt mathematisch in der Anwendung einer Hauptachsentransformation. Hierbei wird in die Punktwolke der Datenmatrix ein neues Koordinatensystem gezogen. Die Achsen des Koordinatensystems sind zueinander orthogonal und zeigen dabei in die Richtung der größten Varianzen im System. Wie in Abbildung 2.32 vereinfacht dargestellt, wird auf diese Weise ein n -dimensionaler Datenraum auf einen m -dimensionalen Unterraum projiziert (mit $m < n$). Der neu konstruierte Datenraum beinhaltet alle charakteristischen Variationen der ursprünglichen Datenmatrix und stellt diese in einer kompakteren Weise dar. Die Daten der originalen Datenmatrix lassen sich aus den resultierenden signifikanten Faktoren, bezeichnet als „scores“ und „loadings“, wieder rekonstruieren. Obwohl die „scores“- und „loadings“-Matrices nur eine kleine Anzahl an Faktoren beinhalten, repräsentieren diese dennoch den komprimierten Informationsgehalt (Hauptkomponente) des komplexen Systems der originalen Datenmatrix. Die Signifikanz der Datenreduktion wird durch die Varianz angegeben. Sie verdeutlicht, wie viele der in der Datenmatrix vorkommenden Datenpunkte durch eine Hauptkomponente („principle component“ PC) erklärt werden können. Gewöhnlich beinhalten die ersten 5 bis 10 Hauptkomponenten den relevanten Informationsgehalt eines Datensatzes, während in den folgenden Hauptkomponenten lediglich Rauschen zu finden ist. Eine gängige Methode, die Resultate einer PCA darzustellen und die Korrelation der Datenpunkte zu verdeutlichen, ist ein so genannter „Score-Plot“, in dem zwei Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen werden.

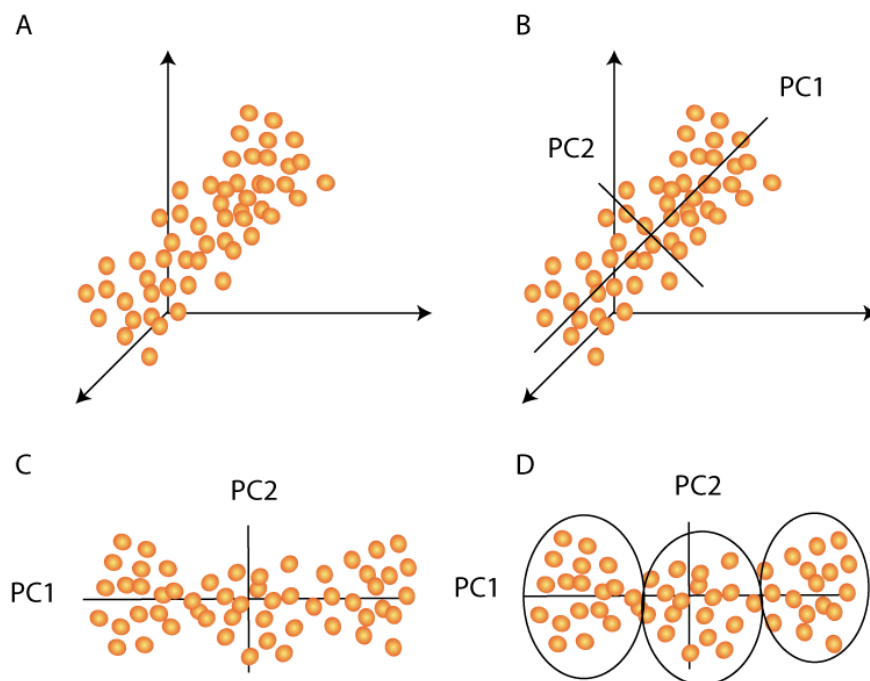


Abbildung 2.32: (A) 3-dimensionale Darstellung der Punktwolke eines Datensatzes. (B) Festlegung eines neuen Koordinatensystems entlang der größten Varianz im Datensatz und anschließende Neukonstruktion des Datenraumes (C). (D) „Score“-Plot der beiden ersten Hauptkomponenten verdeutlicht die Unterteilung des Datensatzes in 3 Gruppen.

Durch diese Art der Darstellung lassen sich recht deutlich die Korrelationen der einzelnen Hauptkomponenten feststellen. Die zugehörigen „loadings“ fassen die spektrale Informationen zusammen. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass es sich nicht um vollwertige Spektren handelt, sondern lediglich um die spektrale Varianz der einzelnen Hauptkomponenten. Obwohl die gesamte spektrale Information vorhanden ist, können die „loadings“ nicht für das Zuordnen von Ramanbanden verwendet werden.

Bei den bereits erwähnten Algorithmen VCA und N-FINDR hingegen, besteht das Resultat der Datenanalyse aus vollwertigen Spektren, welche für weitere Analysen bzw. Zuordnungen direkt verwendet werden können.

2.6.2. N-FINDR

Im Gegensatz zu der bereits erwähnten PCA, bei der die Korrelation der einzelnen Hauptkomponenten auf deren spektralen Ähnlichkeiten beruht, basiert die Entmischung der Spektren im N-FINDR-Algorithmus auf den größten spektralen Unterschieden des Datensatzes. Hierbei werden die Spektren, welche unvermischt sind, als „endmember“ bezeichnet. Als ein unvermischt Spektrum („endmember“ Spektrum) gilt zum Beispiel in einem 2-Komponenten-System ein Spektrum der jeweils reinen Einzelkomponente, welches dem Originalspektrum entspricht. Jedes weitere Spektrum gilt als Linearkombination der „endmember“-Spektren, und jedes Spektrum stellt einen Datenpunkt im n -dimensionalen Raum des Datensatzes dar (Abb. 2.33). Für die Verwendung des Algorithmus gilt die Annahme, dass die „endmember“-Spektren ein Simplex (n -dimensionales Polynom mit $n+1$ Ecken) mit dem größtmöglichen Volumen im n -dimensionalen Raum bilden. Die Beiträge der einzelnen Endmember an jedem Spektrum im Datensatz wird über eine Ausgleichsrechnung mittels Kleinst-Quadrat-Schätzung („least-squares fit“) bestimmt. Unter der Randbedingung nicht negativ zu werden, liefert diese Berechnung Abundanzwerte zwischen 0 und 1 für jeden Endmember innerhalb eines Spektrums. Dies ermöglicht die graphische Darstellung des anteiligen Beitrags eines jeden Endmembers für jedes gemessene Spektrum des Datensatzes.²³

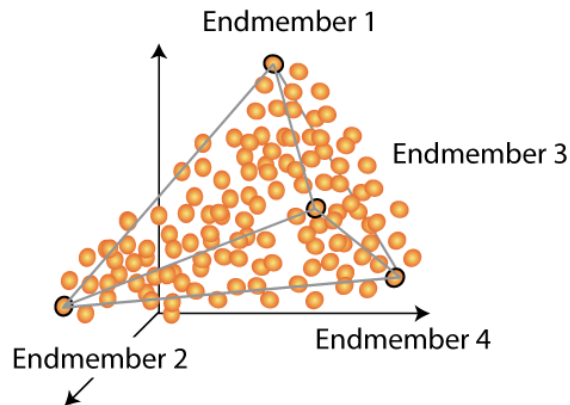


Abbildung 2.33: Darstellung eines Datensatzes im 3-dimensionalen Raum. Jeder Punkt in der Datenwolke entspricht einem Spektrum. Das vom N-FINDR gebildete Simplex ist schematisch mit den entsprechenden „endmembers“ eingezeichnet.

2.6.3. Support vector machine

Für die Darstellung nicht-linearer Zusammenhänge innerhalb eines Datensatzes haben sich die so genannten support vector machines (SVM) durchgesetzt. Entwickelt von Vapnik²⁰⁰ und Burges²⁰¹ wird diese Methode weitläufig für die Klassifizierung spektraler Datensätze wie von Geweben²⁰², Tumorzellen²⁰³ oder Bakterien¹⁹² angewandt. Das funktionelle Prinzip dieser Methode liegt in der Verwendung einer Hyperebene, welche zwischen den einzelnen Klassen des Datensatzes gespannt wird. Die Trennung komplexerer Datensätze kann nicht in der Ebene durchgeführt werden, sondern nur in einem höher-dimensionalen Raum. Für die benötigte Überführung in diesen Raum wird eine Kernel-Funktion verwendet. Hierdurch ist es möglich, nicht-lineare Trennungen mittels einer Hyperebene durchzuführen²⁰⁴.

3. Material und Methoden

3.1. Zellen und Zellzucht

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Darmkrebszellen der Zelllinie HT29 von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. G. Rogler der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsspitals der Universität Zürich bereitgestellt. Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in DMEM Medium (PAA, Deutschland) mit 10% FCS („fetal calf serum“, fetales Kälberserum, Invitrogen, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Die Generierung des Zellmodels mit künstlicher Entzündung wurde durch die Beigabe von 1µg/ml LPS (Lipopolysaccharid, L4516, Sigma-Aldrich, Deutschland) induziert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden wurden die Zellen auf zuvor autoklavierten und gereinigten Glasdeckgläschen (HNO₃/H₂O₂ (3:1), Fluoreszenz-, AFM- und TERS-Messungen) und CaF₂-Fenster (Ethanol; Raman-, CARS- und IR-Messungen) transferiert (alle Chemikalien Sigma-Aldrich, Deutschland). Nach 6 Stunden Inkubationszeit im Medium (je nach Probe mit oder ohne LPS) wurde das Medium mit PBS abgewaschen und die Zellen mit 2% Formaldehyd + PBS (jeweils Sigma-Aldrich, Deutschland) fixiert. Bis zum Vermessen der jeweiligen Probe wurde diese bei -80°C gelagert.

3.2. PCR

Die Extraktion der RNA aus mit LPS behandelten Zellen und aus unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe erfolgte mit einem Extraktions-Kit (innuPREP RNA mini kit, AnalytikJena, Deutschland). Die gewonnene RNA der frisch kultivierten

Zellen wurde mit einem „OneStep RT-PCR Kit“ (Quiagen, Deutschland) und den dazugehörigen Primern (Eurofins MWG Operon, Deutschland) in DNA umgewandelt.

Tabelle 3.1: Basensequenz der verwendeten Primer

Primername	Basensequenz (5' – 3')	Position	GC-Gehalt	Tm [°C]
ITGB3 left	cagcccgggtcatctgta	582 - 599	61%	60
ITGB3 right	ctccctgactcctccttcg	628 - 646	63%	59
ITGB5 left	gacttttccgcgtgatgg	572 - 589	56%	60
ITGB5 right	tcaacaggcatctcaacagc	621 - 640	50%	59
ITGAV left	ccacataggtggcaagttgtag	1422 - 1443	50%	59
ITGAV right	attcctctagaaggttcaccactc	1461 - 1484	46%	59
SPP1 left	atggtgcatacaaggccatc	59 - 78	50%	60
SPP1 right	acggctgtcccaatcaga	106 - 123	56%	60

Tabelle 3.2: Basensequenz der möglichen Referenzgene

Primername	Basensequenz (5' – 3')	GC-Gehalt	Tm [°C]
β Actin left	ccaaccgcgagaagatgacc	60%	61,4
β Actin right	gatcttcatgaggtagtcagt	42,9%	55,9
GAPDH left	ccacccatggcaaattccatggc	56,5%	64,2
GAPDH right	tagacggcaggtcaggtccacc	63,6%	65,8
G6PD left	acagagtgagcccttcttcaa	47,6%	57,9
G6PD right	ggaggctgcatcatcgtact	55%	59,4

Jede Probe bestand aus 43µl Mastermix, 3µl Primer links, 3µl Primer rechts und 1µl RNA der Probe. Als Fluoreszenzmarker wurde der Farbstoff SYBR green verwendet. Die Proben wurden in jeweils 4 100µl-Messröhrchen überführt und in einem Real-time-PCR-Instrument (Roto-Gene 6000, Quiagen, Deutschland) vermessen. Die Abbildung 3.1 verdeutlicht das verwendete Temperaturprofil.

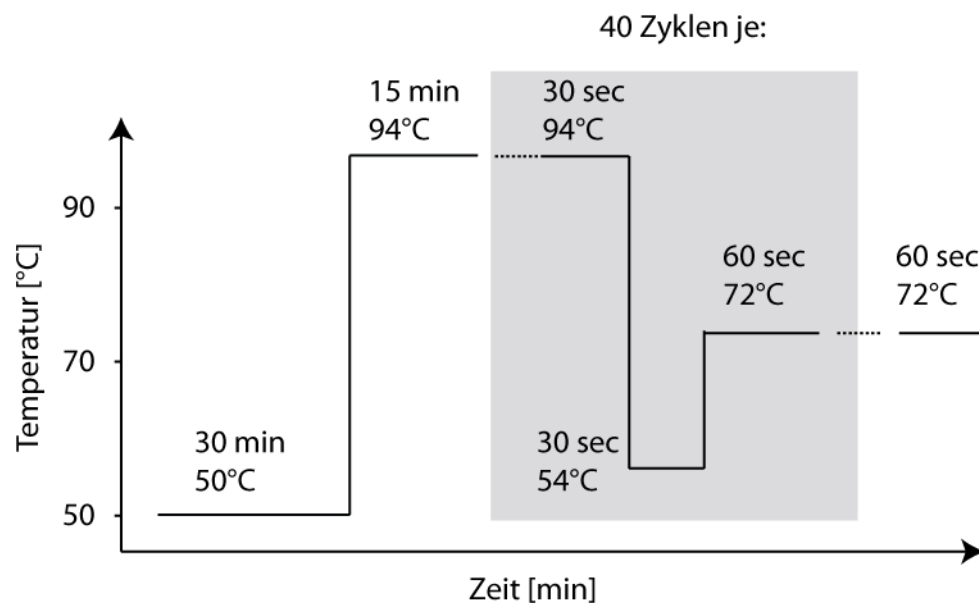


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des für die RT-PCR verwendeten Temperaturprofils.

Des Weiteren wurde durch einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur alle 5 Sekunden (0,5°C pro Schritt) von 45°C auf 95°C anschließend eine Schmelzkurve aufgenommen. Abschließend wurden die auftretenden Produkte zur Kontrolle in einem Agarose-Gel (1,5 %) mit einem DNA-Marker (pUC19/Msp I, Roth, Deutschland) aufgetrennt und für weitere Auswertungen digitalisiert (Easy Win32, Herolab GmbH Laborgeräte, Deutschland). Für die Bestimmung der ct-Werte wurde die Roto-Gene 600 Series Software (Version 1.7, Quiagen, Deutschland) verwendet.

3.3. Fluoreszenz

Auf Deckgläschen fixierte Zellen wurden mit Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“, BSA) Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Fluorescein markierten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Antikörpern angefärbt (FITC Mouse Anti-Human CD51/CD61, BD Pharming, Deutschland). 150µl der Antikörperlösung

wurden je Probe hinzugefügt und für 60 min in befeuchteter Umgebung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Ausbleichen des Farbstoffes durch das Zufügen von 10µl Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Deutschland) verhindert. Die Fluoreszenzuntersuchungen wurden an einem Axio Imager Z1 (Zeiss, Deutschland) mit einem 488nm Extinktionsfilter und einem 514nm Emissionsfilter durchgeführt (jeweils Zeiss, Deutschland).

3.4. FT-IR

FT-IR Daten wurden an einem kommerziellen FT-IR Setup, bestehend aus einem Spektrometer (Model 670, Varian, USA) und einem FT-IR Mikroskop (Model 620, Varian, USA) mit einem 64 x 64 „focal plane array“ (FPA)-Detektor gesammelt. Die Probenkammer des mit einem Cassegrain-Objektiv (15x, NA 0,4) ausgestatteten Mikroskops wurde zudem mit getrockneter Luft geflutet, um den Effekt von Wasserdampf im Spektrum zu minimieren. Die gewonnenen Abbildungen entsprechen einer Fläche von 350 x 350 µm mit einer Pixelgröße von etwa 5,5 x 5,5 µm. Unter der Verwendung eines MCT-Detektors („mercury cadmium telluride“, Quecksilber-Cadmium-Tellurid) wurden zusätzlich Spektren sowohl der Kontrollgruppe als auch der LPS-behandelten Zellgruppe detektiert. Jedes Spektrum bestand aus der Addition 32 einzelner Spektren und wurde in einem spektralen Bereich von 900 – 4000 cm⁻¹ mit einer spektralen Auflösung von ~4 cm⁻¹ aufgezeichnet. Die Hintergrundspektren wurden auf einem zellfreien Areal des jeweiligen CaF₂-Fensters gemessen. Während die FT-IR Abbildungen in Cytospec (CytoSpec Inc., USA) bearbeitet wurden, wurde die Darstellung der

Spektren in „IGOR“ (Wavemetrics, USA, Version 6.2) und deren Analyse in MatLab (Mathworks, USA, Version Release 2007a und Release 2009a) durchgeführt. Effekte der Mie-Streuung wurden unter der Verwendung des von Paul Bassan entwickelten Algorithmus²⁰⁵ in MatLab korrigiert.

3.5. Raman

Auf CaF₂-Fenstern fixierte Einzelzellen wurden an einem Raman-Mikroskop mit piezogesteuertem Probentisch abgebildet (Alpha 300rs, WiTec, Deutschland). Alle Spektren wurden mit einem Gitter mit 300 Linien/mm, einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer Laserleistung von ~55 mW auf der Probe und einer Integrationszeit von 5 Sekunden pro Messpunkt gemessen. Durch die Verwendung eines 100x Objektivs (NA=0,9; Nikon, Japan) wurde eine theoretische laterale Auflösung von ~450 nm erreicht. Die WiTec-eigene Software (Control 1.45, WiTec, Deutschland) wurde für die Darstellung von Raman-Intensitätsabbildungen verwendet. Für weitere Auswertungen wurden die Daten in MatLab (Mathworks, USA, Version Release 2007a) importiert und die Ergebnisse anschließend in „IGOR“ (Wavemetrics, USA, Version 6.2) graphisch dargestellt.

3.6. CARS

Der verwendete CARS-Aufbau bestand aus einem Laserrastermikroskop („laser scanning microscop“, LSM 510 Meta, Zeiss, Deutschland) und einem Ti:Saphir-Laser (Coherent Mira HP, Coherent, USA) gekoppelt mit einem gepulsten Nd:Vanadium Laser (Coherent Verdi-V18, 532 nm, Coherent, USA) für die Anregung der Probe. Im Gegensatz zum rückgestreuten CARS-Signal (epi-CARS) wurde für die Detektion des vorwärts gerichteten CARS-Signals (F-CARS) ein Kondensator (NA=0,55) benutzt und beide CARS-Signale über Photomultiplier (R6357, Hamamatsu, Japan) detektiert. Das Stokes-Lasersignal wurde direkt vom Ti:Saphir-Laser eingekoppelt und für die Justage des Pump-Lasersignals ein optisch parametrischer Oszillator (APE, Deutschland) verwendet. Dieser Aufbau wurde in der Literatur bereits beschrieben¹¹⁴ und wird in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

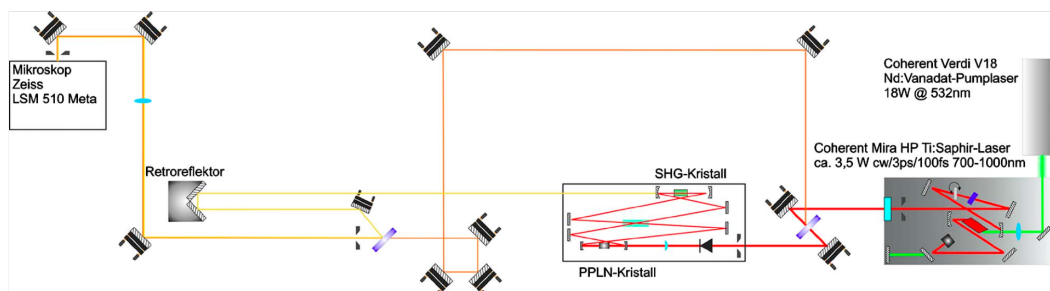


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des CARS-Systems nach Vogler et al. (2010)¹¹⁴

CARS-Abbildungen der Proben (512 x 512 pixel) wurden in weniger als 10s aufgenommen. Das Durchstimmen des Pump-Lasers ermöglichte die Detektion der Ramansignale in einem Bereich der aromatischen und aliphatischen CH-Schwingungen (2675 – 2962 cm^{-1}).

3.7. *Tip-enhanced Raman Scattering*

Für die TERS-Messungen wurden zwei Systeme mit unterschiedlicher Ausstattung verwendet. Eines der Systeme (TERS setup 1) bestand aus einem Rasterkraftmikroskop (Nanowizard I, JPK Instruments AG, Deutschland), welches auf einem inversen Mikroskop (Olympus I 70, Japan) mit einem individuell hergestellten, piezogesteuerten xy-Probenstisch angebracht war. Angekoppelt an das inverse Mikroskop waren ein konfokales Ramanspektrometer (LabRam HR, Horiba Jobin Yvon, Frankreich) mit einer stickstoffgekühlten CCD-Kamera (ISA Spectrum One, Horiba Jobin Yvon, Frankreich) für die Detektion und ein Krypton-Ionen-Laser (Innova 300c, Wellenlänge 530,9 nm, USA) für die Anregung. Das Objektiv (Ölimmersion, 60x, NA=1,45, Olympus, Japan) war auf einem in z-Richtung verschiebbaren Piezo (PIFOC, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Deutschland) montiert, um die stetige Fokussierung des Laserstrahls auf die TERS-Spitze zu gewährleisten. Mögliche benachbarte Wellenlängen des Anregungslasers wurden durch einen Interferenzfilter eliminiert und die entstehende Rayleigh-Strahlung durch einen Notchfilter geblockt. Die Wellenlänge von 530,9 nm und das gewählte Gitter mit 600 Linien/mm ermöglichten eine spektrale Auflösung von $\sim 1,5 \text{ cm}^{-1}$.

Das zweite verwendete TERS-System (TERS setup 2) bestand aus einer vergleichbaren Kombination eines Rasterkraftmikroskops (Nanowizard II, JPK Instruments AG, Deutschland), eines inversen Mikroskops (Olympus I 70, Japan), eines Ramanspektrometers (Acton Advanced SP2750A, Princeton Instruments, USA) und eines CCD-Detektors (Pixis 256E, Princeton Instruments, USA). Abweichend vom TERS-setup1 war das Ölimmersionsobjektiv (40x, NA=1,35,

UAPON40x0340, Olympus, Japan) nicht auf einem Piezo angebracht und somit nicht in z-Richtung beweglich. Dafür war der verwendete Probenstisch (TAO 3-axis, JPK Instruments AG, Deutschland) piezogesteuert in xyz-Richtung beweglich. Für die Anregung wurde ein Diodenlaser (MSL50, Impex HighTech GmbH, Deutschland) mit der Wellenlänge 532 nm verwendet. Durch die Verwendung eines Gitters mit 900 Linien/mm ergab sich auch hier eine spektrale Auflösung von $\sim 1,5 \text{ cm}^{-1}$. Analog zum TERS-setup 1 wurde ein Interferenzfilter eingesetzt und für die Trennung der Rayleigh-Strahlung ein dichroitischer Strahlteiler in Kombination mit einem Notchfilter benutzt.

Bei allen Messungen lag die Laserleistung auf der Probe bei $\sim 1 \text{ mW}$ und die Aufnahmedauer pro Spektrum betrug zwischen 5 und 30 Sekunden. Alle Spektren wurden in MatLab (Mathworks, USA, Version Release 2007a) analysiert und in „IGOR“ (Wavemetrics, USA, Version 6.2) graphisch dargestellt.

3.7.1. Spitzenproduktion

Für die TERS-Messungen wurden kommerziell erhältliche „non-contact“-AFM-Spitzen (NSG10, NT-MDT, Russland) mit Silber (99,99% Reinheit, Balzer Materials, Deutschland) in einer Bedampfungsanlage (BAL-TEC MDS20, BAL-TEC, Deutschland) beschichtet. Bei einem Unterdruck von unter 10^{-6} bar und mit einer Anlagerungsrate von $0,05 \text{ nm/s}$ wurden 20 nm Silber auf die Spitzen aufgetragen. Die frisch hergestellten TERS-Spitzen wurden innerhalb von 2 Tagen verwendet und bis zum Gebrauch als Schutz vor Oxidation und Verschmutzung unter Argon aufbewahrt.

3.7.2. Positionierung der Spitze im Laserfokus

Nach dem Einbau einer TERS-Spitze wurde diese in den Laserfokus positioniert. Eine unpräzise Ausrichtung des Cantilevers wurde mittels Grobjustage des Rasterkraftmikroskops durchgeführt und über ein Videobild kontrolliert. Anschließend wurde während einer Messung das von der Spitze reflektierte Licht auf eine Photodiode gerichtet. Da sich die Spitze im Verlauf der Messung durch den Laserfokus bewegt, variiert die Intensität des reflektierten Lichtes. Diese Varianz kann als Signal in Form von Strom von der Photodiode zugeschaltet werden und ermöglicht die graphische Darstellung eines Hell-Dunkel-Bildes. Der Ort der höchsten Lichtreflektion entspricht hierbei der Position der Spitze. Nach dieser Positionierung wurde die TERS-Spitze piezokontrolliert fixiert und von da an wurde die Probe nur noch mittels des piezogesteuerten Probentisches bewegt, um die Topographie der Probe abzubilden.

4. Ergebnis und Diskussion

4.1. *Fluoreszenz*

Zur Untersuchung der hergestellten Zellmodelle HT29 (Kontrollgruppe unbehandelt und LPS-aktiviert) wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekennzeichnet (Seite 84). Der ca. 15 kDa schwere Antikörper reagiert mit dem menschlichen CD51/CD61 Dimer (~120kDa). In der Literatur lassen sich zahlreiche auf Fluoreszenz basierende Untersuchungen an HT29-Zellen finden. Durch die Verwendung von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern lassen sich sowohl Proteine als auch Lipide nachweisen und untersuchen. So konnte zum Beispiel die Aufnahme von markierten Sphingolipiden²⁰⁶ und auch die Bildung von Sphingolipidaggregaten innerhalb der Zellmembran nachgewiesen werden²⁰⁷. Des Weiteren konnten Informationen über die Adhäsionseigenschaften und Integrin-Expressionsprofilen an HT29-Zellen gewonnen werden²⁰⁸. Hierbei wurde die variierende Integrinexpression bei unterschiedlichen HT29-Sublinien in Abhängigkeit vom Substrat beobachtet. Für diese Untersuchungen der Darmkrebszellen wurden entweder die Lipide markiert oder zwei unterschiedliche Sublinien miteinander verglichen.

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde dahingegen ein und dieselbe Zelllinie verwendet und durch die Zugabe des Endotoxins LPS die Aktivierung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ induziert. In Abbildung 4.1 sind Fluoreszenzbilder der Kontrollgruppe dargestellt. Deutlich lassen sich die mittels FITC angefärbten Zellen erkennen.

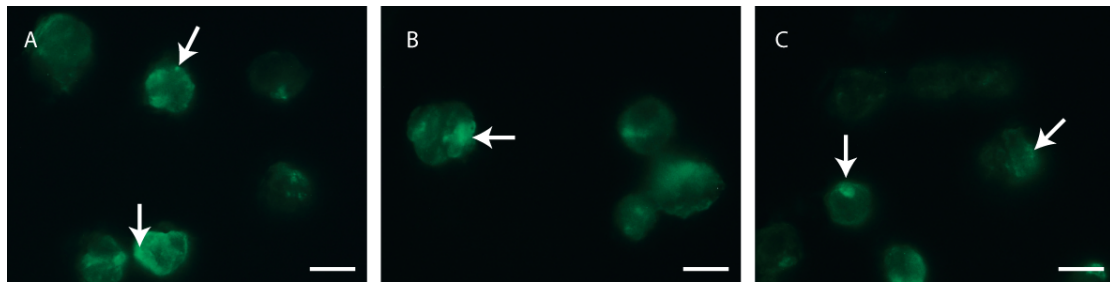


Abbildung 4.1: Auf Deckgläschen fixierte und mit FITC mouse anti human Cd51/CD61 angefärbte HT29-Zellen der Kontrollgruppe. Die Pfeile markieren Integrin-Aggregate auf der Zelloberfläche. Der Skalierbalken entspricht 10 μm .

Abbildung 4.1 veranschaulicht die Verteilung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ auf der Zelloberfläche. Durch die Verwendung von BSA-Puffer für die Probenpräparation können unspezifische Bindungen des Antikörpers ausgeschlossen werden, wodurch die Intensität des Fluoreszenzsignals direkt mit der Verteilung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ korreliert werden kann. Demzufolge lassen sich kleinere Integrin-Konglomerate auf der Zelloberfläche an mehreren Zellen ausmachen (Abbildung 4.1 A – C). Folglich kann sowohl von einer generellen Verteilung des Integrins als auch von der Anwesenheit von Integrin-Aggregaten gesprochen werden. Die Aggregation und die Verteilung von anderen Proteinen der Integrin-Familie ist bereits nachgewiesen worden ²⁰⁸ und wurde hier nicht untersucht.

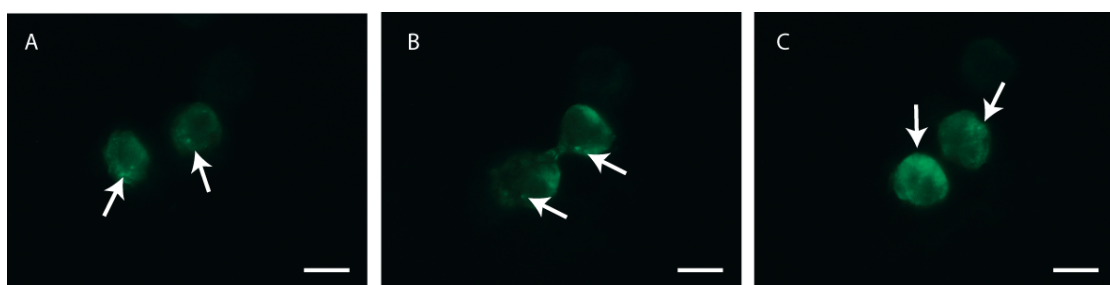


Abbildung 4.2: Anfärbung (FITC mouse anti human Cd51/CD61) von LPS-aktivierten HT29-Zellen fixiert auf Deckgläschen. Die neben der generellen Integrinverteilung auftretenden Aggregate sind durch Pfeile gekennzeichnet. (Skalierung 10 μm)

Abbildung 4.2 zeigt die Verbreitung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ bei LPS-aktivierten HT29-Zellen und lässt keine Rückschlüsse auf eine Veränderung der Integrinverteilung durch die LPS-Aktivierung erkennen. Es sind sowohl eine generelle Integrinverbreitung als auch Integrin-Aggregate sichtbar. Die Aktivierung der Integrine mittels LPS induziert eine Signalkaskade, welche das Einlagern und Clustern der Integrine in Lipid Rafts bewirkt^{72,73}. Aufgrund der Größe von Lipid Rafts von 10-200nm³¹ und der beugungslimitierten räumlichen Auflösung des verwendeten Standard-Fluoreszenzmikroskops ist es nicht möglich, weder das Clustern noch das Einlagern von Integrinen in die Lipid Rafts zu detektieren.

Die gleichbleibende Verteilung des Integrins im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und LPS-aktivierten Zellen erlaubt zudem die Vermutung, dass sich auch der Gesamtgehalt an Integrin durch die Behandlung mit LPS nicht ändert. Obwohl bei der LPS-induzierten Signalkaskade OPN exprimiert wird⁶⁶, hat dies keine Auswirkungen auf die Expression der Integrinuntereinheiten, da bekannt ist, dass die Integrinexpression durch OPN unverändert bleibt⁶⁹. Um zu überprüfen, ob die Verwendung von LPS wirklich keine signifikante Auswirkung auf das Expressionsmuster des Integrins $\alpha_v\beta_3$ hat, wurde das eingesetzte Zellmodell mit Hilfe von RT-PCR untersucht.

4.2. RT-PCR

Für die Analyse einer möglichen Veränderung der Expression der Integrinmonomere Integrin α_v (ITGAV), Integrin β_3 (ITGB3), Integrin β_5 (ITGB5) und des Proteins Osteopontin (SPP1) durch die Verwendung von LPS wurde

β -Actin (bet act) als „housekeeping“-Gen verwendet. Dieses zeichnet sich bei der Anwendung von „SYBR green I“ durch eine hohe Stabilität aus⁸⁵ und wurde auch bereits erfolgreich für Untersuchungen der zellularen Reaktion von HT29-Zellen auf die Behandlung mit LPS verwendet²⁰⁹.

Die für diese Arbeit gesammelten Daten wurden bezüglich ihrer Hintergrundfluoreszenz (Basislinien-) korrigiert und der Verlauf der Fluoreszenz in Abhängigkeit zum PCR-Zyklus graphisch dargestellt (Abb. 4.3).

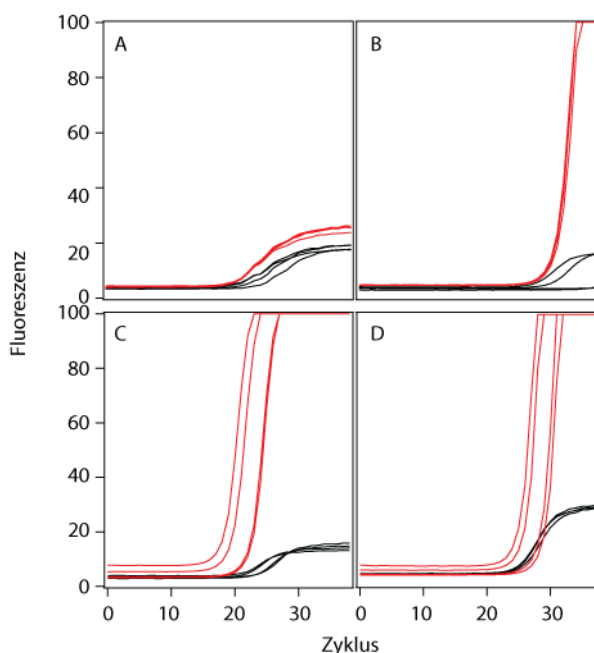


Abbildung 4.3: Basislinien-korrigierter Verlauf der Fluoreszenzkurven der SYBR green I RT-PCR für die untersuchten Zielproteine ITGAV (A), ITGB3 (B), ITGB5 (C) und SPP1 (D). Vergleichend dargestellt sind die Kurven der Kontrollgruppe (schwarz) und LPS-aktivierten Gruppe (rot).

Zur Bestimmung der relativen Menge der cDNA wurde durch die Ermittlung des ct -Wertes jede Amplifikationskurve quantitativ charakterisiert. Die logarithmische Darstellung der Fluoreszenz ermöglicht das Ermitteln des ct -Wertes (Abb. 4.4).

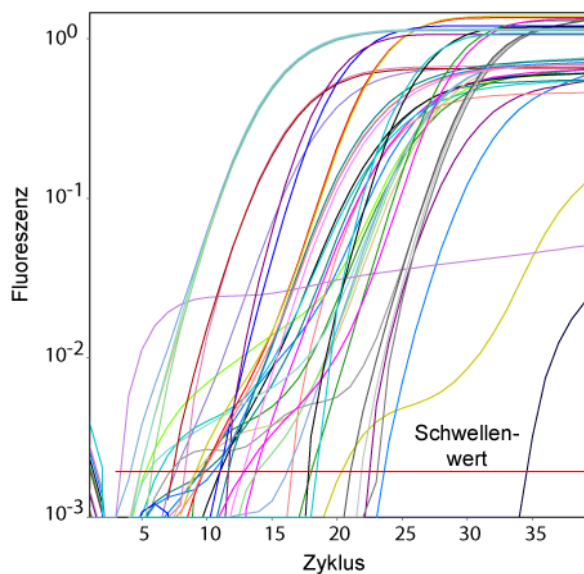


Abbildung 4.4: Die Normierung der Fluoreszenz bzw. die logarithmische Darstellung der Fluoreszenz ermöglicht die Bestimmung des ct-Wertes für jede Amplifikationskurve bei einem Schwellenwert von 0.0019.

Es wurde ein Schwellenwert von 0,0019 für die Bestimmung der ct-Werte festgelegt. Aufgrund der Probenvorbereitung wurden für jede Probe 4 ct-Werte ermittelt, deren arithmetischer Mittelwert für weitere Untersuchungen und Analysen verwendet wurde.

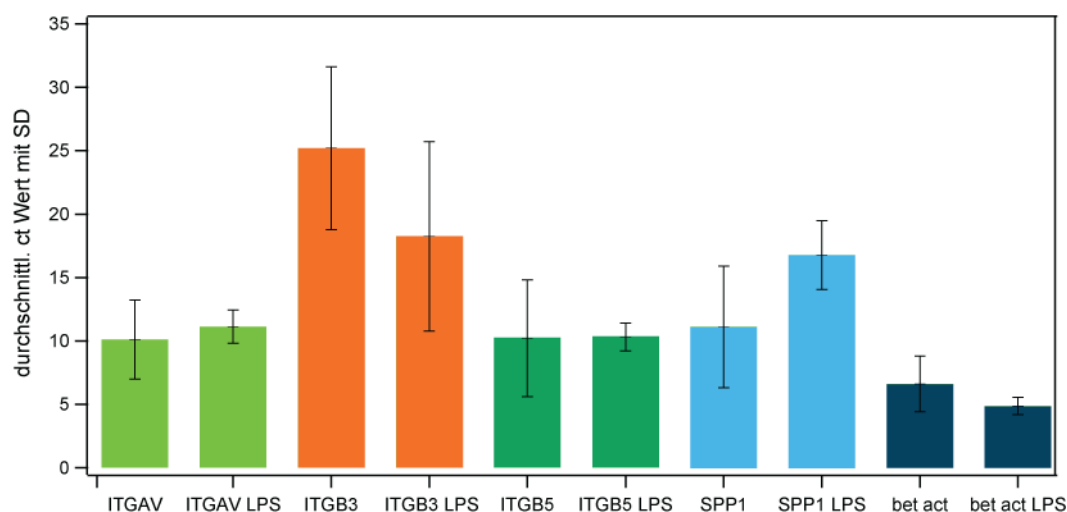


Abbildung 4.5: Ermittlung des ct-Mittelwertes \pm SD für die untersuchten Ziel- und Referenzgene der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe (LPS): Integrin $\alpha_v\beta_3$ (ITGAV), Integrin $\alpha_v\beta_3$ (ITGB3), Integrin $\alpha_v\beta_5$ (ITGB5), Osteopontin (SPP1) und β -Actin (bet act).

Abbildung 4.5 veranschaulicht die gewonnenen Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) für die betrachteten Proteine der Kontrollgruppe und auch der LPS-aktivierten Gruppe. Zur relativen Quantifizierung der veränderten Genexpression wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode⁹³ die relative Expressionsrate bestimmt. Hierbei wurde auf die Korrektur der Effizienz verzichtet, da bekannt ist, dass die Effizienz über 90% liegt⁸⁷. Trotz der Annahme, dass signifikante Veränderungen der Genexpression erst bei einem Wert >2 und <-2 auftreten, lassen sich in den Ergebnissen deutliche Veränderungen beobachten (Abb. 4.6). Wie erwartet, hat sich die Expression von Osteopontin (SPP1) erhöht. Die Zunahme um den Faktor 160 bestätigt die vorhergesagte Neusynthese von SPP1 durch die Behandlung mit LPS. Im Vergleich zu SPP1 fallen die Expressionsveränderungen der anderen Zielgene marginal aus.

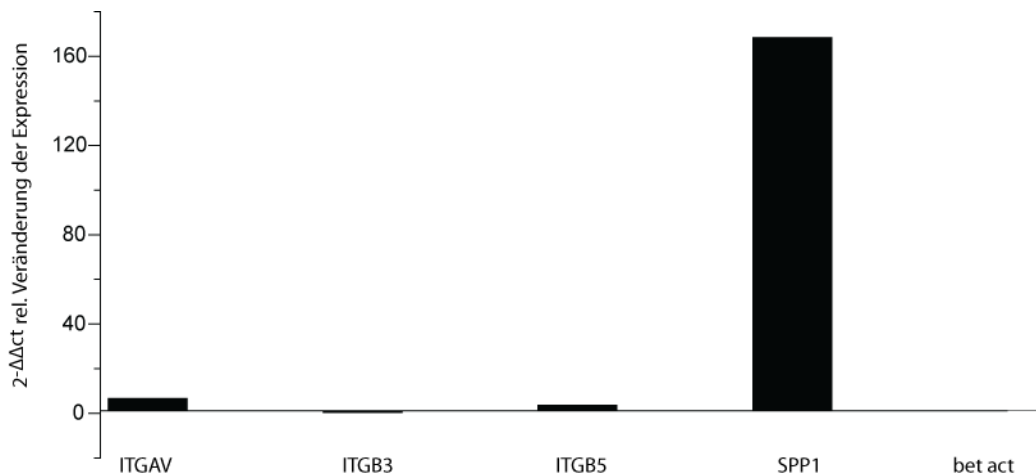


Abbildung 4.6: Relative Veränderung der Genexpression nach LPS-Behandlung. Während SPP1 verstärkt exprimiert wird (160x), lässt sich bei ITGAV und ITGB5 lediglich eine kleine Zunahme feststellen. ITGB3 kann als nicht signifikant betrachtet werden.

Während die Expression von ITGB3 mit einem Wert von 0,002 als nicht signifikante Veränderung betrachtet werden kann, lässt sich sowohl für ITGAV als auch für ITGB5 eine leichte Zunahme der Expression feststellen. Diese

beobachteten Veränderungen im Expressionsmuster lassen den Schluss zu, dass durch die Zugabe von LPS vermehrt Osteopontin gebildet wurde und somit die gewünschte Signalkaskade zur Aktivierung des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Komplexes in Gang gesetzt worden war. Darüber hinaus lässt sich bestätigen, dass es durch die Behandlung mit LPS zu keinerlei Veränderung im Gehalt von Integrin $\alpha_v\beta_3$ kommt, da sich die Expression der β_3 -Untereinheit nicht signifikant geändert hat. Zudem ähneln sich die vermehrte Expression der α_v - und der β_5 -Monomere deutlich. Da bekannt ist, dass sich die Integrinuntereinheit β_5 nur mit dem Monomer α_v kombinieren lässt³⁸, deutet der beobachtete Anstieg der Expression dieser beiden Untereinheiten auf einen gestiegenen Anteil von Integrin $\alpha_v\beta_5$ in der Zellmembran hin. Folglich kann bestätigt werden, dass sich durch die Zugabe von Lipopolysacchariden, wie vermutet, die Expression von SPP1 hochreguliert wird, der Gehalt von Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Komplexen unverändert bleibt und es zu einer leichten Veränderung des Integrin $\alpha_v\beta_5$ -Gehalts kommt.

Zur Verifizierung der PCR-Messergebnisse wurden die verwendeten Proben auf Nebenprodukte hin untersucht, welche durch unspezifische Bindungen der Primer hervorgerufen worden waren. Hierfür wurden Schmelzkurvenanalysen (Abb. 4.7) und eine gelelektrophoretische Auftrennung (Abb. 4.8) durchgeführt.

Die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte zeigt ein sehr spezifisches Bindungsverhalten der Primer für die Analyse aller Proben der Kontrollgruppe (Abb. 4.7 A - D) und von ITGAV und ITGB5 der behandelten Gruppe (Abb. 4.7 A und C, rot).

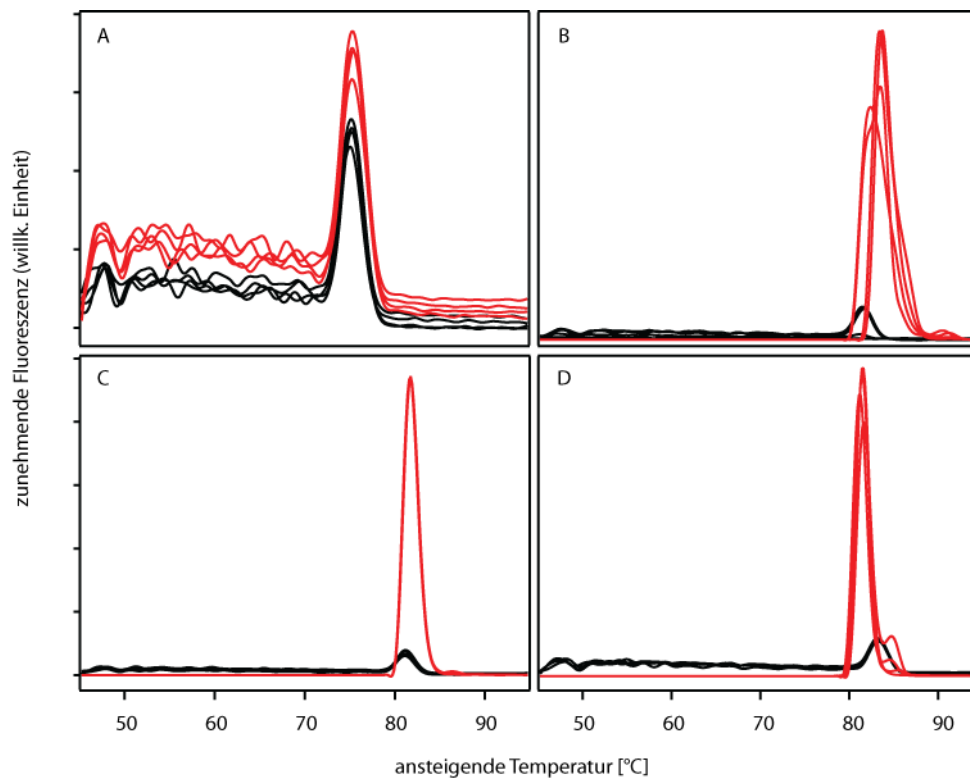


Abbildung 4.7: Beurteilung der Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte ITGAV (A), ITGB3 (B), ITGB5 (C) und SPP1 (D) mittels Schmelzkurvenanalyse. Kontrollgruppe (schwarz) und LPS-aktivierte Gruppe (rot).

Die Analyse verdeutlicht weiterhin die Anwesenheit von Nebenprodukten der PCR-Amplifikation von ITGB3 und SPP1 in der Gruppe der LPS-aktivierten Zellen (Abb. 4.7 B + D), hervorgerufen durch teilweise nicht-spezifisches Bindungsverhalten der Primer. Da die PCR-Produkte unspezifischer Bindungen veränderte Schmelztemperaturen aufweisen, deutet die Anwesenheit weiterer Maxima im Verlauf der Schmelzkurven auf ungewollte Nebenprodukte hin. Wie bereits erwähnt, zeigen sich bei ITGB3 LPS (Maximum1 82,25°C; Maximum2 83,75°C; Maximum3 90,42°C) und bei SPP1 LPS (Maximum1 81,42°C; Maximum2 84,75°C) mehrere Maxima (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Mittels Schmelzkurven bestimmte Schmelztemperaturen der Amplifikationsprodukte der durchgeführten PCR.

	Schmelztemperatur [°C]		
	Maximum 1	Maximum 2	Maximum 3
ITGAV Kontrolle	75,25		
ITGAV LPS	75,25		
ITGB3 Kontrolle	81,58		
ITGB3 LPS	82,25	83,75	90,42
ITGB5 Kontrolle	81,25		
ITGB5 LPS	81,75		
SPP1 Kontrolle	83,25		
SPP1 LPS	81,42	84,75	

Dass es sich hierbei um Primer-Dimere handelt, kann im Grunde ausgeschlossen werden, da diese aufgrund ihrer geringeren Größe bei einer niedrigeren Schmelztemperatur auseinanderbrechen als das spezifische Produkt. Ferner bestätigt die Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte die Tatsache, dass es sich nicht um Primer-Dimere handelt, da weder in ITGB3 LPS noch in SPP1 LPS signifikante Primer-Dimer Produkte nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.8). Die durch die Schmelzkurvenanalyse gewonnenen Daten werden durch die Ergebnisse der Gelelektrophorese bestätigt. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist, kommt es lediglich bei den bereits besprochenen Proben von ITGB3 und SPP1 der behandelten Gruppe zu nicht-spezifischen Bindungen.

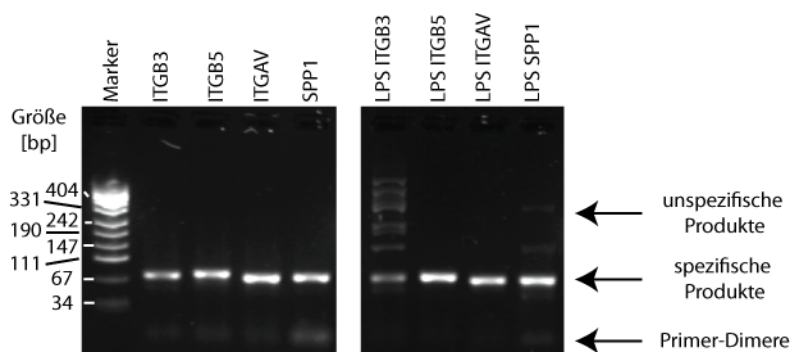


Abbildung 4.8: Beurteilung der Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte ITGAV (A), ITGB3 (B), ITGB5 (C) und SPP1 (D) mittels Gelelektrophorese. Die Größe der Markerbanden ist in Basenpaaren (bp) zum Vergleich angegeben.

Die Erzeugung unspezifischer Produkte und der damit einhergehenden veränderten Amplifikationseffizienz der DNA-Polymerase hat Auswirkungen auf die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse. Da jedoch die unspezifischen Produkte lediglich in einer der durchgeführten Messungen von ITGB3 und SPP1 detektiert werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen außergewöhnlichen Einzelfall handelt. Dementsprechend ist eine Quantifizierung der PCR-Ergebnisse mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode durchführbar.

Der Nachteil einer Untersuchung mittels PCR liegt in der Tatsache, dass sich lediglich Aussagen über die betrachteten Proteine bzw. Gene treffen lassen. So lässt sich die globale Bedeutung der hier durchgeführten Behandlung mit LPS auf zellulärer Ebene nicht ermitteln. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch die Zugabe von LPS verschiedene Signalkaskaden beeinflusst werden, welche recht weitreichende Veränderungen mit sich bringen können. Bei Untersuchungen an verschiedenen Darmkrebszelllinien konnten so zum Beispiel als Folge von Behandlung mit LPS eine Erhöhung der ATP-Produktion²¹⁰, die Aktivierung von Interleukinen⁹¹, eine Veränderungen in der Expression von CD40²¹¹ und CD14²¹² oder die Modifikation der Zelladhäsion einhergehend mit Metastasierung²¹³

nachgewiesen werden. Diese betrachteten Effekte und Signalkaskaden beinhalten enorme Variationen in der Physiologie der untersuchten Zellen, angefangen von Änderungen im Metabolismus bis hin zur Regulierung einzelner Proteinexpressionen. Da lediglich Änderungen im Expressionsmuster mit PCR analysiert werden können, wurden zusätzlich verschiedene schwingungsspektroskopische Methoden verwendet, um weitere Effekte der Behandlung mit LPS zu untersuchen. So lassen sich mit Hilfe der Raman- und IR-Spektroskopie Vorgänge wie Metastasierung^{189,214} und Proteinfaltungen²¹⁵⁻²¹⁷ untersuchen und Analysen der Zellmembran^{102,218,219} durchführen.

4.3. IR-Spektroskopie

Für die FTIR-Untersuchungen wurden Zellen auf CaF₂-Fenstern fixiert. Pro Messung wurden sowohl von der Kontrollgruppe als auch von der LPS-behandelten Gruppe zwischen 100 und 150 Zellen vermessen. Abbildung 4.9 stellt die optischen Aufnahmen zweier exemplarischer Messbereiche beider Gruppen dar (Kontrollgruppe A, LPS B). Die gemessenen IR-Spektren können als Mittelwert der sich im Messareal befindenden Zellen angesehen werden.

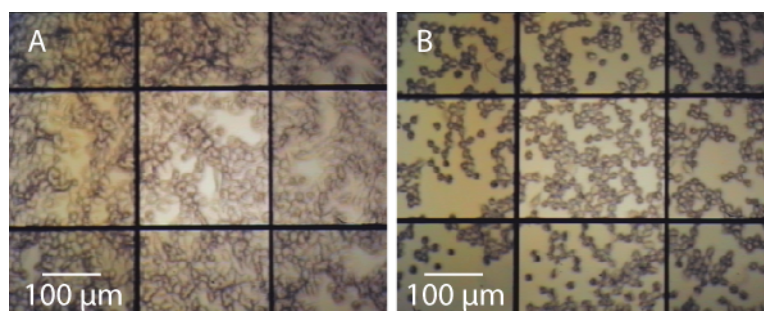


Abbildung 4.9: Optische Darstellung der Messbereiche einer Probe der Kontrollgruppe (A) und der LPS-Gruppe (B). Alle vermessenen Areale beinhalteten zwischen 100 und 150 Zellen pro Messung. Die Skalierung (weiß) beträgt 100µm.

4.3.1. Datenverarbeitung/analyse

Hervorgerufen durch die Beschaffenheit der vermessenen Zellen (Form und Größe) als auch durch den Nukleus jeder Zelle, besaßen die aufgezeichneten Spektren Dispersionsartefakte, induziert durch die resonante Mie-Streuung („resonant Mie scattering“, RMieSc). RMieSc tritt auf, wenn die Wellenlänge der einfallenden Strahlung die gleiche Größenordnung besitzt oder geringfügig kleiner ist als die Größe des bestrahlten Partikels^{205,220}. Durch diese zusätzliche Streuung enthielten die gemessenen Spektren eine deformierte Basislinie und zudem eine veränderte Bandenlage und -intensität der stärksten Signale wie der Amid I-Bande. Dieses deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen RMieSc-Effekten von Einzelzellmessungen^{221,222}. Abbildung 4.10 A stellt ein typisches gemessenes IR-Spektrum mit RMieSc dar. Um Aussagen über eventuelle Unterschiede in den IR-Signalen beider Messgruppen treffen zu können, war eine Korrektur der RMieSc erforderlich. Hierfür wurde ein von Paul Bassan entwickelter Algorithmus verwendet²²². Auf diese Weise wurden die durch RMieSc hervorgerufenen Effekte korrigiert und lieferten das tatsächliche Absorptionsspektrum der Probe (Abb. 4.10 B).

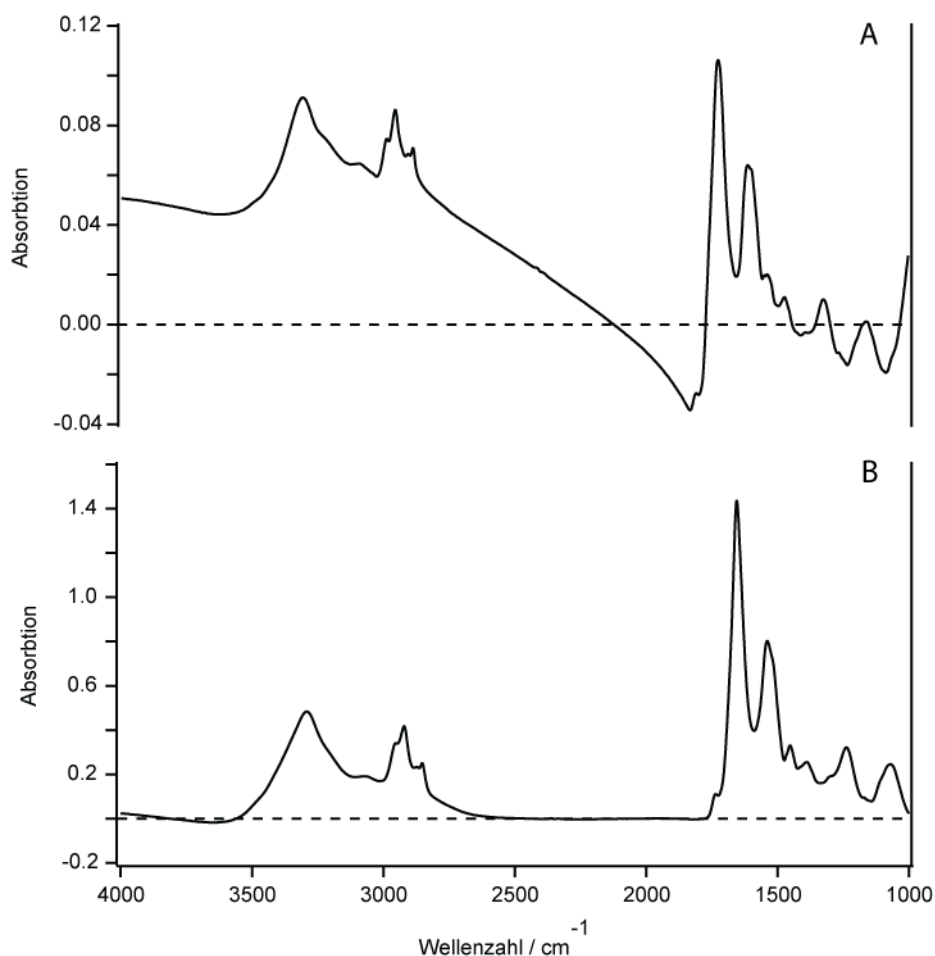


Abbildung 4.10: Gemessenes IR-Spektrum der Kontrollgruppe mit RMieSc-Effekten (A). Im Vergleich dazu das nach der Korrektur mit Hilfe des von Paul Bassan entwickelten Algorithmusses erhaltene Absorptionsspektrum nach 20 Wiederholungen (B).

Der verwendete Algorithmus beinhaltet neben Vektornormierung eine iterative Prozedur für die Korrektur und läuft automatisiert ab. Es ist jedoch notwendig, die verwendete Anzahl der Iterationen der Probe anzupassen, da eine zu geringe Anzahl an Wiederholungen nur einen Teil der RMieSc-Effekte korrigiert, wohingegen eine zu hohe Anzahl an Wiederholungen eine Überkorrektur der vektornormierten Spektren nach sich ziehen kann. In Abbildung 4.11 ist illustriert, wie sich Unterschiede zwischen 11 Iterationen (rot) und 20 Wiederholungen (schwarz) noch deutlich erkennen lassen. Zum Einen lassen sich ausgeprägte Veränderungen in der Intensität einzelner Banden im

Fingerprint-Bereich beobachten, und zum Anderen kann eine Anpassung der Bandenform im höheren Wellenzahlenbereich der Amid A-Bande verzeichnet werden.

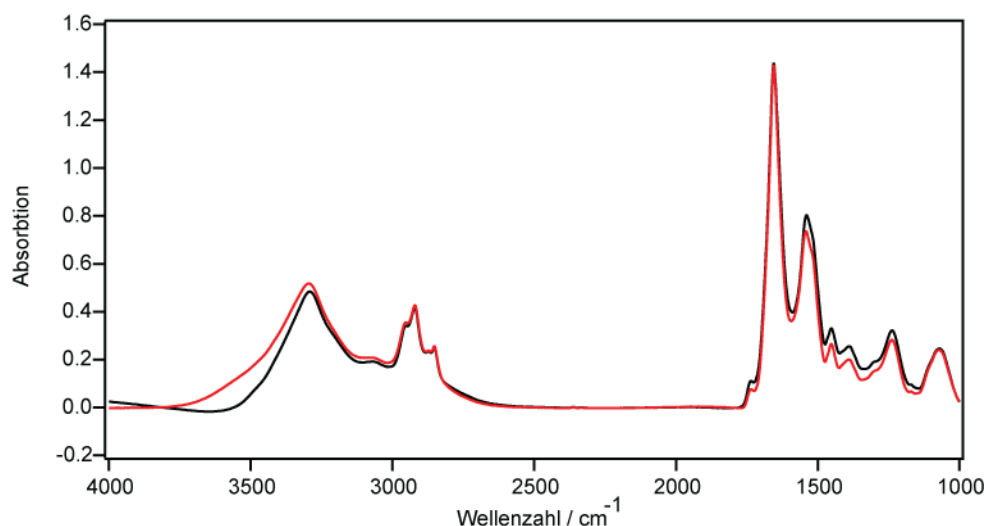


Abbildung 4.11: Vergleich der RMieSc-Korrektur mit 11 (rot) bzw 20 Iterationen (schwarz) von ein und demselben gemessenen IR-Spektrum. Anpassungen der Bandenintensität im Fingerprintbereich und Veränderung der Bandenform der Amid A-Bande lassen sich deutlich erkennen.

Aufgrund dieser Tatsache wurden alle IR-Spektren mit 20 Iterationen bezüglich RMieSc korrigiert.

4.3.2. Statistische Auswertung der IR-Daten

Die auf diese Weise RMieSc-korrigierten IR-Daten wurden anschließend mittels einer Hauptkomponentenanalyse zwecks Kreuzvalidierung untersucht. Die PCA-Untersuchung des gesamten Datensatzes (29 Kontroll- und 30 LPS-Messungen) mit 3 Hauptkomponenten verdeutlicht, dass beide Gruppen eindeutig voneinander unterscheidbar sind. In Abbildung 4.12 sind die loading-Vektoren (D) der einzelnen Hauptkomponenten und die score plots mit der Auftragung der einzelnen Hauptkomponenten gegeneinander dargestellt (A – C).

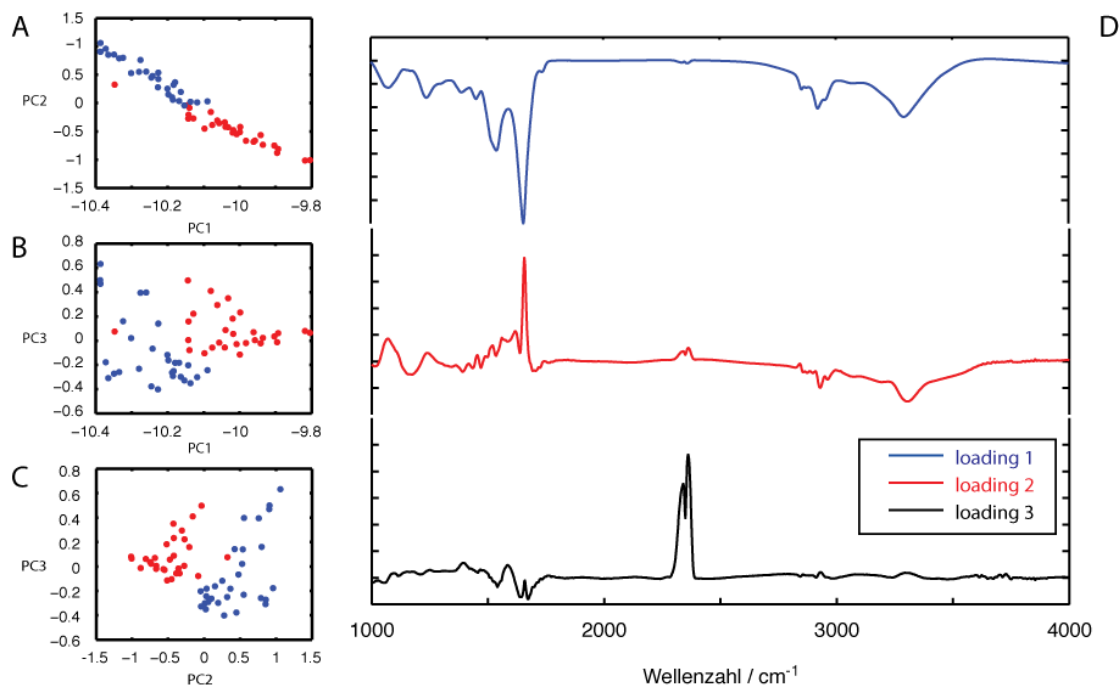


Abbildung 4.12: Darstellung der score plots (A – C) und der loadings (D) als Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse der FTIR-Daten. Der Datensatz setzt sich aus 29 Kontrollmessungen (rot) und 30 Messungen der LPS behandelten Zellen (blau) zusammen, wobei jede Messung 100 – 150 vermessene Zellen beinhaltet.

Die hierbei abgedeckte spektrale Varianz der einzelnen Hauptkomponenten beträgt 99,57% für PC1, 0,3% für PC2 und 0,06% für PC3. In den dazugehörigen loadings sind signifikante spektrale Variationen sichtbar. So lassen sich in loading 1 und 2 deutliche Veränderungen in verschiedenen Bandpositionen wie bei 1078, 1238, 1452, 1657, 2924 und 3300 cm^{-1} erkennen. Hierbei handelt es sich um aus der Literatur bekannte Lipid- und Proteinmarkerbanden^{223,224}. Im Gegensatz hierzu beinhaltet loading 3 fast ausschließlich Modulationen im CO_2 -Gehalt.

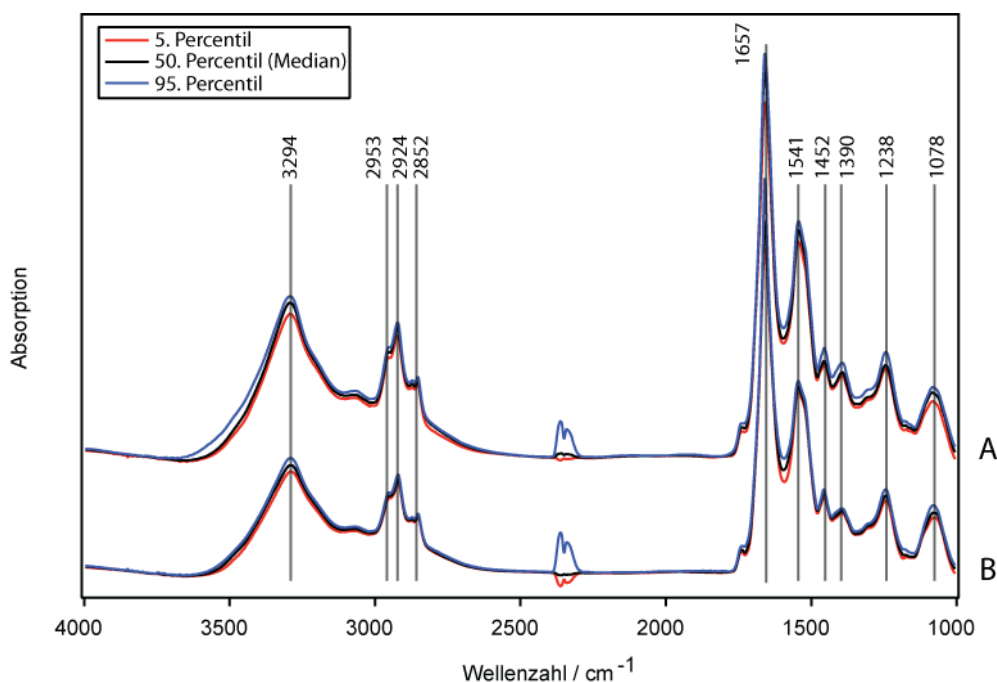


Abbildung 4.13: Der Median (50. Perzentil; schwarz), das 5. Perzentil und das 95. Perzentil wurden für die Kontrollgruppe (A) und für die LPS-behandelte Gruppe (B) errechnet. Biologisch relevante Markerbanden wurden gekennzeichnet.

Weitere Aussagen über Veränderungen der chemischen Zusammensetzung bzw. die biologische Variation innerhalb der Zellen in Korrelation zu Hauptkomponenten lassen sich nicht treffen, da negative Werte in den score plots und den loadings diesbezüglich ungeeignet sind.¹⁹⁸

Aufgrund dieser Tatsache wurden sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die behandelte Gruppe der dazugehörige Median, das fünfte und das 95. Perzentil berechnet.²²⁵ Diese sind in Abbildung 4.13 für HT29 (A) und HT29 + LPS (B) in rot (5. Perzentil), schwarz (Median) und in blau (95. Perzentil) gekennzeichnet. Da das 95. Perzentil 95% der Verteilung der IR-Daten umschließt, wurde dieses Perzentil verwendet, um statistische Sonderfälle auszuschließen und um LPS induzierte zelluläre Veränderungen zwischen beiden Versuchsgruppen mit Hilfe eines Differenzspektrums sichtbar zu machen.

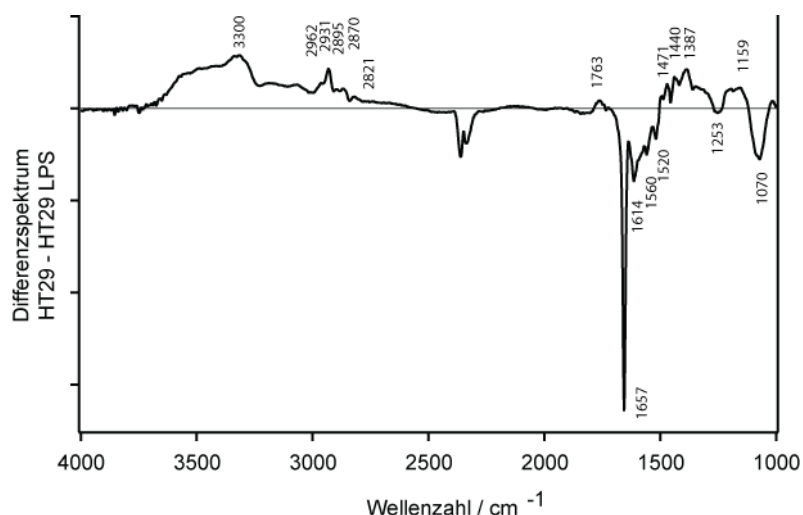


Abbildung 4.14: Differenzspektrum (HT29 minus HT29 + LPS) berechnet aus dem 95. Perzentil beider Gruppen. Die stärksten spektralen Variationen sind gekennzeichnet und wurden chemischen Komponenten zugeordnet (Tab. 4.2). Deutlich lassen sich LPS-induzierte Veränderungen erkennen.

Diese Veränderungen lassen sich deutlich im Differenzspektrum erfassen (Abb. 4.14). Die Positionen der einzelnen Banden sind in der Abbildung markiert und die dazugehörige Bandenzuordnung wird in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die Verringerung von Proteinmarkerbandenintensitäten wie 1520 (Amid II), 1560 (Amid II), 1614 (Amid I) und 1657 cm^{-1} (Amid I)²²⁶⁻²²⁸ verdeutlichen einen gestiegenen Proteingehalt bei LPS behandelten Zellen. Dies deckt sich mit den durch die qRT-PCR ermittelten Resultaten. Beide Methoden belegen somit eigenständig eine LPS induzierte Zunahme des Proteinanteils innerhalb der untersuchten Zellen. Diese Feststellungen werden durch Untersuchungen anderer Forschergruppen bestätigt. So wurde bereits die Zunahme des Proteinanteils erfolgreich durch Behandlung mit LPS an Ratten²²⁹, Mäusen²³⁰ und menschlichen Zellen nachgewiesen²³¹. Einhergehend mit der Veränderung im Proteingehalt lässt sich ebenso eine Modulation des Lipidgehaltes erkennen. Lipiden zugeordnete Markerbanden, wie unterschiedliche CH

Streckschwingungen bei 1440, 2870, 2895, 2931 und 2962 cm^{-1} , weisen darauf hin^{227,228,232}.

Tabelle 4.2: Zuordnung der im FTIR-Differenzspektrum zwischen Kontrollgruppe und LPS-behandelter Gruppe auftretenden Banden auf Referenzen basierend^{226-228,233}.

Wellenzahl / cm^{-1}	Zuordnung
1070	CO-O-C Lipid
1159	ν (C-O)
1253	Amid III
1387	COO-, CH ₃ Lipid/Protein
1440	δ (CH ₂)
1471	CH ₂ Lipid/Protein
1520	Tyr, Amid II
1560	Amid II
1614	Amid I β -Faltblatt
1657	Amid I α -Helix
1763	
2821	
2870	ν_s (CH ₂) Lipid
2895	ν_s (CH ₃) Lipid
2931	ν_{as} (CH ₂) Lipid
2962	ν_{as} (CH ₃) Lipid
3300	Amid A

ν strecken, δ deformieren, s symmetrisch, as asymmetrisch, **Tyr** Tyrosin

Weiterführende Untersuchungen der Lipidveränderung bezüglich des Verhältnisses von gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren ist mit Hilfe von FTIR leider nicht möglich, da hierfür wichtige Banden wie die $\nu(\text{C}=\text{C})$ bei 1650 cm^{-1} nicht aktiv ist. Um trotzdem eine detailliertere Übersicht der auftretenden Veränderungen im Protein- und Lipidgehalt zu bekommen, wurden dieselben Proben mit einem Raman-Mikroskop untersucht.

4.4. Raman Messungen

Die Areale der mittels Raman-Spektroskopie durchgeführten Einzelzelluntersuchungen sind durch die optischen Mikroskopaufnahmen in Abbildung 4.15 dargestellt. Jede vermessene Zelle wird durch ein weißes Quadrat gekennzeichnet. Insgesamt kann auf einen Datensatz von 4 Zellen der Kontrollgruppe und 5 Zellen der LPS-Gruppe zurückgegriffen werden. Bei der Kartierung jeder Zelle wurde nicht nur ein minimiertes spektrales Fenster aufgenommen, sondern der gesamte spektrale Bereich von $500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$. Dies beinhaltet zwar einen beträchtlichen Anstieg der benötigten Messdauer, ermöglicht jedoch anschließend die Darstellung der Intensitätsverteilung einzelner chemischer Komponenten. Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch die Verteilung der Intensität der Phenylalaninbande bei 1003 cm^{-1} , einer charakteristischen Proteinbande.

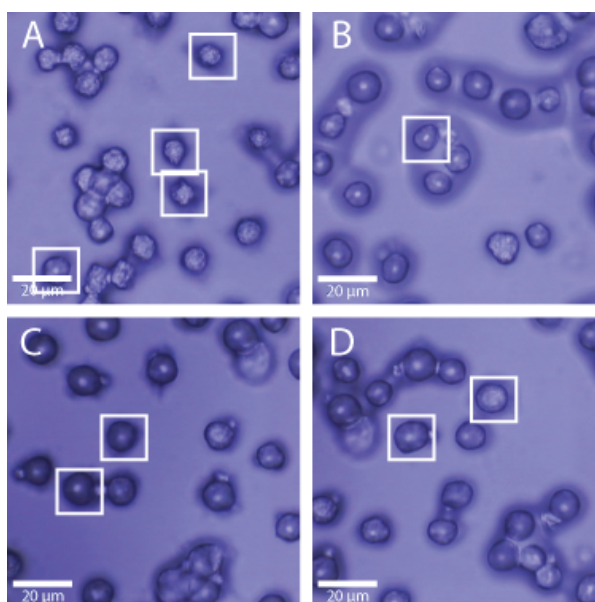


Abbildung 4.15: Optische Darstellung der für die Ramanuntersuchung vermessenen Proben. Untersuchte Zellen sind weiß hervorgehoben. Die Skalierung (weiß) beträgt $20 \mu\text{m}$.

Die Verteilung der Bandenintensität bei 1003 cm^{-1} beinhaltet per se kaum statistisch signifikante Aussagekraft. Jedoch lässt sich durch diese Darstellung anhand schlechter Kontrastwerte deutlich erkennen, dass aufgrund der verwendeten Instrumentierung in den meisten Messungen ein sehr hohes Hintergrundsignal vorliegt.

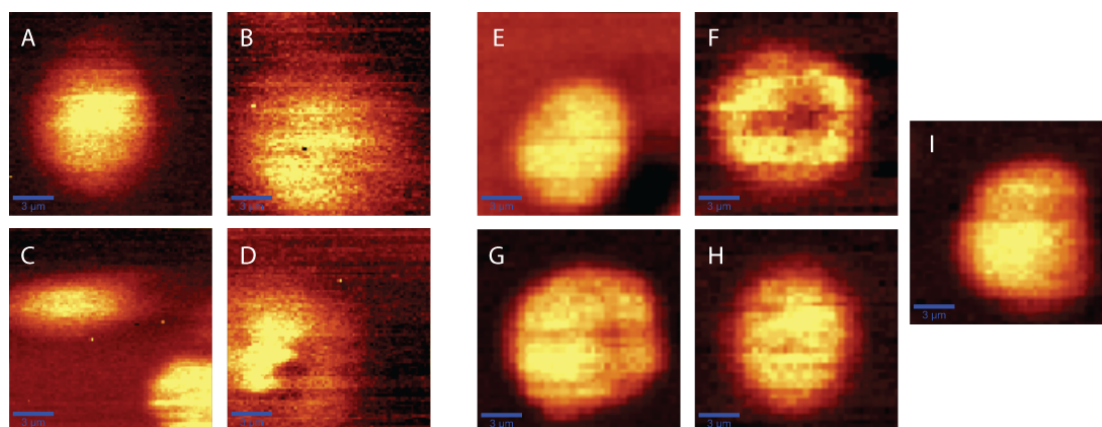


Abbildung 4.16: Intensitätsverteilung der Bande der Ringatmung von Phenylalanin bei 1003 cm^{-1} . Verteilung bei HT29-Zellen (A – D) und LPS behandelten HT29-Zellen (E – I) . Der Skalierbalken entspricht $3\mu\text{m}$.

4.4.1. Statistische Auswertung der Raman-Daten

Für die weitere statistische Auswertung der Raman-Daten wurden diese sowohl bezüglich kosmischer Spikes als auch ihrer Basislinie korrigiert. Anschließend wurde jede Einzelzellmessung mittels unüberwachter hierarchischer Clusteranalyse (HCA) vorbehandelt. Unter Verwendung des K-means Algorithmus²³⁴ und 4 Clustern wurde jeder Datensatz basierend auf spektraler Gemeinsamkeit analysiert. Die in Abbildung 4.17 dargestellte Falsch-Farben-Karte zeigt das Ergebnis der Clusteranalyse einer gemessenen Zelle. Deutlich lassen sich die Cluster voneinander unterscheiden und auch deren spektrale Wesensmerkmale werden durch die dargestellten Spektren verdeutlicht. Dieser

Zwischenschritt in der Datenanalyse wurde des Weiteren dafür verwendet, eventuell entartete Zellen oder Datensätze mit zu hohem Hintergrundsignal auszusondern.

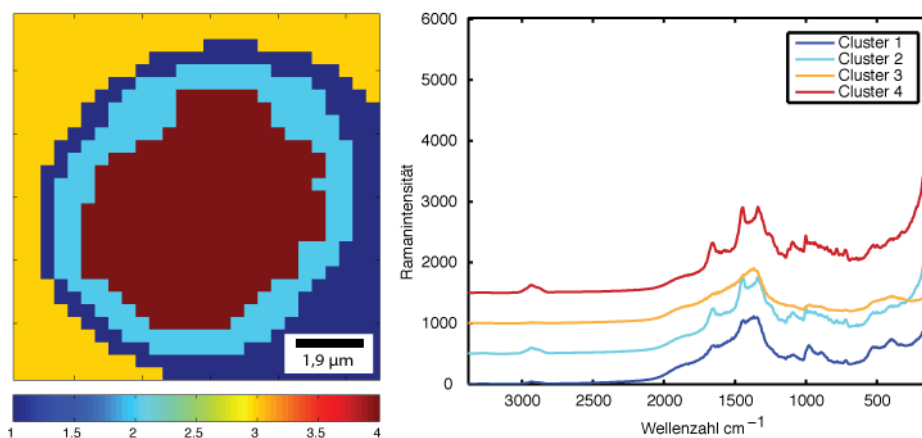


Abbildung 4.17: Ergebnis der Clusteranalyse eines Ramandatensatzes. Die abgebildete Falschfarbende Karte liefert die räumliche Verteilung der einzelnen Cluster. In Kombination mit den dargestellten Mittelwertsspektren der einzelnen Cluster lassen sich die Cluster entweder dem Substrat oder der Zelle zuordnen.

So wurde zum Beispiel die in Abbildung 4.18 dargestellte Zelle nicht für weitere Untersuchungen verwendet, da sich die Zelle allem Anschein nach in der Phase der Zellteilung befand und somit aus biologischer Sicht einen Sonderfall darstellt. Es ist eine weithin bekannte Tatsache, dass sich während der Mitose drastische Veränderungen sowohl im DNA/RNA-, Lipid- als auch im Proteingehalt der Zelle ereignen. Aus diesen Gründen wurde diese Zelle aussortiert.

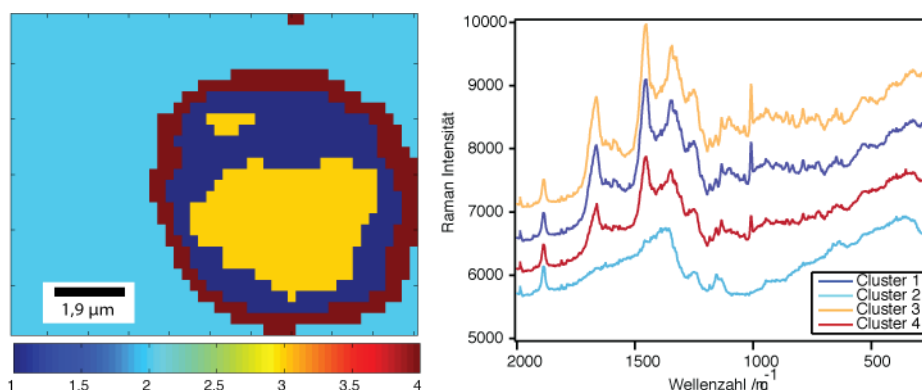


Abbildung 4.18: Falsch-Farben-Darstellung und dazugehörige Mittelwertspektren einer sich in der Mitose befindenden Zelle.

Für die weitere Analyse der Ramanspektren mit Hilfe einer support vector machine (SVM) wurde jedes Spektrum mit seiner aus dem Clustering ermittelten Clusternummer markiert. Die auf diese Weise gekennzeichneten Spektren wurden zwischen 700 und 2000 cm^{-1} Flächen normiert und hinterher der SVM bereitgestellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass lineare Kernel sich für biologische Proben nicht eignen²⁰², daher wurde in dieser Arbeit ein radialer Kernel verwendet.

Die Spektren wurden durch eine 10-fache Kreuzvalidierung mit 500 Permutationen analysiert, wobei für jede Permutation sieben Datensätze für das Training und zwei Datensätze für das Testen des jeweiligen Modells verwendet wurden, vergleichbar einer modifizierten „leave-one-out“ Kreuzvalidierung²³⁵. Zur Rauschminimierung und Datenkompression wurde der Trainingsdatensatz mit einer Hauptkomponentenanalyse mit 10 Hauptkomponenten vorbehandelt. Die daraus resultierenden score-Werte wurden an jeweils 200 zufällig ausgewählten Spektren des Trainings- und des Testdatensatzes für die Konstruktion eines Vorhersagemodells angewandt. Dieses Modell wurde mit den

restlichen Spektren des Trainingsdatensatzes geschult und anschließend an den beiden Zellen des Testdatensatzes validiert.

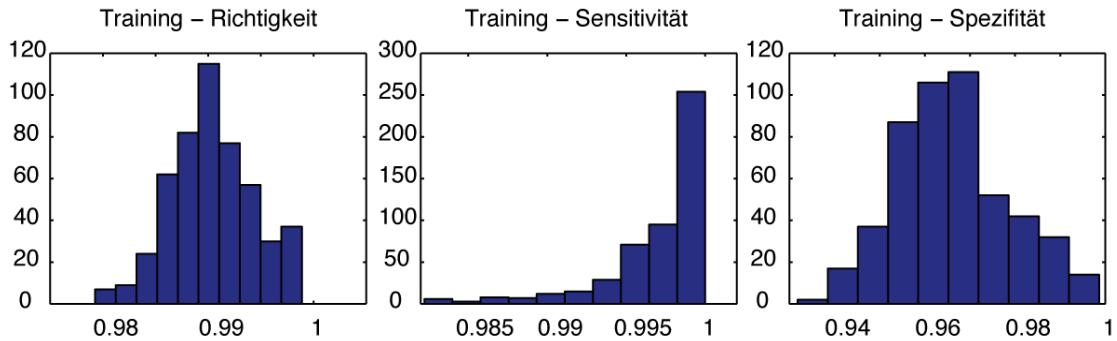


Abbildung 4.19: Trainingsergebnisse der auf die Ramandaten angewandten SVM. Dargestellt sind neben der Richtigkeit der Vorhersage sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität.

Aufgrund der hohen Anzahl an Permutationen lassen sich trotz der geringen Größe des Gesamtdatensatzes statistische Aussagen über das von der SVM generierte Vorhersagemodell in Form von Effektivität der Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität treffen. Die Ergebnisse des Trainings- und des Testdatensatzes sind in Abbildung 4.19 bzw. Abbildung 4.20 dargestellt.

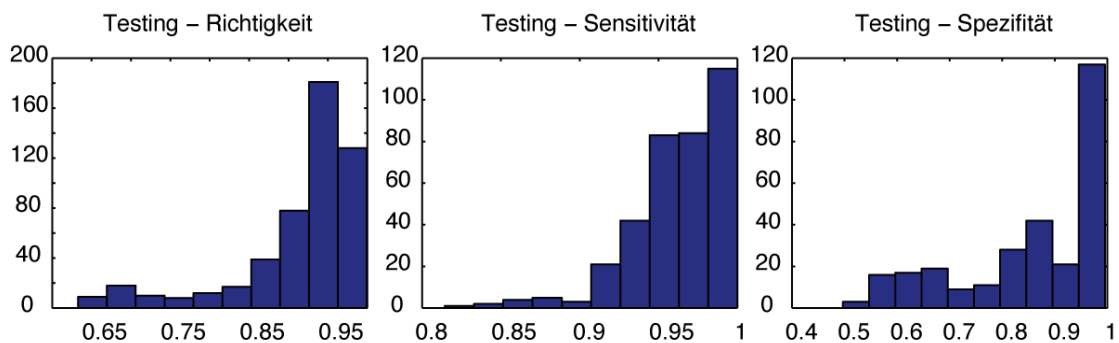


Abbildung 4.20: Ergebnisse der während der SVM-Analyse durchgeführten Tests der zuvor trainierten Modelle. Dargestellt sind neben der Richtigkeit der Vorhersage, die Sensitivität und die Spezifität.

Eine weitere Art der Darstellung der Ergebnisse der SVM sind die in Abbildung 4.21 gezeigten und als „box-whisker-plot“ bezeichneten Graphiken²³⁶. Diese Ansicht der Ergebnisse liefert weitere Informationen über die statistische Verteilung der einzelnen Daten. Hierbei entspricht die untere Antenne dem 25. Perzentil und die obere Antenne dem 75. Perzentil, welche auch als unteres und oberes Quartil bezeichnet werden. Sowohl Ausreißer (blaue Ringe), der Median (in der Box liegende schwarze Linie) als auch der Mittelwert (schwarzer Punkt) werden graphisch dargestellt. Ausgehend vom Mittelwert gelten für das Training des Modells eine Richtigkeit von 99,04%, eine Sensitivität von 99,71% und eine Spezifität von 96,62%. Die durch die SVM generierten Modelle erzielten in der Vorhersage eine Richtigkeit von 91,47%, eine Sensitivität von 96,42% und eine Spezifität von 85,13%. Diese statistische Verteilung der Ergebnisse der SVM bestätigt die Möglichkeit, Vorhersagen über Veränderungen innerhalb ein und derselben Zelllinie zu treffen. Bislang wurden multivariante Datenanalysen wie Linear Discriminant Analysis (LDA)^{202,237}, Artificial Neuronal Networks (ANN)^{106,192} und auch SVMs^{107,192,202} lediglich an Datensätzen bestehend aus unterschiedlichen Zelllinien, Zelltypen oder Geweben angewendet. Die hier gezeigten Ergebnisse bekräftigen die Aussage, dass SVMs für die Analyse und Klassifizierung von Raman-Daten traditionellen Methoden überlegen sind.²⁰²

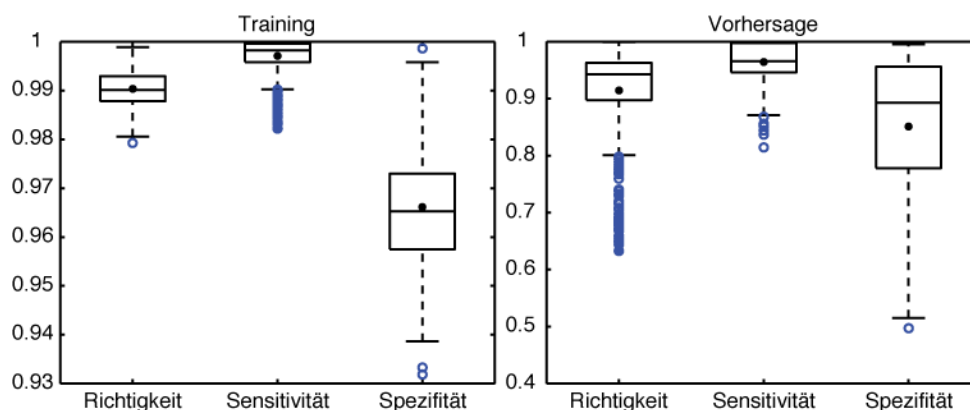


Abbildung 4.21: Box-Whisker-Plots der statistischen Verteilung der SVM-Ergebnisse für das Training der Modelle und der daraus resultierenden Vorhersage.

4.4.2. Spektrale Auswertung der Raman-Daten

Resultierend aus den Ergebnissen der SVM, wurden sowohl aus den Zellspektren der Kontrollgruppe als auch aus den Spektren der LPS-behandelten Gruppe jeweils ein Mittelwertspektrum errechnet. Markiert mit biologisch relevanten Markerbanden werden beide Mittelwertspektren in Abbildung 4.22 gezeigt (HT29 in schwarz; HT29 + LPS in rot).

Beide Mittelwertspektren zeigen nahezu die gleichen spektralen Charakteristika und verdeutlichen die Schwierigkeit, Zellen ein und derselben Zelllinie mit Hilfe schwingungsspektroskopischer Methoden zu analysieren. Aufgrund der vorliegenden Homogenität bezüglich Morphologie und zellulärer Zusammensetzung kann erwartet werden, dass die biologische Varianz zwischen den untersuchten Zellen bei weitem nicht so signifikant ausfallen wird wie bei der Untersuchung unterschiedlicher Zelllinien, -typen oder Geweben.

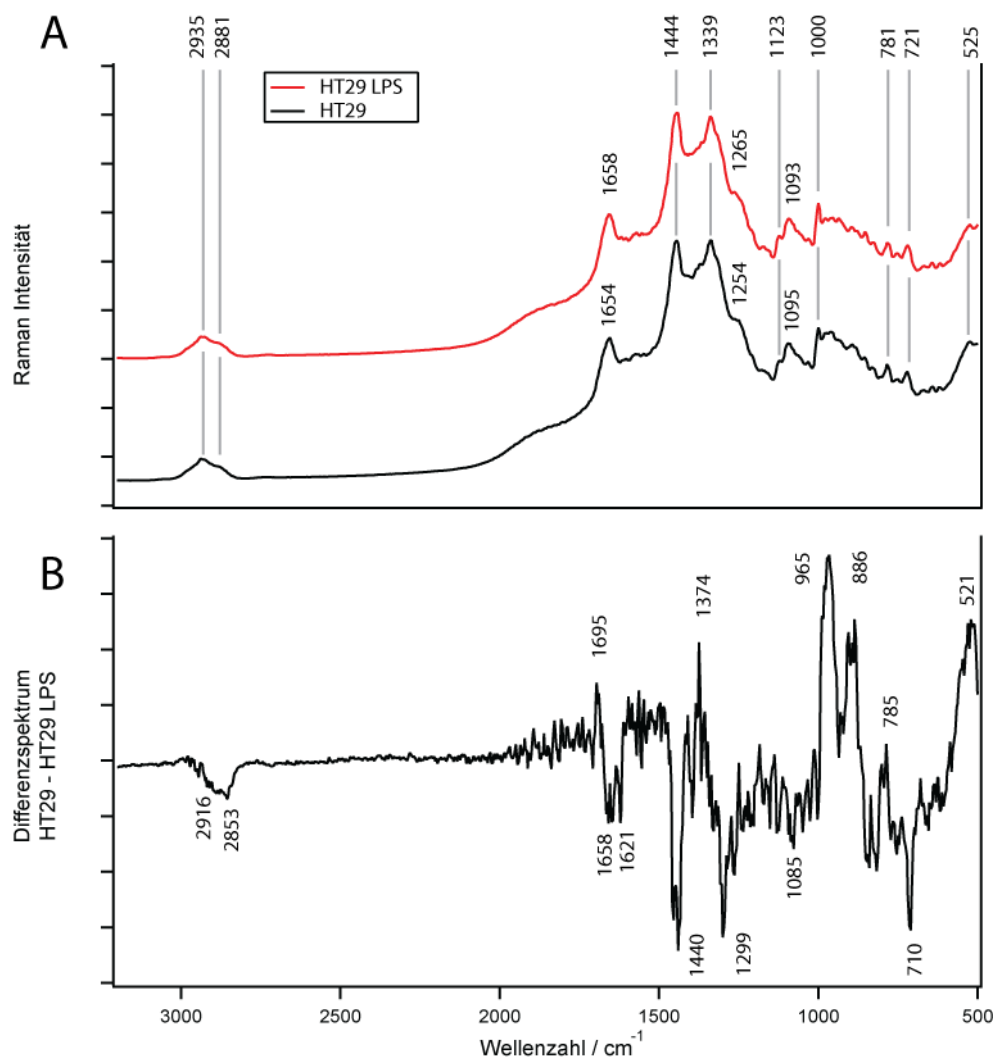


Abbildung 4.22: A) Mittelwertspektren der mit Raman-Spektroskopie untersuchten Zellen der Kontrollgruppe (schwarz) und der mit LPS-behandelten Gruppe (rot) mit gekennzeichneten, biologisch relevanten Markerbanden. B) Differenzspektrum der in A) dargestellten Mittelwertspektren (HT29 minus HT29 LPS). Die spektralen Unterschiede sind markiert und wurden chemischen Komponenten zugeordnet (Tab. 4.3).

Folglich lassen sich in dem ermittelten Differenzspektrum zwischen Zellen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe (HT29 minus HT29 LPS) nur kleinere Veränderungen in der zellularen Komposition identifizieren (Abb. 4.22 B). Mit Hilfe des Differenzspektrums (Abb. 4.22 B) und der in Tabelle 4.3 dargestellten Bandenzuordnung lassen sich jedoch eindeutige Merkmale einer Veränderung des Protein- und des Lipidgehaltes feststellen.

Tabelle 4.3: Bandenzuordnung der im Raman-Differenzspektrum (HT29 minus HT29 LPS) auftretenden Banden^{106,189,227,228,238-242}.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
521	S-S (Cystine)
710	DNA
785	ν_s (O-P-O) Lipid, DNA
886	Phosphatidylcholin ν_{as} (N ⁺ (CH ₃) ₃)
965	ν_s (O-P-O)
1085	ν_s (PO ₂ ⁻)
1299	ρ_t (CH ₂) Lipid, Amide III
1374	ν_s (CH ₃) Lipid
1440	CH ₂ /CH ₃ Lipid
1621	C=C
1658	Amid I α -Helix, ν_s (C=C) Lipid
1695	COOH
2854	ν_s (CH ₂) Lipid
2916	ν_{as} (CH ₂) Lipid

ν strecken, ρ biegen, s symmetrisch, as asymmetrisch, **Trp** Tryptophan

So deuten die Unterschiede der CH₂ - Deformationsschwingung bei 1440 cm⁻¹ und die C=C-Streckschwingungen bei 1621 und 1658 cm⁻¹ auf einen veränderten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hin¹⁸⁹. Da jedoch die Bande bei 1658 cm⁻¹ auch dem Amid I - Gehalt zugeordnet werden kann^{242,243}, kann die vermutete Modulation des Grades der Lipidsättigung nicht bestätigt werden.

Die Abnahme weiterer Lipidmarkerbanden wie die asymmetrische und die symmetrische Streckschwingung von CH₂ (2916 cm⁻¹ bzw. 2854 cm⁻¹) weisen auf eine Veränderung innerhalb des gesamten Lipidgehaltes hin. Um weitere Informationen über die LPS induzierte Variation des Lipidgehaltes zu erhalten, wurden die Proben zusätzlich mit nicht-linearer Ramanmikroskopie (CARS) untersucht.

4.5. CARS

Für weitere Untersuchungen wurden die Proben der Kontroll- und auch der LPS behandelten Gruppe mittels kohärenter Anti-Stokes-Ramanspektroskopie untersucht. Hierbei wurde für jede Wellenlänge des durchgestimmten Pump-Lasers im Bereich der aromatischen und aliphatischen CH-Streckschwingungen von 2650 – 2950 cm⁻¹ ein Intensitätsbild aufgezeichnet. Die spektralen Bereiche der einzelnen Aufnahmen sind in Tabelle 4.4 angeführt. Abbildung 4.23 illustriert exemplarisch die detektierten Aufnahmen für die Kontrollgruppe (A) und für die behandelte Gruppe (B) bei 2806 cm⁻¹. Alle weiteren Aufnahmen können dem Anhang entnommen werden (siehe Seite 180 und 181).

Tabelle 4.4: Liste der spektralen Bereiche des CARS Experiments, bei denen Spektren aufgenommen wurden. Siehe Anhang für die graphische Darstellung der einzelnen Abbildungen.

Kontrollgruppe (HT29) [cm^{-1}]	behandelte Gruppe (HT29 LPS) [cm^{-1}]
2686	2675
2697	2690
2708	2701
2718	2718
2729	2745
2740	2762
2751	2773
2773	2775
2777	2795
2797	2806
2806	2819
2817	2828
2837	2843
2850	2861
2861	2872
2872	2883
2881	2897
2895	2908
2906	2917
2917	2928
2928	2939
2939	2962
2951	
2962	

Die anschließende Normierung der Bilddaten erfolgte aufgrund des guten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht über eine Kurvenanpassung einer Gauß-Verteilung an das Intensitätshistogramm, sondern durch das Verwenden eines globalen Schwellenwertes¹¹⁴.

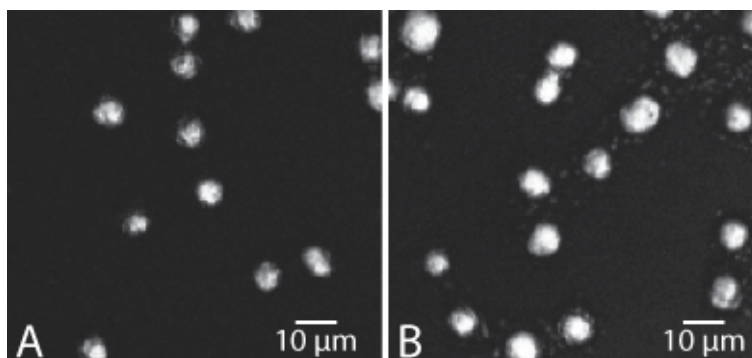


Abbildung 4.23: Darstellung der unbehandelten Intensitätsverteilung des CARS-Signals bei 2806 cm^{-1} für Kontrollgruppe (A) und LPS-behandelte Gruppe (B).

Die Ergebnisse der Normierung der in Abbildung 4.23 dargestellten Rohdaten sind in Abbildung 4.24 in Form von Falsch-Farben-Abbildungen demonstriert. Die Falsch-Farben-Darstellungen des gesamten Datensatzes kann dem Anhang entnommen werden (siehe Seiten 180 - 183).

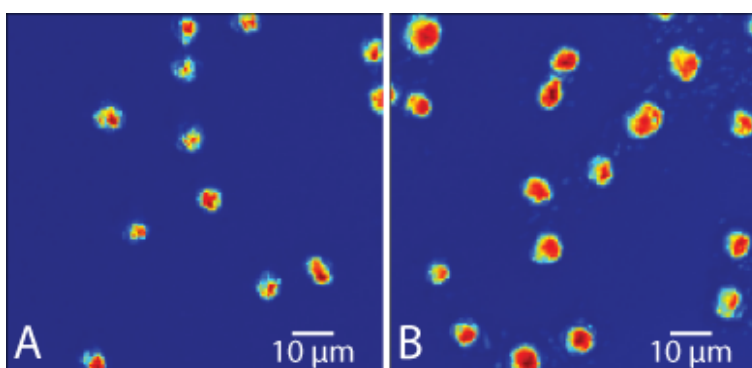


Abbildung 4.24: Falsch-Farben-Darstellung der normierten Intensitätsverteilung des CARS-Signals bei 2806 cm^{-1} für Kontrollgruppe (A) und LPS-behandelte Gruppe (B).

Aus den normierten Falsch-Farben-Darstellungen der einzelnen Wellenlänge lässt sich, durch die Integration des Intensitätswertes jedes einzelnen Pixels einer Aufnahme, eine wellenlängenabhängige Intensitätsverteilung für beide Gruppen erstellen. In diesem Fall wurden alle Intensitätswerte summiert, welche den globalen Schwellenwert des Rauschens überschritten haben. Die hierdurch entstandenen Intensitätskurven sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

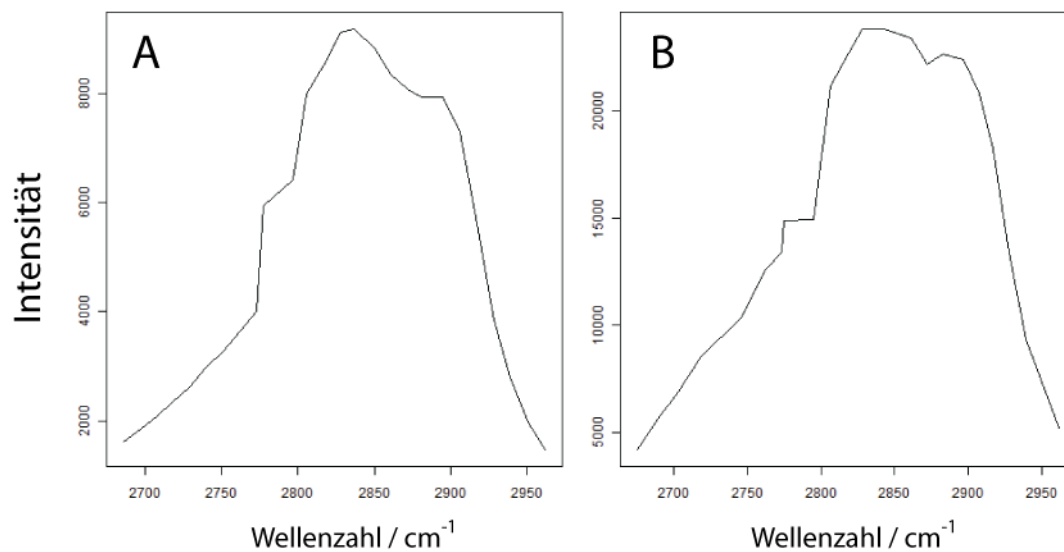


Abbildung 4.25: Wellenlängenabhängiges Intensitätsprofil der HT29 (A) und der HT29-LPS-Gruppe (B) durch Integration der Intensität des CARS-Signals eines jeden Pixels errechnet.

Der Vergleich beider Intensitätsprofile lässt Veränderungen in der Intensität bei 2800 und 2900 cm^{-1} erkennen, welches auf Veränderungen im Lipidgehalt schließen lässt. Diese Andeutung ist jedoch mit Vorsicht zu genießen, da zum Einen die hier betrachteten Daten statistisch nicht greifbar sind und zum Anderen eine Korrektur bezüglich der Variationen in der Leistung des Anregungslasers nicht durchführbar ist und auch die nicht-lineare Detektorempfindlichkeit nicht berücksichtigt werden kann. In der Literatur werden Aussagen getroffen, dass quantitatives CARS immer weiter voranschreitet und quantitative CARS-Messungen an jedem CARS-Set-up durchgeführt werden können²⁴⁴. Dies ist bei dem hier verwendeten CARS-System nicht durchführbar, da die für die Korrektur benötigten Informationen wie Laserintensitäten und Detektorempfindlichkeit aus technischen Gründen nicht aufgezeichnet werden können. Somit lässt sich durch die hier besprochenen und ausgewerteten Messungen lediglich wieder der Trend

ablesen, dass die Behandlung von LPS eine starke Veränderung der Lipidverteilung bzw. -zusammensetzung nach sich zieht. Eine endgültige Aussage ist analog der diskutierten Raman-Ergebnissen nicht möglich.

Um eventuelle Veränderungen der Lipidverteilung und auch eine möglicherweise variierte Proteinlausbreitung in der Zellmembran zu untersuchen, wurden fixierte HT29 und LPS-behandelte HT29-Zellen mit TERS untersucht.

4.6. TERS

4.6.1. TERS-Kartierung von HT29-Zellen

Die folgenden Daten und Ergebnisse sind bereits publiziert (siehe Richter et al²³).

In Abbildung 4.26 A ist die Topographie einer fixierten HT29-Zelle der Kontrollgruppe auf Glas gezeigt (20µm x 20µm), wie sie während des TERS-Experiments aufgenommen wurde. Die Zelle wurde im „non-contact“-Modus mit einer TERS-Spitze abgerastert. Aufgrund des Silberpartikels an der AFM-Spitze weist das Bild eine schlechtere Qualität im Vergleich zu Abbildungen mit kommerziellen AFM-Spitzen auf.

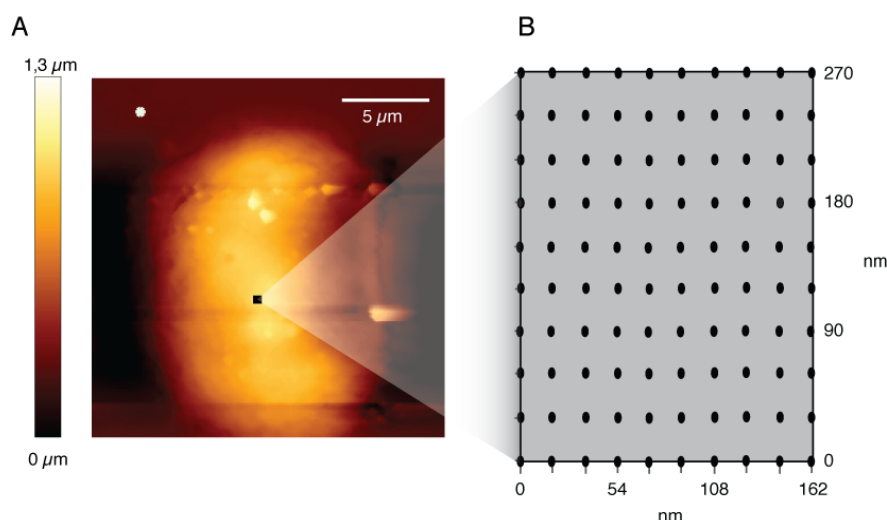


Abbildung 4.26: A) AFM-Topographie einer auf Deckglas fixierten HT29-Zelle (20µm x 20µm, Kontrollgruppe). Das mit TERS untersuchte Gebiet auf der Zelloberfläche wird durch das schwarze Quadrat veranschaulicht. Der Ort, an dem die Kontaminationskontrolle durchgeführt wurde, wird durch das weiße Sternchen gekennzeichnet. B) Für die TERS-Messung gitterförmig angeordnete Messpunkte (10 x 10 Punkte) auf einer Fläche von 270nm x 162nm.

Die Feedbackparameter wurden nahe dem Ist-Wert der Amplitudenschwingung (siehe Kapitel 2.5.4.1 Abb. 2.24) gesetzt, um die Kräfte, die auf die Spitze wirken, so niedrig wie möglich zu halten. Um eine maximale Verstärkung des Ramansignals zu erhalten, wurde zudem die Amplitude zusätzlich möglichst klein gewählt.

Für die eigentliche TERS-Messung in der Art eines Mappings wurden die einzelnen Messpunkte in Form eines Gitters auf die Probenoberfläche verteilt. Das verwendete Gitter wird in Abbildung 4.26 B dargestellt und besitzt eine Größe von 270nm x 162nm und beinhaltet 100 Messpunkte (10 x 10 Punkte). An jedem Messpunkt wurde ein TERS-Spektrum mit einer Aufnahmedauer von 5s aufgezeichnet (Laserleistung auf der Probe < 1mW). Die unbehandelten TERS-Spektren aller Messpunkte sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Spektren ein sehr hohes Signal-Rausch-Verhältnis („signal-to-noise ratio“ SNR) besitzen.

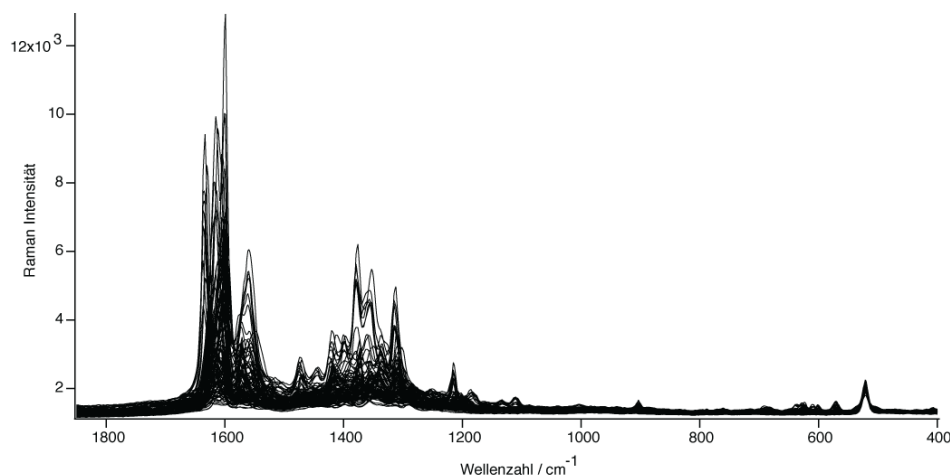


Abbildung 4.27: Unbehandelte Rohdaten der TERS-Messung auf einer HT29-Zelle (Kontrollgruppe).

Unter Annahme eines Spitzendurchmessers von 20nm und einem Laserspottedurchmesser von 1 μ m lässt sich nach der von Budich et al publizierte Methode²⁴⁵ ein Verstärkungsfaktor von 3×10^6 für diese TERS-Spitze berechnen. Hierbei handelt es sich um eine sehr konservative Abschätzung, da weder die Oszillation der Spitze noch der Unterschied des belichteten Probenvolumens noch eine mögliche chemische Verstärkung berücksichtigt wurden. Der tatsächlich Verstärkungsfaktor wird um ein Vielfaches oberhalb des hier berechneten Wertes liegen, da schon bei einer Distanz von 5 – 10nm zwischen Spitze und Probe die Verstärkung um einen Faktor zwischen 10 und 1000 abnimmt^{246,247}.

Nach jedem mapping wurde die TERS-Spitze auf mögliche Kontaminationen hin untersucht. Hierfür wurde zur Kontrolle ein TERS-Spektrum neben der Zelle auf Glas aufgenommen (Abb. 4.26 A, weißes Sternchen). Im Falle einer Verunreinigung wurde die vorangegangene Messung verworfen und die TERS-Spitze gewechselt. Das Kontrollspektrum einer nicht kontaminierten Spitze wird in Abbildung 4.28 Spektrum 2 dargestellt. Die in diesem Fall eingesetzte Spitze

konnte für weitere Messungen verwendet werden. Die gesammelten TERS-Spektren wurden durch Subtraktion des konventionellen, konfokalen Raman-Signals (Raman-Fernfeld-Signal) hintergrundkorrigiert (Abb. 4.28 Spektrum 4). Bei dem Raman-Fernfeld-Signal handelt es sich um das gemittelte Raman-Spektrum des vom Laserspot illuminierten Areals, welches in allen TERS-Spektren vorliegt. Das Raman-Fernfeldsignal wurde am Ende der jeweiligen Messung aufgezeichnet. Hierfür wurde die TERS-Spitze 1500 μm in Z-Richtung weg bewegt und das Ramanspektrum mit der gleichen Belichtungszeit wie die vorangegangenen TERS-Spektren aufgenommen.

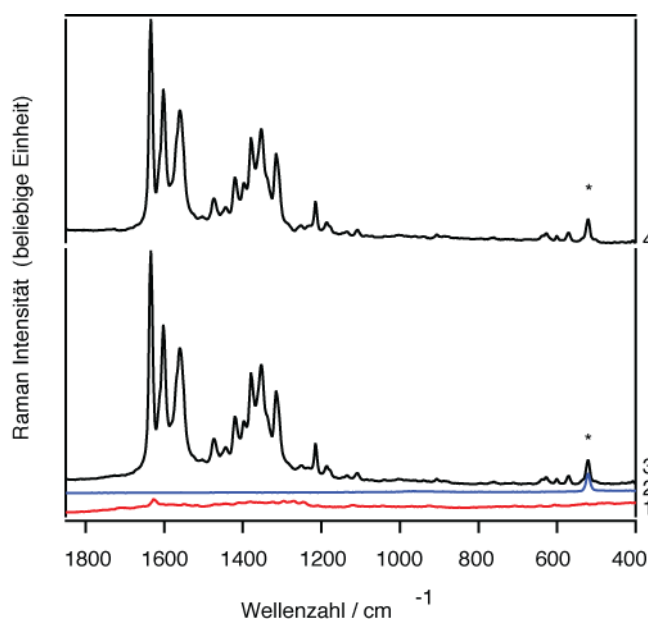


Abbildung 4.28: Raman- und TERS-Spektrum einer HT29-Zelle. Das konventionelle Raman-Spektrum (1) wurde verwendet, um eine Hintergrundkorrektur des gemessenen TERS-Spektrums (3) durchzuführen. (4) Korrigiertes TERS-Spektrum (resultierend aus der Subtraktion von Spektrum 3 - 1). (2) TERS-Kontrollspektrum neben der Zelle auf Glas. Alle Spektren wurden mit 5s aufgenommen. Die Si-Bande der TERS-Spitze ist durch das schwarze Sternchen gekennzeichnet.

Hervorgerufen durch Änderungen in der Probendichte oder durch Veränderungen im AFM-Regelkreis verursachte Abstandsänderungen zwischen Probe und Spitze, können Varianzen in der Intensität des TERS-Signals innerhalb eines mappings auftreten. Um diese Varianzen zu minimieren, wurden alle Spektren einer Vektornormierung unterzogen und anschließend für weitere statistische Auswertungen verwendet.

4.6.2. TERS-Datenanalyse

4.6.2.1. HCA

Mit Hilfe von gängigen statistischen Analysemethoden wie zum Beispiel der HCA war es möglich, die Verteilung einzelner HCA-Cluster innerhalb der analysierten Zelloberfläche darzustellen (Abb. 4.29).

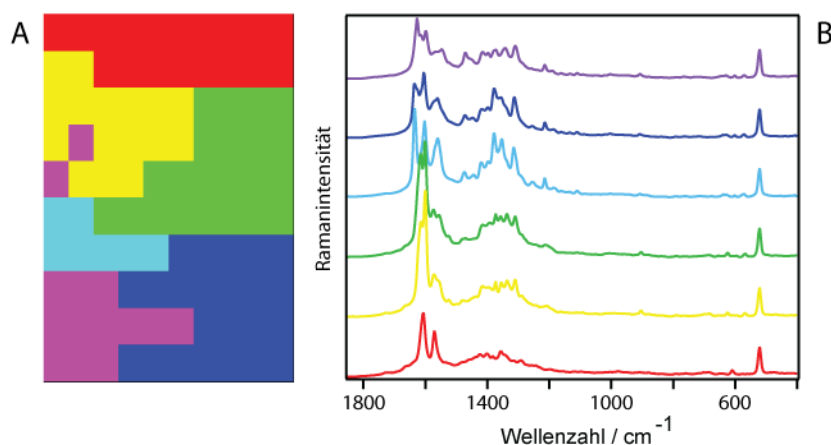


Abbildung 4.29: Darstellung der Verteilung der durch die HCA gewonnenen Cluster (A) und die dazugehörigen Mittelwertsspektren des jeweiligen Gebietes (B).

In diesem Zusammenhang lassen sich deutlich mehrere unterschiedliche Gebiete erkennen. Jedoch ist eine weitere Analyse dieser Daten nicht möglich, da es sich

bei den durch die HCA gewonnenen Spektren um Mittelwertspektren des jeweiligen Clusters handelt. Somit stellen die Spektren ein Signalgemisch mehrerer unterschiedlicher Bestandteile der Zellmembran des jeweiligen Areals dar, wodurch eine Verteilung einer einzelnen Molekülklasse nicht verdeutlicht werden kann.

4.6.2.2. N-FINDR

Die gewünschte Betrachtung einzelner Stoffklassen wird erst durch die Verwendung des N-FINDR-Algorithmusses ermöglicht. Durch das Entmischen des Datensatzes und anhand der dazugehörigen Abundanzwerte lässt sich die Verteilung einzelner Membranbestandteile (Lipid bzw. Protein) analysieren. Eine Differenzierung der ermittelten so genannten „Endmember“ ist auch dann erfolgreich, wenn die Spektren der Endmember nicht optimal entmischt sind und einen geringen Prozentsatz von Signalen einer weiteren Komponente (Lipid bzw. Protein) beinhalten. Dieser Sachverhalt ist zu erwarten, da die in der Zellmembran vorkommenden Proteine von Lipiden umlagert sind²⁴⁸ und aus diesem Grund zu Protein zugeordnete Endmember ein geringes Lipidsignal aufweisen können.

4.6.2.2.1. Bestimmung der korrekten Endmemberanzahl

Bei einer Analyse der Zellmembran mit Hilfe des N-FINDR-Algorithmusses war es das Ziel, die auftretende spektrale Varianz durch eine möglichst geringe Anzahl an Komponenten bzw. Endmembers zu beschreiben. Dies hat den Vorteil, dass nicht jedes Spektrum im Datensatz zugeordnet werden muss sondern

lediglich die gewonnenen Endmemberspektren. Um die zutreffende Anzahl von Endmembers zu bestimmen, wurde zu Beginn - als vorläufige Abschätzung - eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die PCA verdeutlicht, dass 6 Hauptkomponenten bereits 99,5% der spektralen Varianz des Datensatzes abdecken (Abb. 4.30). Dieser Wert dient als unterer Grenzwert für die Bestimmung der Anzahl der Endmember, welche für die N-FINDR-Analyse benötigt wurden.

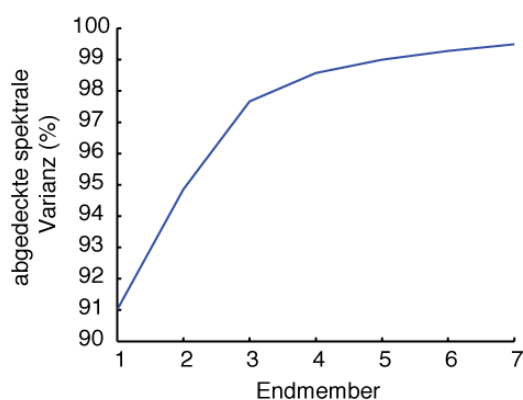


Abbildung 4.30: Graphische Darstellung der abgedeckten spektralen Varianz bei variierender Anzahl von Endmembers.

Als Kriterium für die Bestimmung der endgültigen Endmemberanzahl wurde jedes Endmemberspektrum („output“-Spektrum) mit dem Hintergrundkorrigierten TERS-Spektrum (Rohspektrum) des jeweiligen Messpunktes („input“-Spektrum) verglichen. Ausgehend von 6 Endmembers wurde die Anzahl jeweils um einen weiteren Endmember erhöht, sobald der Vergleich zwischen „output“- und „input“-Spektrum negativ ausfiel. Diese Prozedur wird im Folgenden exemplarisch anhand von 9 Endmembers als Negativbeispiel dargestellt. Abbildung 4.31 verdeutlicht schematisch die Position der einzelnen Endmember in Korrelation zu den Messpunkten der TERS-Messung auf der Zelloberfläche.

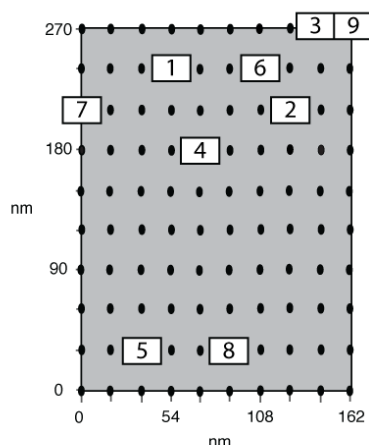


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung der Lage der 9 Endmember innerhalb des analysierten Areals. Alle Endmember sind durchgängig nummeriert und wurden mit dem „input“-Spektrum des jeweiligen Messpunktes verglichen.

Zur Verifizierung der korrekten Anzahl von Endmembern wurden die „output“-Spektren durch die dazugehörigen „input“-Spektren dividiert (Abb. 4.32). Das Ergebniss der Division veranschaulicht deutlich, ob durch die Anwendung des Algorithmusses mit neun Endmembern spektrale Informationen verloren gehen oder nicht. Bei den Endmembern 1 - 3 und 6 zeigt sich deutlich die Kongruenz zwischen den „output“- und den „input“-Spektren. Das aus der Division resultierende Signal beinhaltet mit einer Signalintensität von $<10^{-6}$ keine signifikanten chemischen Informationen. Dahingegen lässt sich deutlich erkennen, dass die Endmemberspektren 4, 5 und 7 - 9 nicht mit den „input“-Spektren übereinstimmen. Die Folge einer solchen Diskrepanz des Signals von bis zu 160 Einheiten, deutet wie bereits erwähnt, auf nicht abgedeckte spektrale Informationen des Datensatzes hin.

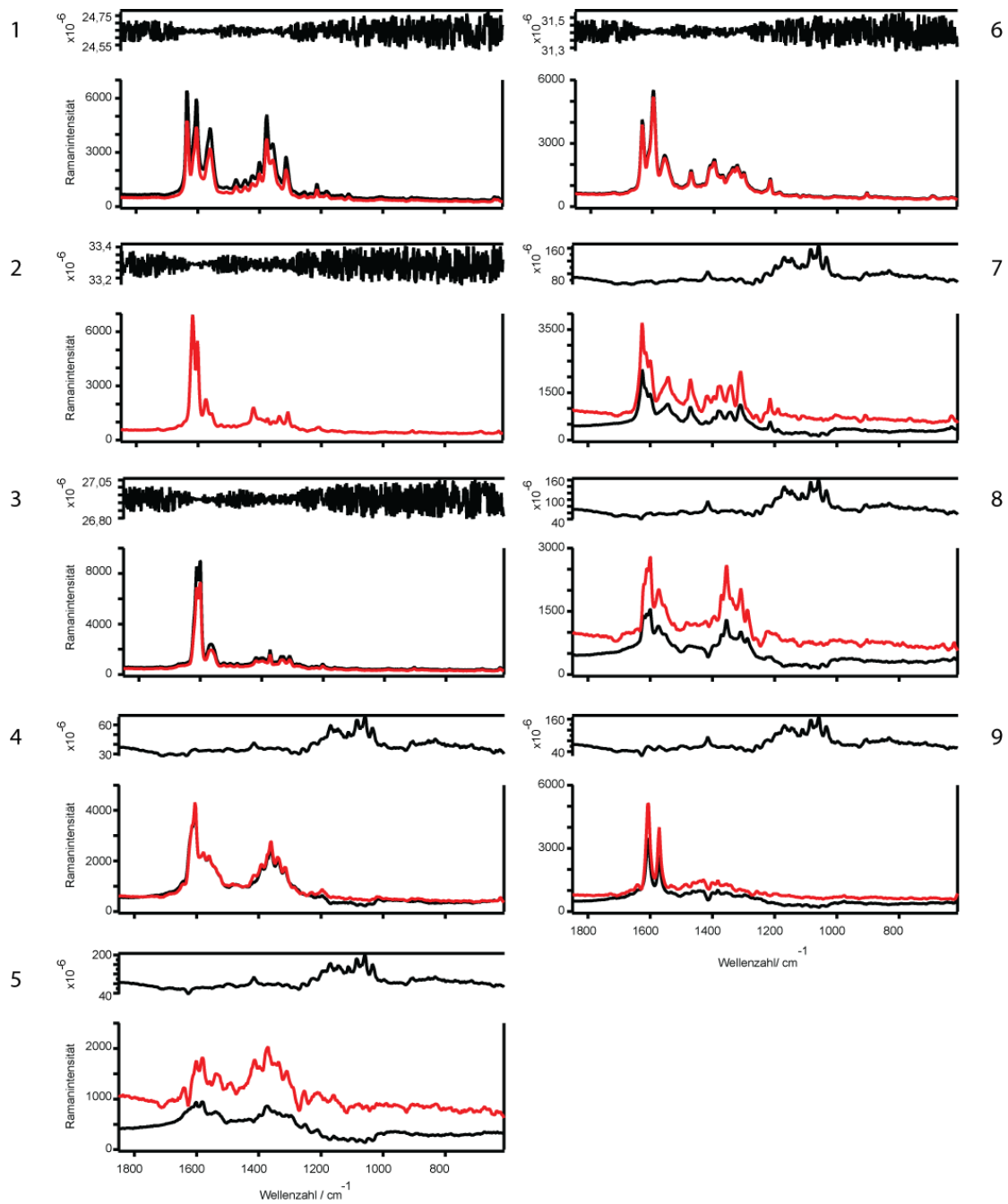


Abbildung 4.32: Verifizierung der Datenanalyse mit 9 Endmembern. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebnis der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 9) am oberen Rand der jeweiligen Graphen.

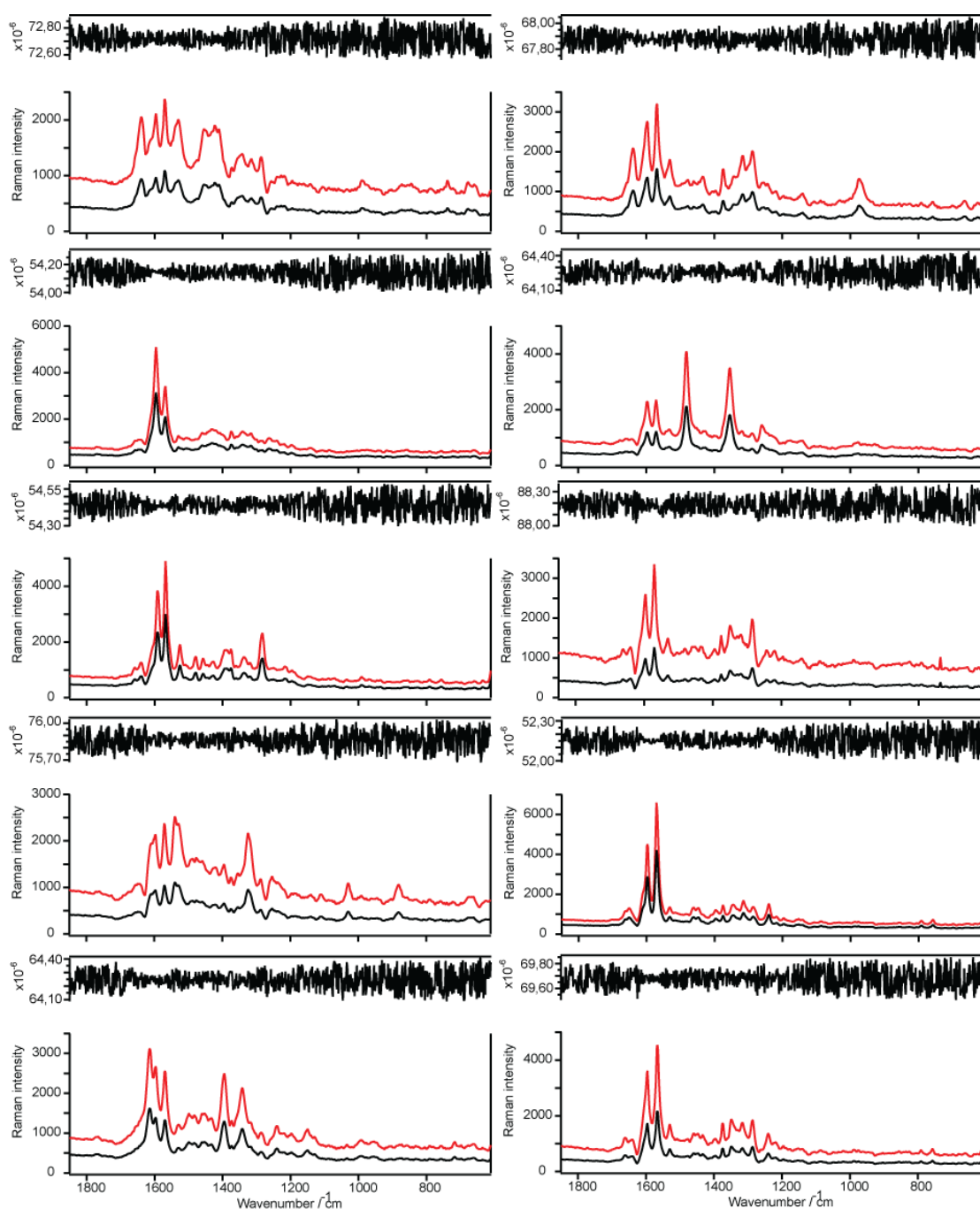


Abbildung 4.33: Positive Validierung der Datenanalyse mit 10 Endmembers. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebnis der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 10) am oberen Rand der jeweiligen Graphen.

Aufgrund der gezeigten Divergenz wurde eine weitere Analyse des Datensatzes mit 10 Endmitgliedern durchgeführt. Wie in Abbildung 4.33 abgebildet, zeichnen sich die gewonnenen Endmemberspektren durch eine hohe Konvergenz mit den „input“-Spektren aus. Keines der erzeugten Divisionsspektren lässt signifikante Informationen erkennen (Intensität $< 0,3 \times 10^{-6}$). Dies bestätigt, dass sich die spektrale Varianz des Datensatzes durch die Verwendung von 10 Endmitgliedern ohne bedeutsamen Informationsverlust erklären lässt.

Als zusätzliches Kriterium zur Bestimmung der korrekten Anzahl der verwendeten Endmember wurden beliebige „input“-Spektren mit den Linearkombinationen der Endmemberspektren verglichen. Abbildung 4.34 veranschaulicht die sich auf zwei Areale ausbreitenden Positionen, welche für diese Validierung ausgesucht worden sind. Beide Areale (rot und blau unterlegt) bestehen aus jeweils neun Messpunkten, wobei es sich bei dem jeweils im Zentrum lokalisierten Messpunkt um einen Endmember handelt (markiert durch rotes bzw. blaues Kreuz). In diesem speziellen Fall bestehen die Linearkombinationen lediglich aus dem jeweiligen Endmemberspektrum. Wie in der Illustration deutlich zu erkennen ist, passen die berechneten Linearkombinationen sehr gut mit den „input“-Spektren überein und bestätigen erneut die Verwendung von 10 Endmitgliedern.

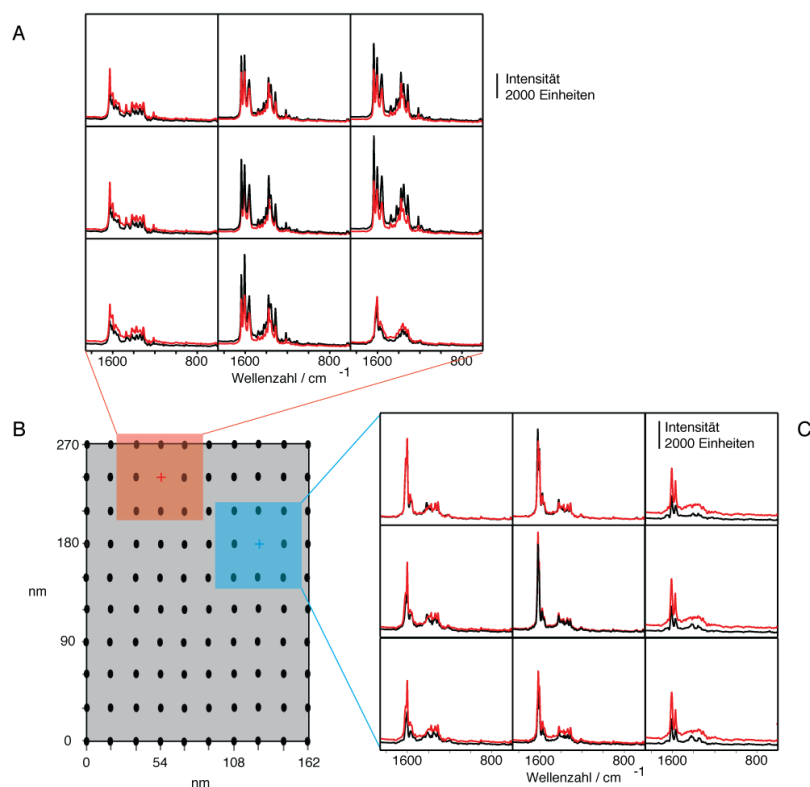


Abbildung 4.34: Schematische Darstellung der Messpunkte und der für die Validierung verwendeten Punkte (B; rot und blau unterlegt). Beide Areale beinhalten einen Endmember (rotes bzw. blaues Kreuz). A+C) Die „input“-Spektren (schwarz) wurden mit den korrelierenden Linearkombinationen (rot) verglichen. Alle Spektren wurden auf die gleiche Intensität skaliert.

4.6.3. Biologische Zuordnung der N-FINDR-Ergebnisse

Die endgültigen Ergebnisse der N-FINDR-Analyse werden in Abbildung 4.35 dargestellt. Neben der Verteilung des jeweiligen Endmembers (A + C) werden hier die dazugehörigen Spektren (B + D) gezeigt. Diese Spektren werden anschließend verwendet, um die ermittelten Endmember verschiedenen Bestandteilen der Zellmembran zuzuordnen. Für diese Zuordnung wurden konventionelle Raman, SERS als auch TERS-Spektren von humanen Zellen und aufgereinigten Zellkomponenten mit den in dieser Arbeit gesammelten TERS-Spektren verglichen.

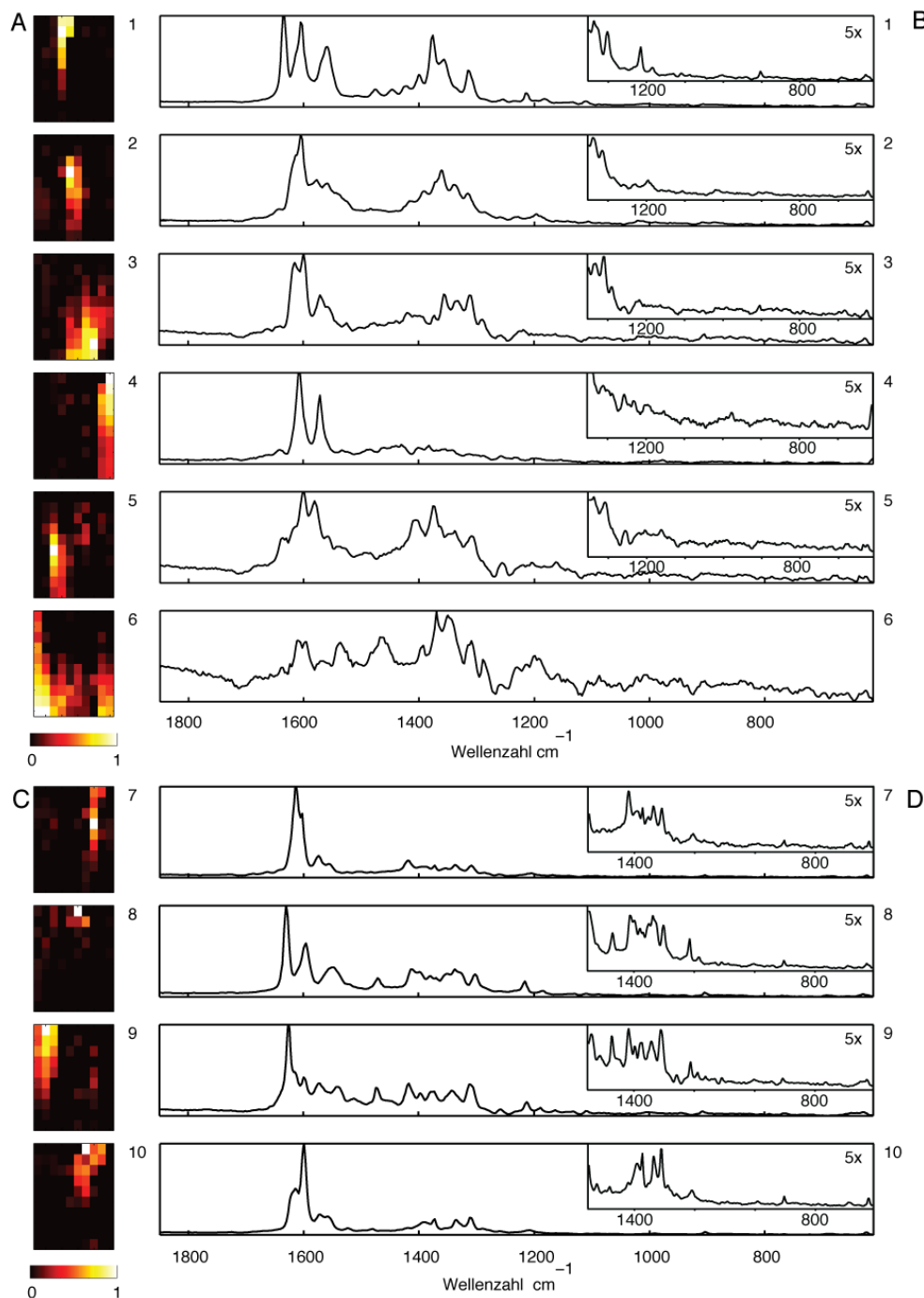


Abbildung 4.35: Illustration der durch die N-FINDR-Analyse bestimmten Endmemberverteilung (A + B) und der TERS-Spektren (B + D) der jeweiligen Endmember. Die Einsätze zeigen zur besseren Veranschaulichung jedes Spektrum vergrößert im Bereich von $1500 - 500\text{cm}^{-1}$.²³

Durch die Betrachtung bekannter Lipid- und Proteinmarkerbanden wurde die Unterscheidung der 10 Endmember bezüglich ihrer Protein- bzw. Lipidzugehörigkeit ermöglicht. Verwendete markante Markerbanden für eine

proteinspezifische Zuordnung sind zum Beispiel die Amid I- ($1663 - 1637 \text{ cm}^{-1}$)^{232,249,250} und die Amid III-Bande. Anhand deren Verschiebung lassen sich zusätzlich Aussagen über die Sekundärstrukturen des vorliegenden Proteins treffen, wie das Vorhandensein von α -Helices, ungeordnete Verknäulungen oder β -Faltblättern^{239,251}. Diese Proteinmarkerbanden lassen sich deutlich in den Spektren 1 – 6 (Abb. 4.35 B) erkennen und ermöglichen die Zuordnung dieser Endmember zur Gruppe der Proteine. Für die Zuordnung der Endmember zu der Gruppe der Lipide können charakteristische Banden der Lipidkopfguppe und des aliphatischen Rests als Marker verwendet werden. Dementsprechend können die symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen des PO_2 in den Lipid zugewiesenen Endmemberspektren beobachtet werden (Spektren 7 – 10, Abb. 4.35 D). So lässt sich zum Beispiel die $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ bei 1087 cm^{-1} und die $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ zwischen $1209 - 1215 \text{ cm}^{-1}$ deutlich in den Spektren erkennen. Die Abwesenheit der bei 758 und 822 cm^{-1} erwarteten Banden der O-P-O-Gruppe lässt sich durch die Orientierung des Moleküls relativ zur TERS-Spitze erklären. Diese kann auch entscheidend für die Signalintensität einzelner Banden sein. So wurde bereits für aromatische Aminosäuren nachgewiesen, dass die Ausrichtung des aromatischen Rings für die Intensität der vermuteten Bande der Ringatmung (Tryptophan 1013 cm^{-1}) ausschlaggebend ist.²⁵² Weitere Lipid-spezifische Signale wie $\nu_s(\text{CH}_3)$ ($1373-1379 \text{ cm}^{-1}$)²⁵³, $\rho_w(\text{CH}_2)$ (1337 cm^{-1})²⁵⁴ und $\rho_t(\text{CH}_2)$ ($1302-1309 \text{ cm}^{-1}$) wurden als Markerbanden eingesetzt. Die in den Spektren 7 – 10 (Abb. 4.35 D) sichtbaren Signale der Estergruppe ($1725 - 1728 \text{ cm}^{-1}$) können ebenso wie die vereinzelt aufgezeichneten Signale von Cholesterol bei $690 - 699 \text{ cm}^{-1}$ ^{218,255,256} als zusätzliche Marker für eine Lipidzuordnung dienen.

Die Zuordnung dieser aufgezählten und weiterer aufgezeichneter Banden können detailliert der Tabelle 4.5 entnommen werden.

Tabelle 4.5: Bandenzuordnung der TERS-Spektren (Kontrollgruppe) Areal A Abb. 4.37

Endmember										Zuordnung
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	227,239-241,243,252-255,257-279
								1765		$\nu_{as}(C=O)$ Lipid
	1686		1727			1728	1725		1725	$\nu_{as}(COOH)$
		1663				1688				Amid I (C=O) β -Faltblatt, $\nu_{as}(COO^-)$, $\nu(C=C)$ Cholesterol
	1643	1640	1640			1663				Amid I α Helix $\nu(C=C)$ aromatisch
1635				1637	1637			1630	1625	Amid I $\nu(C=C)$ aromatisch
		1615				1611	1614			$\nu(C=C)$ aromatisch
1606	1606		1607			1602				$\nu(C=C)$ aromatisch
		1599		1599				1599	1599	Amid II, $\nu(C=C)$ aromatisch, $\delta(NH_3^+)$
				1581		1597		1596		Amid II, $\nu(C=C)$ aromatisch, $\nu_{as}(COO^-)$
	1578									$\nu(C=C)$ aromatisch und Lipid, $\nu(C=N)$ His
		1571	1571				1574		1573	$\nu(C=C)$ Lipid, Amid II
1560	1560									Amid II (NH), $\nu(C=N)$
										Amid II, $\nu(C=C)$ aromatisch
							1556			Amid II
								1548	1540	Amid II
			1533		1537					Amid II, $\nu(C=C)$ aromatisch
		1525					1524			Amid II $\delta(NH)$ Kette der β -Form
										Amid II, $\nu(C=C)$ aromatisch
1506				1494			1502			Amid II, $\nu(C=C)$ aromatisch, $\delta(CH_2, CH_3)$ Lipid
	1484	1478	1483				1483			Amide II, $\nu(C=C)$ aromatisch
1476						1465		1471	1473	Amid II $\tau(NH)$
			1461							$\delta(CH_2), \delta(CH_3)$
			1430							$\delta(CH_2)$
1447										$\delta(CH_2), \delta(CH_3)$
1424		1420					1419			$\nu_{as}(CH_3)$ Lipid, $\nu_s(COO^-)$
	1417							1412	1417	$\nu_s(COO^-)$
1401			1401	1406						$\rho(CH_3)$
										$\nu_{as}(COO^-)$, $\rho(CH_3)$, Lipid
	1391		1383		1392	1392	1392	1397	1397	$\nu_s(CH_3)$
1376		1373		1374		1373	1379	1373	1373	$\nu_s(CH_3)$ Lipid
					1369			1370		$\nu_s(CH_3)$
	1360									$\nu_s(CH_3)$, $\rho_s(CH)$ Trp
1356		1356	1355		1350	1353	1350			$\delta(CH_2)$ Trp
	1340			1339					1342	$\delta(CH_2)$ Lipid
		1332				1337	1337			$\rho_w(CH_2)$ Lipid, $\nu(C=N)$ His
1314	1315	1310	1312						1310	$\rho_w(CH_2)$ Lipid
				1309	1309	1309	1302			$\rho_s(CH_2)$ Lipid, Fettsäure
	1286	1289	1289		1289	1286				Amid III (C-N) α -Helix
1255	1260	1256	1256	1255	1258	1260	1256	1258	1260	Amid III zufällige Anordnung
1235	1228		1232							Amid III β -Faltblatt
1214		1219		1219				1215	1212	$\nu_{as}(PO_2^-)$ Lipid, $\nu_s(CH)$ Tyr
				1204						$\nu(C-C)$, $\rho(C-H)$
	1196					1199				$\rho(NH)$ in-plane
1182								1184	1189	$\rho(C-H)$, $\nu(NCN)$ His
				1163	1160					$\nu(C-O)$, $\rho(COH)$, $\delta(CH)$ Trp (Indol)
			1153							$\nu(CO)$ Lipid der $-CR_2OH$ Gruppe
1133								1130	1133	$\nu(C-C)$ Lipid trans-Kette, $\delta(NH_3^+)$
1110	1107							1109	1110	$\nu(C-C)$ Lipid, $\nu(C=N)$ $\delta(C=H)$ His
						1087		1087		$\nu_s(PO_2^-)$ Lipid
										$\delta(CH)$ Phe in-plane
						1005		1004	1004	$\nu(C-C)$ Phe Ringatmung
		990								$\nu(C-C)$ Protein
			976							$\nu(C-C)$, $\nu(C-N)$ His, $\nu(C-C)$ Rückgrat β -Faltblatt
									945	$\rho(CH_2)$ Lipid, $\nu(C-COO^-)$
933										$\nu(C-C)$ α -Helixrückgrat
907	909	904			904	904	904	907	904	$\nu(C\alpha-C-N)$ (Peptidbindung)
	887									$\nu_s(N^+(Me_3))$ Phosphatidylcholin
								825		$\nu(C-C)$ Tyr, Ringatmung, $\nu_{as}(PO_2^-)$ Lipid
								805		
								790		
								766		CH_2 Lipid
					725					$\nu_s(O-P-O)$ Lipid, CH_2 Lipid
		699								CH_2 Lipid, $\nu_s(N^+(Me_3))$ Phosphatidylcholin
		682						690		$\nu(C-C)$ Ringatmung Cholesterol
				676						
							653			
	639									δ Tyr Ringatmung
				636						Phe
628	623	626		625	628	623	628	628	625	$\delta(NC=O)$ Amid IV, δ Phe Ringatmung

ν strecken, ρ biegen, τ Torsion, δ deformieren, s symmetrisch, as asymmetrisch, t twisting, w wagging, **Phe** Phenylalanin, **Tyr** Tyrosin, **Trp** Tryptophan, **His** Histidin

Resultierend aus der durchgeführten Bandenzuordnung lassen sich sechs Endmemberspektren (Abb. 4.35 1 – 6) Proteinen und vier Endmemberspektren Lipiden zuordnen (Abb. 4.35 7 – 10). Aufgrund der durch den N-FINDR-Algorithmus gelieferten Abundanzwerte lässt sich die Verteilung jedes einzelnen Endmembers mit einer Pixelgröße von 30 x 18nm darstellen.

Die auf diese Weise erzeugten Darstellungen (Abbildung 4.35 A und C) verdeutlichen die Verteilung der Endmember bzw. im Zusammenhang mit der Bandenzuordnung die Verteilung des jeweiligen Protein- oder Lipidclusters auf der Zellmembran. Hierbei korreliert eine Intensitätszunahme mit einer höheren Abundanz.

4.6.4. Variation des TERS-Messbereichs

Um zu verifizieren, dass der gewählte Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten dem räumlichen Auflösungsvermögen der verwendeten TERS-Spitze gerecht wird, wurde innerhalb des bereits diskutierten Areal der Zelloberfläche (Areal A) eine weitere Messung durchgeführt (Areal B). Bei dieser Untersuchung betrug das Messpunktegitter 90 x 90nm. Wie im vorangegangenen Gitter wurden hier 10 x 10 Messpunkte gesetzt, sodass die theoretische räumliche Auflösung bei etwa 10nm lag. Die Ergebnisse der zweiten Untersuchung wurden mit der bereits erwähnten und im vorangegangenen Kapitel diskutierten Prozedur analysiert. Für diese Messung wurden erneut 10 Endmember bestimmt (siehe Anhang Abb. A.8), von denen sechs Endmember Proteinen (1 – 6) und zwei Endmember Lipiden zugeordnet werden konnten

(7 + 8) (siehe Anhang Tab. A.1). Obwohl die gleichen Markerbanden für die Bandenzuordnung verwendet wurden, gestaltete sich bei dieser Messung eine eindeutige Klassifizierung schwierig. So konnten nicht alle Endmember wie in der Untersuchung des Areals A eindeutig in Lipid- oder Proteinklassen eingeteilt werden. Aufgrund vergleichbar stark ausgeprägter Signalintensitäten von sowohl Lipid- als auch von Proteinmarkerbanden konnten die Endmember 9 und 10 nicht zweifelsfrei einer der beiden Gruppen zugeordnet werden (siehe Anhang Tab. A.2). Infolgedessen wurde eine neue dritte Gruppe für die Endmember mit äquivalenten Lipid- und Proteingehalten eingeführt (siehe Anhang Abb. A.9 E und F). Mit Hilfe der Abundanzwerte, einer gegebenen Pixelgröße von 10nm x 10nm und einem Schwellenwert von 70% in Hinblick auf die Abundanzwerte, ließen sich Proteindomänen mit einer Größe von 10nm x 30nm bis hin zu 30nm x 70nm detektieren (Abb. 4.36 A und im Anhang Abb. A.9 A). Dahingegen schwankte die Größe der Lipiddomänen lediglich zwischen 10nm x 40nm und 20nm x 20nm (Abb. 4.36 B und im Anhang Abb. A.9 B).

4.6.5. Verteilung von Lipid- und Proteindomänen innerhalb der

Zellmembran

In Form einer Falsch-Farben-Darstellung wird die Verteilung von Lipid (grün) und Protein (rot) innerhalb der beiden untersuchten Areale A und B in Abbildung 4.36 illustriert. In dieser Abbildung korreliert die Intensität der Farben mit den Abundanzwerten der jeweiligen Messung. Dargestellte Mischfarben repräsentieren Übergangszonen zwischen den jeweiligen

Komponenten. Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erörtert, wurde für Areal B eine weitere Gruppe (blau) für Domänen mit gleich gewichtetem Lipid- und Proteingehalt eingebracht. Obwohl beide Messungen unter Verwendung dergleichen Prozedur analysiert worden sind, fallen Unterschiede zwischen beiden Messungen auf. Es lässt sich deutlich erkennen, dass beide Areale nicht vollkommen übereinstimmen. So werden in Areal B Lipide identifiziert, während in Areal A im selben Abschnitt Proteine charakterisiert worden sind. Diese Beobachtung kann als Resultat einer Unterabtastung („undersampling“) der Probe angesehen werden. Dies bedeutet, dass der für die Untersuchung des Areals A verwendete Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten nicht dem räumlichen Auflösungsvermögen der TERS-Spitze entsprach. In diesem Fall besaß die Spitze eine höhere räumliche Auflösung als die Distanz zwischen den einzelnen Messpunkten. Dies hatte zur Folge, dass Informationen zwischen den einzelnen Messpunkten fehlten. Dementsprechend kann Areal A eher als Übersichtskarte angesehen werden.

Um eine vollständige Untersuchung der Zelloberfläche zu gewährleisten, ist es somit notwendig, die Distanz zwischen den einzelnen Messpunkten zu verringern, da eine künstlich erzeugte Verringerung der räumlichen Auflösung wie bei der herkömmlichen Mikroskopie bei TERS nicht möglich ist. Die in Areal B gewählten Abstände zwischen den einzelnen Messpunkten von 10nm setzen eine Ortsauflösung von 10 - 20nm der verwendeten TERS-Spitze voraus und decken sich mit theoretischen Werten²⁸⁰. Diese Tatsache muß bei weiteren TERS-Messungen beachtet werden, da sich sonst anstelle einer vollständigen

Kartierung der untersuchten Zelloberfläche nur eine punktuelle Übersichtsabbildung erstellen lässt.

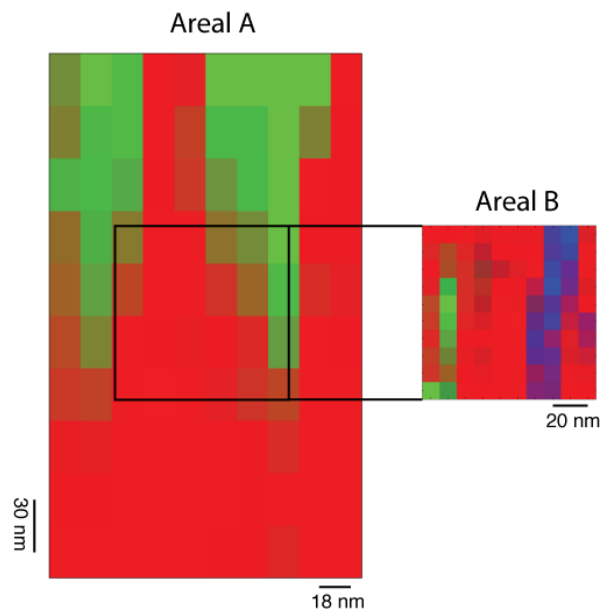


Abbildung 4.36: Verteilung von Domänen mit hohem Lipid- (grün) und Proteingehalt (rot) auf der Zellmembran. Areal B (90 x 90nm) stellt einen erneut gemessenen Ausschnitt mit verringertem Messpunktabstand von Areal A (270 x 162nm). Blau kennzeichnet Domänen mit vergleichbarem Protein- und Lipidgehalt.²³

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der hier verwendeten Methoden eine Charakterisierung der Zellmembran ermöglicht wird. Dabei lassen sich Protein- und Lipiddomänen innerhalb der untersuchten Zelloberfläche identifizieren und deren Verteilung graphisch darstellen. Infolgedessen stellt TERS eine markerfreie, nicht- destruktive Methode dar, mit welcher die Zusammensetzung zellulärer Membranen mit einer Ortsauflösung von <10nm untersucht werden kann. Eine Detektion von Veränderungen innerhalb der Zellmembranzusammensetzung - zum Beispiel hervorgerufen durch die Einlagerung von Proteinen in „lipid rafts“ - sollte somit möglich sein.

Im nächsten Schritt sollte experimentell überprüft werden, ob TERS für die Untersuchung der zellulären Antwort auf die Behandlung mit LPS bezüglich Protein- und Lipidverteilung geeignet ist. Aufgrund der bekannten Varianz der Proteingröße von 6nm bis 100nm²⁸¹ und der Ähnlichkeit der spektralen Signale im Ramanspektrum von unterschiedlichen Proteinuntereinheiten ist zum jetzigen Zeitpunkt eine weitere Unterteilung der Proteinkomposition innerhalb der untersuchten Zelloberfläche nicht durchführbar. Die spektralen Eigenschaften von nativen Membranproteinen sind noch nicht untersucht worden und eine Referenzdatenbank ist nicht existent. Für detaillierte Analysen in Hinsicht auf eine Einzelproteinverteilung innerhalb der Zellmembran ist es jedoch notwendig auf eine Referenzdatenbank zurückgreifen zu können oder diese im Vorfeld aufzubauen.

4.6.6. Untersuchung LPS-behandelter Zellmembran

Für die Untersuchung LPS induzierter Veränderung der Zellmembran wurden TERS-Messungen auf einer mit LPS behandelten HT29-Zelle durchgeführt. Die Probenpräparation wurde wie bereits erörtert durchgeführt. Die zu Beginn der TERS-Messung aufgenommene Topographie der Zelle wird in Abbildung 4.37 dargestellt. Die Zelle besaß in etwa eine Größe von 13 x 13 µm und eine Höhe von 8,2µm. Wie bei den vorangegangenen Messungen und wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, wurden die TERS-Messungen mit der selben Prozedur aufgezeichnet und analysiert. Lediglich die Messdauer jedes Spektrums wurde aufgrund der geringeren Signalverstärkung auf 30s erhöht.

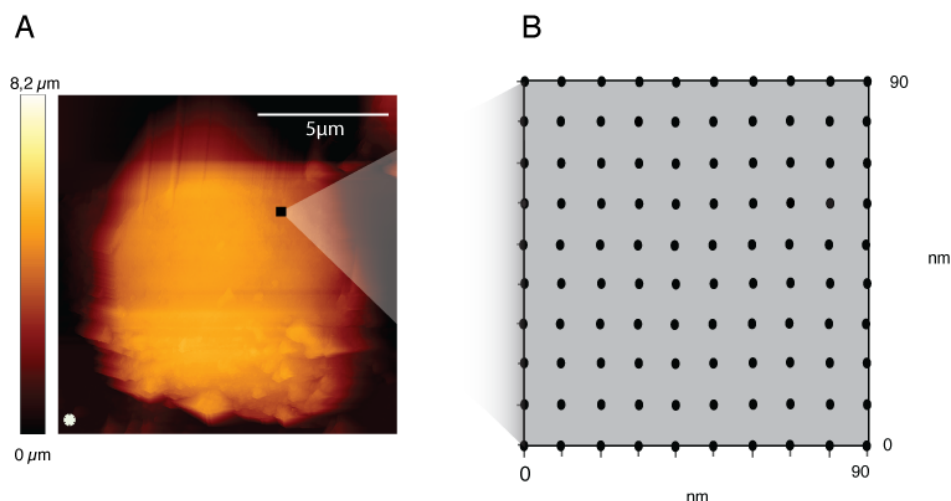


Abbildung 4.37: A) AFM-Topographie einer mit LPS behandelte HT29-Zelle fixiert auf Deckgläschen (13µm x 13µm). Das mit TERS untersuchte Gebiet auf der Zelloberfläche wird durch das schwarze Quadrat veranschaulicht. Der Ort, an dem die Kontaminationskontrolle durchgeführt wurde, wird durch das weiße Sternchen gekennzeichnet. B) Das gesetzte Messgitter besteht aus 10 x 10 Messpunkten auf einer Fläche von 90nm x 90nm.

Unter Berücksichtigung der erwähnten Ortsauflösung von TERS-Spitzen wurde ein Bereich von 90 x 90nm mit 10 x 10 Messpunkten untersucht (Areal C). Dies entspricht einem Messpunktabstand von 10nm. Wie bei den vorherigen TERS-Messungen (Areal A und B) wurden hier 10 Endmember für die Analyse durch den N-FINDR-Algorithmus ermittelt (siehe Anhang Abb. A10). Die Ergebnisse der N-FINDR-Analyse und die darauffolgende Bandenzuordnung (siehe Anhang Abb. A.11 und Tab. A.2) zeigten das Vorhandensein von sieben Protein-, zwei Lipiddomänen und einen Bereich mit vergleichbarem Lipid- und Proteingehalt. Wie bei der Untersuchung des Areals B der unbehandelten Zelle war es erforderlich, diese dritte Mischdomäne einzuführen. Eine Falsch-Farben-Karte des untersuchten Areals C ermöglicht eine Untersuchung der Zellmembranbeschaffenheit der Kontrollgruppe und der mit LPS behandelten Gruppe (Abb. 4.38).

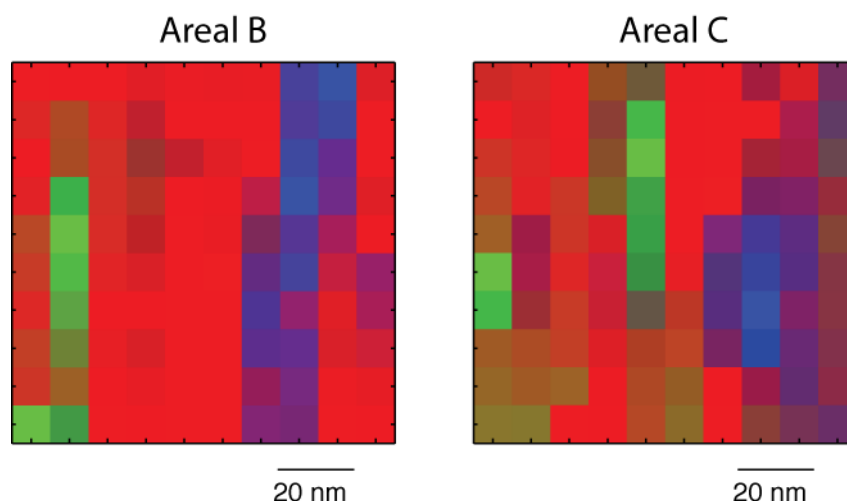


Abbildung 4.38: Verteilung von Domänen mit hohem Lipid- (grün) und Proteingehalt (rot) auf der Zellmembran der Kontrollgruppe (Areal B) und der LPS-behandelten Gruppe (Areal C). Beide Messungen entsprechen 90 x 90nm. Blau gekennzeichnet sind Domänen mit gleichem Protein- und Lipidgehalt.

Bei der Untersuchung der Areale B (Kontrollgruppe) und C (LPS-behandelte Gruppe) lässt sich erneut die Verteilung von Domänen mit hohem Lipid- (grün) bzw. hohem Proteingehalt (rot) beobachten. Beide Areale zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Domäne mit gleichermaßen hohem Lipid- und Proteingehalt aus (blau). Eine aussagekräftige Veränderung innerhalb der untersuchten Areale lässt sich jedoch nicht feststellen. So konnten zum Beispiel „lipid rafts“ in keiner der beiden Messungen lokalisiert werden, da weder in Areal B noch in Areal C die für „lipid rafts“ typischen Membrankomponenten Cholesterol und Spingolipide^{32,282} signifikant nachgewiesen werden konnten. Auch die für die LPS-induzierte Proteineinlagerung⁷¹ zu erwartenden größeren Proteindomänen konnten in Abbildung 4.38 nicht beobachtet werden. Eine vorliegende Dynamik innerhalb der Zellmembran kann bei diesen Untersuchungen außer Acht gelassen werden, da die Fixierung der Zelle die interne Struktur der Zelle aufrecht erhält und die Bewegung zellulärer

Bestandteile verhindert^{283,284}. Beobachtete Effekte der Fixierung wie Variationen in der Signalintensität⁵⁵ oder leichte Verschiebung der Bandenlage²³⁷ sind aus Untersuchungen mit konventionellem Raman bekannt, besitzen jedoch nicht genügend Auswirkung, um die bei diesen TERS-Messungen gewonnenen Ergebnisse zu beeinflussen. Da die hier untersuchten Areale lediglich einen Bruchteil der gesamten Zelloberfläche repräsentieren, lassen sich kaum Aussagen über die Gesamtzelloberfläche treffen. Aufgrund der Inhomogenität der Zelloberfläche, der hohen Ortsauflösung des TERS-Systems und der benötigten Messzeit pro Messpunkt ist es bisher nicht möglich, die gesamte Zelloberfläche zu charakterisieren. Um eine 10µm große Zelle vollständig zu erfassen, bräuchte man 10^6 Punkte mit einem Abstand von 10nm. Bei einer derzeit verwendeten Belichtungszeit von 10-20s pro Punkt, bedeutet dies eine geschätzte Gesamtmessdauer von ca 10 Tagen (ohne Verfahrzeit der Spitze). Da das AFM eine Drift von ca. 1nm/h aufweist, kann eine derartige Messung nicht mehr als aussagekräftig gelten. Resultierend kann gesagt werden, dass bei derart großen Proben TERS derzeit an seine Grenzen stößt. Realisierbar werden solche Projekte erst durch die Verbesserung der Verstärkungswirkung der TERS-Spitzen.

5. Zusammenfassung & Ausblick

Variationen der Lipid- und Proteinkomposition menschlicher Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. Um die hierbei vorherrschenden komplexen biochemischen und stoffwechselphysiologischen Abläufe besser verstehen zu können, sind bislang zeitaufwändige und umfangreiche Untersuchungen notwendig. Ziel dieser Arbeit ist es, schwingungsspektroskopische Methoden (IR, Raman, CARS, TERS) für diese Untersuchungen zu verwenden und das Potential der Schwingungsspektroskopie auf diesem Gebiet aufzuzeigen. Hierbei sollten krankheitsbedingte Veränderungen an Darmkrebszellen der Zelllinie HT29 nicht nur globulär aufgedeckt sondern auch markerfrei und hoch orts aufgelöst lokalisiert und charakterisiert werden.

Es soll weiterhin gezeigt werden, dass der medizinischen Forschung neue Untersuchungsmethoden zur Verfügung stehen, welche die herkömmlichen Verfahren ergänzen oder im Idealfall sogar ersetzen können. Bei den herkömmlichen biologischen Standardmethoden handelt es sich um quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) und konventionelle Fluoreszenzmikroskopie. Vibrationsspektroskopische Messverfahren wie Infrarot- (IR), Raman-, kohärente anti-stokes-Raman- (CARS) und spitzenverstärkte Ramanspektroskopie (TERS) besitzen im Zusammenhang mit multivariaten statistischen Datenanalysemethoden wie Hauptkomponentenanalyse (PCA), support vector machine (SVM) und N-FINDR enormes Potential.

Für die Untersuchung von Krankheiten auf zellulärer Ebene ist die Etablierung eines geeigneten Zellmodells von entscheidender Bedeutung. Durch Zellmodelle werden zum einen aufwändige Tests an Patienten umgangen und zum anderen die Früherkennung von Krankheiten ermöglicht. Da Zellmodelle per se nicht das gewünschte Krankheitsbild besitzen, ist es notwendig, Krankheiten wie zum Beispiel Infektionen zu induzieren. Als Stimulator hierfür werden oftmals Endotoxine wie das in dieser Arbeit verwendete Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt. Es ist bekannt, dass LPS sowohl Auswirkungen auf den Lipid/Proteingehalt der Zelle hat als auch auf die Lokalisierung und Aktivität von Membranproteinen (z. B. Integrine). Da diese Änderungen auf globaler als auch auf Einzelproteinebene den in dieser Arbeit geltenden Anforderungen an die Probe entspricht, wurde dieses LPS-induzierte Zellmodell für alle Messungen verwendet. Die Untersuchungen des Zellmodells HT29 mit Hilfe von PCR verifiziert die gewünschte Induzierung von Signalkaskaden zur Aktivierung und Einlagerung von Integrinen in sogenannte Lipid rafts. Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse der PCR-Untersuchung eine LPS-induzierte Veränderung des Gesamtproteingehaltes der Zellen. Rückschlüsse auf eine Modulation der Lipidkomposition können aus den Ergebnissen dieser Methode nicht gewonnen werden, da sie ausschließlich auf die Expressionsveränderung von Protein beschränkt ist.

Die in dieser Arbeit eingesetzten schwingungsspektroskopischen Methoden IR, Raman und CARS hingegen ermöglichen in Kombination mit der PCA und SVM eine simultane Untersuchung der globalen Veränderungen im Protein- als auch im Lipidgehalt der Zelle. Vor allem die IR-Untersuchten lieferten statistisch

greifbare Ergebnisse über die zellulären Veränderungen. Des Weiteren sind Tendenzen bezüglich einer LPS-induzierten Umgestaltung der Lipide in ihrem Sättigungsgrad auf globulärer Ebene durch die Raman- und CARS-Ergebnisse beschrieben worden.

Das Novum bei den hier durchgeführten Untersuchungen liegt in der Tatsache, dass es sich hier nicht um Zellen unterschiedlicher Linien, Typen oder Geweben handelt. Es handelt sich hier ausschließlich um Zellen ein und derselben Zelllinie, welche aufgrund ihrer Homogenität in Morphologie und zellulären Komposition kaum voneinander abweichen. Diese minimalen LPS-induzierten Unterschiede können Dank der verwendeten Kombination von IR-Spektroskopie mit PCA und Raman-Spektroskopie mit SVM erstmalig verdeutlicht werden. Ferner kann eine statistische Klassifizierung zwischen LPS-behandelten und unbehandelten Zellen erfolgreich erreicht werden, welche in der Literatur gängigerweise nur zwischen unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt wird.

Für die Lokalisierung von Einzelproteinen und deren Veränderung nach einer Behandlung mit LPS wurden neben TERS zum Vergleich konventionelle Fluoreszenzspektroskopie mit fluoreszenzmarkierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpern verwendet. Obwohl diese Art der Fluoreszenzmikroskopie eine der gängigsten Methoden in der Biologie darstellt, verdeutlichen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zugleich die physikalische Limitierung dieser Technik. Die Größe der zu untersuchenden Proteinstrukturen sind mit der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie aufgrund des vorliegenden Beugungslimits räumlich nicht darstellbar. Weiterentwicklungen der Fluoreszenzspektroskopie wie „Stimulated Emission Depletion“ (STED),

„Stochastic Optical Reconstruction Microscopy“ (STORM) und „Photoactivated Localization Microscopy“ (PALM) ermöglichen mittlerweile die Darstellung von Strukturen weit unterhalb des Beugungslimits. Diese hochtechnischen, anspruchsvollen Verfahren sind jedoch noch immer auf die Verwendung von fluoreszierenden Markermolekülen angewiesen. Dies funktioniert für die Betrachtung von größeren Strukturen weitestgehend einwandfrei. Bei kleineren Strukturen wird dies jedoch schwierig, da die Verwendung von Markermolekülen, die oft um ein Vielfaches größer sind als die eigentliche Zielstruktur, die Ergebnisse verfälscht. Ferner muss im Vorfeld bekannt sein, welches Molekül markiert und beobachtet werden soll.

Bei TERS hingegen fungiert die Zielstruktur selbst als Marker und die Ortsauflösung des Systems wird lediglich durch die Beschaffenheit der verwendeten TERS-Spitze definiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten TERS-Messungen verdeutlichen die hohe Ortsauflösung dieser Messmethode. Erstmals konnte hochortsaufgelöst ein Teil einer Zellmembran untersucht und durch die statistische Validierung mit Hilfe von N-FINDR die Oberfläche kartiert werden. So konnten erstmals markerfrei in der Zellmembran vorhandene Lipidareale und Proteine mit einer lateralen Auflösung von 10nm abgebildet werden. Obwohl auf diese Weise die Lokalisierung von Einzelproteinen ermöglicht wird, konnten die TERS-Messungen an dem LPS-induzierten Zellmodell keine Unterschiede detektieren. Hervorgerufen durch die derzeit recht langen Messzeiten im 5-30s-Bereich ist die Größe der untersuchten Zelloberflächen begrenzt. Aufgrund dieser Tatsache ist eine generelle Aussage über die Beschaffenheit der gesamten Zelloberfläche mit Hilfe der

durchgeführten Messungen statistisch noch nicht möglich. Um TERS als Messmethode für die Untersuchung und Kartierung von Zelloberflächen zu verwenden sind Verbesserungen der TERS-Spitzen bezüglich räumlicher Auflösung, Signaleffizienz und insbesondere Signalintensität notwendig. Mögliche Ansätze dies umzusetzen wäre eine künstliche Verringerung der Ortsauflösung durch ein definiertes Bewegen der Spitze während der Messung. Eine Möglichkeit die Signalintensität zu steigern, wäre die Kombination aus TERS und CARS (TCARS), welche die Ortsauflösung von TERS mit der Signalintensität von CARS vereint. Dies würde allerdings einen erheblichen experimentellen Mehraufwand bedeuten.

Obwohl noch Spielraum für Verbesserungen vorhanden ist, zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass die Kombination aus schwingungsspektroskopischen Messmethoden und multivariaten statistischen Analysemethoden ein sehr potentiell Werkzeug für die hoch ortsaufgelöste Untersuchung und Charakterisierung von komplexen biologischen Probenoberflächen darstellt.

6. Referenzliste

1. Devaux, P.F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**, 1163–1173 (1991).
2. Camilli, A. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* **311**, 1113–1116 (2006).
3. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331–340 (1997).
4. Kholodenko, B.N. Cell Signaling Dynamics in Time and Space. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 165–176 (2006).
5. Mosenden, R. & Taskén, K. Cyclic AMP-mediated immune regulation--overview of mechanisms of action in T cells. *Cellular Signalling* **23**, 1009–1016 (2011).
6. Chevalier, E., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E.L. & Matton, D.P. Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization. *New Phytol.* **192**, 13–28 (2011).
7. Petrie, H.T. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 859–866 (2003).
8. Mariani, S.A., Vicenzi, E. & Poli, G. Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4(+) T lymphocytes. *J. Transl. Med.* **9**, S8 (2011).
9. Millar, R.P. Outside-In and Inside-Out Signaling: The New Concept that Selectivity of Ligand Binding at the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Is Modulated by the Intracellular Environment. *Endocrinology* **145**, 3590–3593 (2004).
10. Kenakin, T. Agonist-receptor efficacy II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 232–238 (1995).
11. Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. & Mauriello, G. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addiction of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2745–2749 (2006).
12. Decker, L., Baron, W. & Ffrench-Constant, C. Lipid rafts: microenvironments for integrin-growth factor interactions in neural development. *Biochem. Soc. T.* **32**, 426–430 (2004).
13. Dettmer, K., Aronov, P.A. & Hammock, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 51–78 (2007).
14. Lima, E. & Abdalla, D. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta* **465**, 81–91 (2002).
15. Avni, T., Leibovici, L. & Paul, M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 665–670 (2011).
16. Chen, T.-W., Lin, B.-J., Brunner, E. & Schild, D. In situ background estimation in quantitative fluorescence imaging. *Biophys. J.* **90**, 2534–2547 (2006).

17. Heider, E.C., Peterson, E.M., Barhoum, M., Gericke, K.-H. & Harris, J.M. Quantitative fluorescence microscopy to determine molecular occupancy of phospholipid vesicles. *Anal. Chem.* **83**, 5128–5136 (2011).
18. Hell, S.W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780–782 (1994).
19. Rust, M.J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–796 (2006).
20. Hell, S.W. Far-field optical nanoscopy. *Science* **316**, 1153–1158 (2007).
21. Schieker, M. et al. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J. Anat.* **210**, 592–599 (2007).
22. Synge, E. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philos. Mag.* **6**, 356–362 (1928).
23. Richter, M., Hedegaard, M., Deckert-Gaudig, T., Lampen, P. & Deckert, V. Laterally Resolved and Direct Spectroscopic Evidence of Nanometer-Sized Lipid and Protein Domains on a Single Cell. *Small* **7**, 209–214 (2011).
24. Adams, F., Van Vaeck, L. & Barrett, R. Advanced analytical techniques: platform for nano materials science. *Spectrochim. Acta B* **60**, 13–26 (2005).
25. Deckert-Gaudig, T. & Deckert, V. Tip-enhanced Raman scattering (TERS) and high-resolution bio nano-analysis-a comparison. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 12040–12049 (2010).
26. Schmid, T., Yeo, B.-S., Leong, G., Stadler, J. & Zenobi, R. Performing tip-enhanced Raman spectroscopy in liquids. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 1392–1399 (2009).
27. *Animal_cell_structure_en.svg* (Quelle unterliegt der Gemeinfreiheit). (Mariana Ruiz Villarreal:).at
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_cell_structure_en.svg>
28. *POPC_detail* (Quelle unterliegt der Gemeinfreiheit). (Foobar:).at
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/e/ee/20110726120224%21Popc_details.svg>
29. Vereb, G. et al. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8053–8058 (2003).
30. *membrane_detailed_diagram_de.svg* (Quelle unterliegt der Gemeinfreiheit). (Mariana Ruiz Villarreal:).at
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_en.svg>
31. Pike, L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598 (2006).
32. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 31–39 (2000).

33. Bang, B., Gniadecki, R. & Gajkowska, B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Experimental Dermatology* 266–272 (2005).
34. Langlet, C., Bernard, A., Drevot, P. & He, H. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 250–255 (2000).
35. Tansey, M., Baloh, R., Milbrandt, J. & Johnson, E. GFR alpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* **25**, 611–623 (2000).
36. Waugh, M., Lawson, D. & Hsuan, J. Epidermal growth factor receptor activation is localized within low-buoyant density, non-caveolar membrane domains. *Biochem. J.* **337**, 591–597 (1999).
37. Mastick, C., Brady, M. & Saltiel, A. Insulin Stimulates the Tyrosine Phosphorylation of Caveolin. *J. Cell Biol.* **129**, 1523–1531 (1995).
38. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**, 673 (2002).
39. Lacy-Hulbert, A. et al. Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid alpha v integrins. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 15823–15828 (2007).
40. Iao, T., Takagi, J., Collier, B., Wang, J. & Springer, T. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **432**, 59–67 (2004).
41. Nishida, N. et al. Activation of leukocyte beta(2) integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* **25**, 583–594 (2006).
42. Vinogradova, O. et al. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**, 587–597 (2002).
43. Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. & Kinashi, T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Immunol.* **4**, 741–748 (2003).
44. Critchley, D. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem. Soc. T.* **32**, 831–836 (2004).
45. Walker, J., Fournier, A. & Assoian, R. Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **16**, 395–405 (2005).
46. Beer, A.J. & Schwaiger, M. Imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Cancer Metast. Rev.* **27**, 631–644 (2008).
47. Andrews, E.J., Wang, J.H., Winter, D.C., Laug, W.E. & Redmond, H.P. Tumor cell adhesion to endothelial cells is increased by endotoxin via an upregulation of beta-1 integrin expression. *J. Surg. Res.* **97**, 14–19 (2001).
48. Hamm, C. Anti-integrin therapy. *Annu. Rev. Med.* **54**, 425–435 (2003).
49. Rice, G., Hartung, H. & Calabresi, P. Anti-alpha 4 integrin therapy for multiple sclerosis - Mechanisms and rationale. *Neurology* **64**, 1336–1342 (2005).

50. Ferkolj, I., Ihan, A., Markovic, S., Veceric, Z. & Pohar, M. Infliximab reduces the number of activated mucosal lymphocytes in patients with Crohn's disease. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **15**, 231–235 (2006).
51. Feagan, B. et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha(4)beta(7) integrin. *New Engl. J. Med.* **352**, 2499–2507 (2005).
52. Kang, S.S. et al. An Antibiotic-Responsive Mouse Model of Fulminant Ulcerative Colitis. *PLoS Med.* **5**, 0424–0439 (2008).
53. Desgrosellier, J.S. et al. An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat. Med.* **15**, 1163–1170 (2009).
54. Hortelano, S. et al. ILK mediates LPS-induced vascular adhesion receptor expression and subsequent leucocyte trans-endothelial migration(dagger). *Cardiovasc. Res.* **86**, 283–292 (2010).
55. Mariani, M.M., Lampen, P., Popp, J., Wood, B.R. & Deckert, V. Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy. *Analyst* **134**, 1154–1161 (2009).
56. Worth, D.C. et al. α 3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. *J. Cell Biol.* **189**, 369–383 (2010).
57. Robinson, S.D. et al. α v β 3 Integrin Limits the Contribution of Neuropilin-1 to Vascular Endothelial Growth Factor-induced Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 33966–33981 (2009).
58. Saegusa, J. et al. The Direct Binding of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) to Integrin α 3 Is Involved in IGF-1 Signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 24106–24114 (2009).
59. Reynolds, A.R. et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat. Med.* **15**, 392–400 (2009).
60. Pande, G. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 569–574 (2000).
61. Kinbara, K., Goldfinger, L., Hansen, M., Chou, F. & Ginsberg, M. Ras GTPases: Integrins' friends or foes? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 767–776 (2003).
62. Hallatschek, W. *Die Regulation des humanen Lipopolysaccharid bindenden Proteins (hLBP)*. 126 (Dissertation: 2004).
63. Nizet, V. & Esko, J. Essentials of Glycobiology: Bacterial and Viral Infections. *Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd edition*, (2009).
64. Ortega, M.G., Saragusti, A.C., Cabrera, J.L. & Chiabrando, G.A. Quercetin tetraacetyl derivative inhibits LPS-induced nitric oxide synthase (iNOS) expression in J774A.1 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **498**, 105–110 (2010).
65. Guo, H., Cai, C.Q., Schroeder, R.A. & Kuo, P.C. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J. Immunol.* **166**, 1079–1086 (2001).
66. Wai, P.Y. & Kuo, P.C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metast. Rev.* **27**, 103–118 (2008).

67. O'Regan, A. & Berman, J. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* **81**, 373–390 (2000).
68. Rangaswami, H., Bulbule, A. & Kundu, G. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* **16**, 79–87 (2006).
69. Lee, J.-L. et al. Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms: OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 2089–2097 (2007).
70. Denhardt, D., Noda, M., O'Regan, A., Pavlin, D. & Berman, J. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.* **107**, 1055–1061 (2001).
71. Lee, J.-L., Wang, M.-J., Sudhir, P.-R. & Chen, J.-Y. CD44 engagement promotes matrix-derived survival through the CD44-Src-integrin axis in lipid rafts. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5710–5723 (2008).
72. Li, R. et al. Activation of integrin alpha IIb beta 3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**, 795–798 (2003).
73. Ye, F. et al. Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J. Cell Biol.* **188**, 157–173 (2010).
74. Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 288–300 (2010).
75. Brown, E. Integrin-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 603–607 (2002).
76. Saiki, R. et al. Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**, 1350–1354 (1985).
77. Pietraszewska-Bogiel, A. & Gadella, T.W.J. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology. *J. Microsc. - Oxford* **241**, 111–118 (2011).
78. Gudmundsson, B., Bjarnadottir, H., Kristjansdottir, S. & Jonsson, J. Quantitative assays for Maedi-visna virus genetic sequences and mRNA's based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology* **307**, 135–142 (2003).
79. Forster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys. - Berlin* **2**, 55–75 (1948).
80. Lassauniere, R., Kresfelder, T. & Venter, M. A novel multiplex real-time RT-PCR assay with FRET hybridization probes for the detection and quantitation of 13 respiratory viruses. *J. Virol. Methods* **165**, 254–260 (2010).
81. Jung, J. et al. Fast and sensitive DNA analysis using changes in the FRET signals of molecular beacons in a PDMS microfluidic channel. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 2609–2615 (2007).
82. Santangelo, P., Nix, B., Tsourkas, A. & Bao, G. Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, e57 (2004).

83. Jothikumar, P., Hill, V. & Narayanan, J. Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control. *Biotechniques* **46**, 519–+ (2009).
84. Calero, O., Hortigueela, R., Bullido, M.J. & Calero, M. Apolipoprotein E genotyping method by Real Time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan (R) and FRET assays. *J. Neurosci. Meth.* **183**, 238–240 (2009).
85. Nygard, A.-B., Jorgensen, C.B., Cirera, S. & Fredholm, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* **8**, 67 (2007).
86. Jor, E., Myrmel, M. & Jonassen, C.M. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *J. Virol. Methods* **169**, 1–7 (2010).
87. Pfaffl, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2002–2007 (2001).
88. Cyplik, P. et al. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresource Technol.* **102**, 4347–4352 (2011).
89. Veeriah, S. et al. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinogen.* **45**, 164–174 (2006).
90. Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M. & Shinmoto, H. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Brit. J. Pharmacol.* **150**, 209–219 (2007).
91. Angrisano, T. et al. LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol.* **10**, 172 (2010).
92. Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 1–12 (2002).
93. Livak, K. & Schmittgen, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
94. Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie* **9**, 413–468 (1873).
95. Rayleigh, L. Investigations in optics with special reference to the spectroscopy. *Philos. Mag.* (1879).
96. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. & Prasher, D. Green fluorescent protein as a marker for Gen-Expression. *Science* **263**, 802–805 (1994).
97. Raman, C. & Krishnan, K. A new type of secondary radiation. *Nature* **121**, 501–502 (1928).

98. Maiman, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature* **187**, 493–494 (1960).
99. Maker, P. & Terhune, R. Study of Optical Effects due to an induced Polarization third order in Electric Field Strength. *Phys. Rev.* **137**, 801–818 (1965).
100. Duncan, M., Oesterlin, P., Konig, F. & Byer, R. Observation of Saturation Broadening of the coherent anti-stokes Raman spectrum (CARS) of Acetylene in a pulsed molecular Beam. *Chemical Physics Letters* **80**, 253–256 (1981).
101. Duncan, M., Reintjes, J. & Manuccia, T. A Scanning CARS Microscope. *Applied Physics B-Photophysics and Laser Chemistry* **28**, 242–243 (1982).
102. Evans, C.L. & Diehl, S. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 883–909 (2008).
103. Downes, A., Mouras, R. & Elfick, A. A versatile CARS microscope for biological imaging. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 757–762 (2009).
104. Muller, M. & Zumbusch, A. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *ChemPhysChem* **8**, 2156–2170 (2007).
105. Vacano, von, B., Wohlleben, W. & Motzkus, M. Single-beam CARS spectroscopy applied to low-wavenumber vibrational modes. *J. Raman Spectrosc.* **37**, 404–410 (2006).
106. Krafft, C. et al. A comparative Raman and CARS imaging study of colon tissue. *J. Biophoton.* **2**, 303–312 (2009).
107. Krafft, C., Dietzek, B. & Popp, J. Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues. *Analyst* **134**, 1046–1057 (2009).
108. Walter, A. et al. Analysis of the cytochrome distribution via linear and nonlinear Raman spectroscopy. *Analyst* **135**, 908–917 (2010).
109. Meyer, T. et al. Three-dimensional molecular mapping of a multiple emulsion by means of CARS microscopy. *J. Phys. Chem. B* **112**, 1420–1426 (2008).
110. Baldacchini, T., Zimmerley, M., Kuo, C.-H., Potma, E.O. & Zadoyan, R. Characterization of Microstructures Fabricated by Two-Photon Polymerization Using Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **113**, 12663–12668 (2009).
111. Zimmerley, M. et al. Quantitative detection of chemical compounds in human hair with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt.* **14**, 044019 (2009).
112. Bergner, G. et al. Quantitative CARS Microscopic Detection of Analytes and Their Isotopomers in a Two-Channel Microfluidic Chip. *Small* **5**, 2816–2818 (2009).
113. Potma, E. & Diehl, S. Detection of single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *J. Raman Spectrosc.* **34**, 642–650 (2003).
114. Vogler, N. et al. Separation of CARS image contributions with a Gaussian mixture model. *J. Opt. Soc. Am. A* **27**, 1361–1371 (2010).
115. Fleischmann, M., Hendra, P. & McQuillan, A.J. Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chemical Physics Letters* **26**, 163–166 (1974).

-
116. Jeanmaire, D. & Van Duyne, R. Surface Raman Spectroelectrochemistry - Part 1. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-Amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **84**, 1–20 (1977).
117. Cialla, D. et al. Investigation on the Second Part of the Electromagnetic SERS Enhancement and Resulting Fabrication Strategies of Anisotropic Plasmonic Arrays. *ChemPhysChem* **11**, 1918–1924 (2010).
118. Ru, E., Meyer, M., Blackie, E. & Etchegoin, P. Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot. *J. Raman Spectrosc.* (2008).
119. Vo-Dinh, T. & Stokes, D.L. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2006).doi:10.1002/0470027320.s2507
120. Faulds, K., Littleford, R., Graham, D., Dent, G. & Smith, W. Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering from unaggregated and aggregated nanoparticles. *Anal. Chem.* **76**, 592–598 (2004).
121. Jana, N., Gearheart, L. & Murphy, C. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *J. Phys. Chem. B* **105**, 4065–4067 (2001).
122. Abdelsalam, M. et al. Electrochemical SERS at a structured gold surface. *Electrochem. Commun.* **7**, 740–744 (2005).
123. Sokes, R.J. et al. Rapid cell mapping using nanoparticles and SERRS. *Analyst* **134**, 170–175 (2009).
124. Knauer, M., Ivleva, N.P., Liu, , Niessner, R. & Haisch, C. Surface-enhanced Raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms. *Anal. Chem.* **82**, 2766–2772 (2010).
125. Huh, Y.S., Chung, A.J. & Erickson, D. Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis. *Microfluid. Nanofluid.* **6**, 285–297 (2009).
126. Kneipp, J., Kneipp, H. & Kneipp, K. SERS—a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1052–1060 (2008).
127. Hudson, S.D. & Chumanov, G. Bioanalytical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy). *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 679–686 (2009).
128. Treffer, R. & Deckert, V. Recent advances in single-molecule sequencing. *Curr. Opin. Biotech.* **21**, 4–11 (2010).
129. Etchegoin, P.G. & Le Ru, E.C. A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6079–6089 (2008).
130. Hennemann, L.E., Meixner, A.J. & Zhang, D. Surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy of DNA. *Spectrosc. - Int. J.* **24**, 119–124 (2010).
131. Cialla, D. et al. Ultrafast plasmon dynamics and evanescent field distribution of reproducible surface-enhanced Raman-scattering substrates. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1811–1818 (2009).
132. Haynes, C. & Van Duyne, R. Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. *J. Phys. Chem. B* **105**, 5599–5611 (2001).

-
133. Willets, K.A. & Van Duyne, R.P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267–297 (2007).
134. Kottmann, J., Martin, O., Smith, D. & Schultz, S. Spectral response of plasmon resonant nanoparticles with a non-regular shape. *Opt. Express* **6**, 213–219 (2000).
135. Kambhampati, P., Child, C., Foster, M. & Campion, A. On the chemical mechanism of surface enhanced Raman scattering: Experiment and theory. *J. Chem. Phys.* **108**, 5013–5026 (1998).
136. Gao, ., Davies, J. & Weaver, M. A Test of Surface Selection Rules for Surface-Enhanced Raman Scattering: The Orientation of Adsorbed Benzene and Monosubstituted Benzenes on Gold. *J. Phys. Chem.* **94**, 6858–6864 (1990).
137. Moskovits, M. & Suh, J. Surface Selection Rules for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Calculations and Application to the Surface-Enhanced Raman Spectrum of Phthalazine on Silver. *J. Phys. Chem.* **88**, 5526–5530 (1984).
138. Campion, A. & Kambhampati, P. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 241–250 (1998).
139. Huebner, U., Boucher, R., Schneidewind, H., Cialla, D. & Popp, J. Microfabricated SERS-arrays with sharp-edged metallic nanostructures. *Microelectron. Eng.* **85**, 1792–1794 (2008).
140. Wessel, J. Surface-enhanced optical Microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B* **2**, 1538–1541 (1985).
141. Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy. *Helvetica Physica Acta* **55**, 726–735 (1982).
142. Binnig, G. & Rohrer, H. In touch with atoms. *Rev. Mod. Phys.* **71**, S324–S330 (1999).
143. Binnig, G., Quate, C. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
144. Alexander, S. et al. An Atomic-Resolution Atomic-Force Microscope Implemented Using an Optical-Lever. *Journal of Applied Physics* **65**, 164–167 (1989).
145. Neelov, I.M., Adolf, D.B., McLeish, T.C.B. & Paci, E. Molecular dynamics simulation of dextran extension by constant force in single molecule AFM. *Biophys. J.* **91**, 3579–3588 (2006).
146. Alessandrini, A. & Facci, P. AFM: a versatile tool in biophysics. *Meas. Sci. Technol.* **16**, R65–R92 (2005).
147. Toledo-Crow, R., Yang, P., Chen, Y. & Vaeziravani, M. Near-Field Differential Scanning Optical Microscope with Atomic Force Regulation. *Appl. Phys. Lett.* **60**, 2957–2959 (1992).
148. Davy, S., Spajer, M. & Courjon, D. Influence of the water layer on the shear force damping in near-field microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **73**, 2594–2596 (1998).
149. Durkan, C. & Shvets, I. Investigation of the physical mechanisms of shear-force imaging. *Journal of Applied Physics* **80**, 5659–5664 (1996).

-
150. Karrai, K. & Grober, R. Piezoelectric Tip-Sample Distance Control for near-Field Optical Microscopes. *Appl. Phys. Lett.* **66**, 1842–1844 (1995).
151. Harris, C. Shedding light on NSOM. *Anal. Chem.* **75**, 223A–228A (2003).
152. Pohl, D., Denk, W. & Lanz, M. Optical Stethoscopy - Image Recording with Resolution $\lambda/20$. *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651–653 (1984).
153. Lewis, A., Isaacson, M., Haroontunian, A. & Muray, A. Development of a 500 Å spatial resolution light microscope: I. light is efficiently transmitted through $\lambda/16$ diameter apertures. *Ultramicroscopy* **13**, 227–231 (1983).
154. Betzig, E. & Trautman, J. Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit. *Science* **257**, 189–195 (1992).
155. de Bakker, B. et al. Nanoscale Organization of the Pathogen Receptor DC-SIGN Mapped by Single-Molecule High-Resolution Fluorescence Microscopy. *ChemPhysChem* **8**, 1473–1480 (2007).
156. ie, . & Dunn, R. Probing Single-Molecule Dynamics. *Science* **265**, 361–364 (1994).
157. ie, . & Trautman, J. Optical studies of single molecules at room temperature. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 441–480 (1998).
158. Ruitter, A., Veerman, J., GarciaParajo, M. & vanHulst, N. Single molecule rotational and translational diffusion observed by near-field scanning optical microscopy. *J. Phys. Chem. A* **101**, 7318–7323 (1997).
159. Keilmann, F. Vibrational-infrared near-field microscopy. *Vib. Spectrosc.* **29**, 109–114 (2002).
160. Lahrech, A., Bachelot, R., Gleyzes, P. & Boccara, A. Infrared near-field imaging of implanted semiconductors: Evidence of a pure dielectric contrast. *Appl. Phys. Lett.* **71**, 575–577 (1997).
161. Lahrech, A., Bachelot, R., Gleyzes, P. & Boccara, A. Infrared-reflection-mode near-field microscopy using an apertureless probe with a resolution of $\lambda/600$. *Opt. Lett.* **21**, 1315–1317 (1996).
162. Cialla, D. et al. Raman to the limit: tip-enhanced Raman spectroscopic investigations of a single tobacco mosaic virus. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 240–243 (2009).
163. Keilmann, F. Scattering-type near-field optical microscopy. *J. Electron. Microsc.* **53**, 187–192 (2004).
164. Hecht, B. et al. Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications. *J. Chem. Phys.* **112**, 7761–7774 (2000).
165. Zenobi, R. & Deckert, V. Scanning near-field optical microscopy and spectroscopy as a tool for chemical analysis. *Angew. Chem. Int. Edit.* **39**, 1746–1756 (2000).
166. Schurmann, G., Noell, W., Staufer, U. & de Rooij, N. Microfabrication of a combined AFM-SNOM sensor. *Ultramicroscopy* **82**, 33–38 (2000).
167. Betzig, E., Trautman, J., Harris, T., Weiner, J. & Kostelak, R. Breaking the Diffraction Barrier: Optical Microscopy on a Nanometric Scale. *Science* **251**, 1468–1470 (1991).

-
168. Valaskovic, G. Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes. *Appl. Optics* **34**, 1215–1228 (1995).
169. Turner, D. US Patent 4,469,554. (1984).
170. Stöckle, R. et al. High-quality near-field optical probes by tube etching. *Appl. Phys. Lett.* **75**, 160–162 (1999).
171. Lambelet, P. Chemically etched fiber tips for near-field optical microscopy: a process for smoother tips. *Appl. Optics* **37**, 7289–7292 (1998).
172. Stöckle, R., Schaller, N., Deckert, V., Fokas, C. & Zenobi, R. Brighter near-field optical probes by means of improving the optical destruction threshold. *J. Microsc.* **194**, 378–382 (1999).
173. Stöckle, R., Suh, Y., Deckert, V. & Zenobi, R. Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **318**, 131–136 (2000).
174. Hayazawa, N., Inouye, Y., Sekkat, Z. & Kawata, S. Metallized tip amplification of near-field Raman scattering. *Optics Communications* **183**, 333–336 (2000).
175. Anderson, M. Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.* **76**, 3130–3132 (2000).
176. Ren, B., Picardi, G. & Pettinger, B. Preparation of gold tips suitable for tip-enhanced Raman spectroscopy and light emission by electrochemical etching. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* **75**, 837–841 (2004).
177. Dickmann, K., Demming, F. & Jersch, J. New etching procedure for silver scanning tunneling microscopy tips. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* **67**, 845–846 (1996).
178. Rasmussen, A. & Deckert, V. Surface- and tip-enhanced Raman scattering of DNA components. *J. Raman Spectrosc.* **37**, 311–317 (2006).
179. Lacoste, T., Huser, T., Prioli, R. & Heinzelmann, H. Contrast enhancement using polarization-modulation scanning near-field optical microscopy (PM-SNOM). *Ultramicroscopy* **71**, 333–340 (1998).
180. Oshikane, Y. et al. Observation of localized optical near-field generated by submicron two-hole structure for novel SNOM probe. *Surf. Interface. Anal.* **40**, 1054–1058 (2008).
181. Veerman, J., Otter, A., Kuipers, L. & van Hulst, N. High definition aperture probes for near-field optical microscopy fabricated by focused ion beam milling. *Appl. Phys. Lett.* **72**, 3115–3117 (1998).
182. Taminiau, T., Segerink, F., Moerland, R., Kuipers, L. & van Hulst, N. Near-field driving of an optical monopole antenna. *Journal of Optics A - Pure and Applied Optics* **9**, S315–S321 (2007).
183. Bailo, E. & Deckert, V. Tip-enhanced Raman spectroscopy of single RNA strands: towards a novel direct sequencing method. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 1–5 (2008).
184. Esbensen, K.H., Guyot, D., Westad, F. & Houmøller, L.P. *Multivariate data analysis*. 598 (Multivariate Data Analysis: 2002).

185. Draux, F. et al. Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2727–2737 (2010).
186. Krafft, C., Knetschke, T., Siegner, A., Funk, R. & Salzer, R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib Spectrosc* **32**, 75–83 (2003).
187. Mariani, M.M. et al. Micro-Raman Detection of Nuclear Membrane Lipid Fluctuations in Senescent Epithelial Breast Cancer Cells. *Anal. Chem.* **82**, 4259–4263 (2010).
188. Matthaus, C., Chernenko, T., Newmark, J.A., Warner, C.M. & Diem, M. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy. *Biophys. J.* **93**, 668–673 (2007).
189. Hedegaard, M. et al. Discriminating Isogenic Cancer Cells and Identifying Altered Unsaturated Fatty Acid Content as Associated with Metastasis Status, Using K-Means Clustering and Partial Least Squares-Discriminant Analysis of Raman Maps. *Anal. Chem.* **82**, 2797–2802 (2010).
190. Taleb, A. et al. Raman microscopy for the chemometric analysis of tumor cells. *J. Phys. Chem. B* **110**, 19625–19631 (2006).
191. Walter, A. et al. Raman spectroscopic detection of physiology changes in plasmid-bearing Escherichia coli with and without antibiotic treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 2763–2773 (2011).
192. Bocklitz, T. et al. A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 1759–1765 (2009).
193. Keshava, N. A Survey of Spectral Unmixing Algorithms. *Lincoln Laboratory Journal* **14**, 55–78 (2003).
194. Nascimento, J.M.P. & Dias, J.M.B. Vertex Component Analysis: A Fast Algorithm to Unmix Hyperspectral Data. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* **43**, 898 (2005).
195. Winter, M.E. N-FINDR: an algorithm for fast autonomous spectral end-member determination in hyperspectral data. *Proceedings of SPIE* 266–277 (1999).doi:10.1117/12.366289
196. Matthaus, C. et al. Monitoring Intra-cellular Lipid Metabolism in Macrophages by Raman- and CARS-Microscopy. *Proceedings of SPIE* **7715**, 771511–771511–8 (2010).
197. Matthäus, C. et al. Raman Microscopic Imaging of Cells and Applications Monitoring the Uptake of Drug Delivery Systems. *Proceedings of SPIE* 1–8 (2008).doi:10.1117/12.800385
198. Krafft, C. et al. Crisp and soft multivariate methods visualize individual cell nuclei in Raman images of liver tissue sections. *Vib. Spectrosc.* **55**, 90–100 (2011).
199. Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science Series* **6**, 559–572 (1901).
200. Cortes, C. Support-Vector Networks. *Machine learning* **20**, 273–297 (1995).

201. Burges, C.J.C. A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition. *Data Mining and Knowledge Discovery* **2**, 121–167 (1998).
202. Sattlecker, M., Bessant, C., Smith, J. & Stone, N. Investigation of support vector machines and Raman spectroscopy for lymph node diagnostics. *Analyst* **135**, 895–901 (2010).
203. Neugebauer, U., Bocklitz, T., Clement, J.H., Krafft, C. & Popp, J. Towards detection and identification of circulating tumour cells using Raman spectroscopy. *Analyst* **135**, 3178–3182 (2010).
204. Brereton, R.G. & Lloyd, G.R. Support vector machines for classification and regression. *Analyst* **135**, 230–267 (2010).
205. Bassan, P. et al. Resonant Mie Scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples. *Analyst* **135**, 268–277 (2010).
206. Kok, J.W., Babia, T. & Hoekstra, D. Sorting of Sphingolipids in the Endocytic Pathway of HT29 Cells. *J. Cell Biol.* **114**, 231–239 (1991).
207. Rebillard, A. et al. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 7865–7874 (2007).
208. Simon-Assmann, P. et al. Adhesive properties and integrin expression profiles of two colonic cancer populations differing by their spreading on laminin. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 3)**, 577–587 (1994).
209. Lee, S. et al. Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **337**, 457–463 (2005).
210. Fukushima, K., Sasaki, I., Takahashi, K., Naito, H. & Matsuno, S. Lipopolysaccharide- and proinflammatory cytokine-induced energy production in intestinal and colonic epithelial cell lines. *Scand. J. Gastroentero.* **34**, 291–296 (1999).
211. Borchering, F. et al. The CD40-CD40L Pathway Contributes to the Proinflammatory Function of Intestinal Epithelial Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Pathol.* **176**, 1816–1827 (2010).
212. Funda, D. et al. CD14 Is Expressed and Released as Soluble CD14 by Human Intestinal Epithelial Cells In Vitro: Lipopolysaccharide Activation of Epithelial Cells Revisited. *Infect. Immun.* 3772–3781 (2001).doi:10.1128/IAI.69.6.3772–3781.2001
213. Hsu, R.Y.C. et al. LPS-Induced TLR4 Signaling in Human Colorectal Cancer Cells Increases beta 1 Integrin-Mediated Cell Adhesion and Liver Metastasis. *Cancer Res.* **71**, 1989–1998 (2011).
214. Le, T.T., Huff, T.B. & Cheng, J.- . Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* **9**, 42 (2009).
215. Shafaat, H.S., Sanchez, K.M., Neary, T.J. & Kim, J.E. Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of a β -sheet peptide: A model for membrane protein folding. *J. Raman Spectrosc.* 1–5 (2009).
216. Balakrishnan, G., Weeks, C.L., Ibrahim, M., Soldatova, A.V. & Spiro, T.G. Protein dynamics from time resolved UV Raman spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 623–629 (2008).

-
217. Sanchez, K.M., Neary, T.J. & Kim, J.E. Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of folded and unfolded states of an integral membrane protein. *J. Phys. Chem. B* **112**, 9507–9511 (2008).
218. Boehme, R. et al. Towards a specific characterisation of components on a cell surface - combined TERS-investigations of lipids and human cells. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 1452–1457 (2009).
219. Pijanka, J.K. et al. FTIR microspectroscopy of stained cells and tissues. Application in cancer diagnosis. *Spectrosc. - Int. J.* **24**, 73–78 (2010).
220. Bassan, P. et al. RMieS-EMSC correction for infrared spectra of biological cells: Extension using full Mie theory and GPU computing. *J. Biophoton.* **3**, 609–620 (2010).
221. Flower, K.R. et al. Synchrotron FTIR analysis of drug treated ovarian A2780 cells: an ability to differentiate cell response to different drugs? *Analyst* **136**, 498–507 (2011).
222. Bassan, P. et al. Resonant Mie scattering in infrared spectroscopy of biological materials - understanding the “dispersion artefact.” *Analyst* **134**, 1586–1593 (2009).
223. Lau, K. et al. Visualization and characterisation of defined hair follicle compartments by Fourier transform infrared (FTIR) imaging without labelling. *J. Dermatol. Sci.* **63**, 191–198 (2011).
224. Krafft, C., Salzer, R., Seitz, S., Ern, C. & Schieker, M. Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging. *Analyst* **132**, 647–653 (2007).
225. Blouin, S. et al. Bone matrix quality and plasma homocysteine levels. *Bone* **44**, 959–964 (2009).
226. Najbjerg, H. et al. Monitoring cellular responses upon fatty acid exposure by Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. *Analyst* **136**, 1649–1658 (2011).
227. Meade, A., Lyng, F., Knief, P. & Byrne, H. Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1717–1728 (2007).
228. Maquelin, K. et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Meth.* **51**, 255–271 (2002).
229. Chi, Z.L., Hayasaka, S., Zhang, .Y., Cui, H.S. & Hayasaka, Y. A Cholinergic Agonist Attenuates Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **48**, 2719–2725 (2007).
230. Birukova, A.A. et al. Polar head groups are important for barrier-protective effects of oxidized phospholipids on pulmonary endothelium. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* **292**, L924–L935 (2006).
231. Dudek, S.M. et al. Group V phospholipase A2 mediates barrier disruption of human pulmonary endothelial cells caused by LPS in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 361–368 (2011).
232. Dreissig, I., Machill, S., Salzer, R. & Krafft, C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. *Spectrochim. Acta A* **71**, 2069–2075 (2009).

-
233. Krafft, C., Codrich, D., Pelizzo, G. & Sergio, V. Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J. Biophoton.* **1**, 154–169 (2008).
234. Steinhaus, H. *Sur la division des corp materiels en parties.* (Bull. Acad. Polon. Sci: 1956).
235. Phan, J. et al. Improvement of SVM Algorithm for Microarray Analysis Using Intelligent Parameter Selection. *Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol. Soc* **5**, 4838–4841 (2005).
236. Frigge, M., Hoaglin, D. & Iglewicz, B. Some Implementations of the Boxplot. *Am. Stat.* **43**, 50–54 (1989).
237. Chan, J.W., Taylor, D.S. & Thompson, D.L. The Effect of Cell Fixation on the Discrimination of Normal and Leukemia Cells with Laser Tweezers Raman Spectroscopy. *Biopolymers* **91**, 132–139 (2009).
238. Hartman, K.A., Clayton, N. & Thomas, G.J. Studies of viral structure by Raman spectroscopy. I. R17 virus and R17 RNA. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **50**, 942–949 (1973).
239. Miura, T. & Thomas, G.J. Raman Spectroscopy of Proteins and their Assemblies. *Subcell. Biochem.* **24**, 55–99 (1995).
240. Harvey, T.J. et al. Classification of fixed urological cells using Raman tweezers. *J. Biophoton.* **2**, 47–69 (2009).
241. Notingher, I. In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy. *Spectroscopy* **16**, 43–51 (2002).
242. Krafft, C., Knetschke, T., Funk, R. & Salzer, R. Identification of organelles and vesicles in single cells by Raman microspectroscopic mapping. *Vib. Spectrosc.* **38**, 85–93 (2005).
243. Rehman, S. et al. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *J. Raman Spectrosc.* **38**, 1345–1351 (2007).
244. Day, J.P.R. et al. Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **115**, 7713–7725 (2011).
245. Budich, C., Neugebauer, U., Popp, J. & Deckert, V. Cell wall investigations utilizing tip-enhanced Raman scattering. *J. Microsc. - Oxford* **229**, 533–539 (2008).
246. Richards, D., Milner, R., Huang, F. & Festy, F. Tip-enhanced Raman microscopy: practicalities and limitations. *J. Raman Spectrosc.* **34**, 663–667 (2003).
247. Notingher, I. & Elfick, A. Effect of sample and substrate electric properties on the electric field enhancement at the apex of SPM nanotips. *J. Phys. Chem. B* **109**, 15699–15706 (2005).
248. Edidin, M. Timeline - Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418 (2003).
249. Pelton, J. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Analytical Biochemistry* **277**, 167–176 (2000).
250. Krishna, C. et al. FTIR and Raman microspectroscopy of normal, benign, and malignant formalin-fixed ovarian tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1649–1656 (2007).

-
251. Mahadevan-Jansen, A. & Richards-Kortum, R. Raman Spectroscopy for the detection of cancers and precancers. *J. Biomed. Opt.* **1**, 31–70 (1996).
252. Deckert-Gaudig, T., Rauls, E. & Deckert, V. Aromatic Amino Acid Monolayers Sandwiched between Gold and Silver: A Combined Tip-Enhanced Raman and Theoretical Approach. *J. Phys. Chem. C* **114**, 7412–7420 (2010).
253. Krafft, C., Neudert, L., Simat, T. & Salzer, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim. Acta A* **61**, 1529–1535 (2005).
254. Bresson, S., Marssi, M.E. & Khelifa, B. Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides. *Chem. Phys. Lipids* **134**, 119–129 (2005).
255. Tfayli, A., Piot, O., Draux, F., Pitre, F. & Manfait, M. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. *Biopolymers* **87**, 261–274 (2007).
256. Faiman, R. Raman Spectroscopic Studies of different Forms of Cholesterol and its derivatives in Crystalline State. *Chem. Phys. Lipids* **18**, 84–104 (1977).
257. Aliaga, A.E. et al. Surface-enhanced Raman scattering study of L-tryptophan. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 164–169 (2009).
258. Boustany, N.N., Manoharan, R., Dasari, R.R. & Feld, M.S. Analysis of normal and diseased colon mucosa using ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Proceedings of SPIE* **1996**, 66–70 (2009).
259. Brown, K.L. et al. Raman spectroscopic differentiation of activated versus non-activated T lymphocytes: An in vitro study of an acute allograft rejection model. *J. Immunol. Methods* **340**, 48–54 (2009).
260. Carmona, P., Ramos, J., Decozar, M. & Monreal, J. Conformational Features of Lipids and Proteins in Myelin Membranes Using Raman and Infrared-Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **18**, 473–476 (1987).
261. Chan, J., Fore, S., Wachsman-Hogiu, S. & Huser, T. Raman spectroscopy and microscopy of individual cells and cellular components. *Laser Photonics Rev.* **2**, 325–349 (2008).
262. Chan, J.W. et al. Nondestructive identification of individual leukemia cells by laser trapping Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **80**, 2180–2187 (2008).
263. Chan, J.W. et al. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys. J.* **90**, 648–656 (2006).
264. Chowdhury, M. et al. Use of surface-enhanced Raman spectroscopy for the detection of human integrins. *J. Biomed. Opt.* **11**, 024004 (2006).
265. Das, G. et al. Nano-patterned SERS substrate: application for protein analysis vs. temperature. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 1693–1699 (2009).

-
266. Gniadecka, M., Wulf, H.C., Nielsen, O.F., Christensen, D.H. & Hercogova, J. Distinctive Molecular Abnormalities in Benign and Malignant Skin Lesions: Studies by Raman Spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology* **66**, 418–423 (1997).
267. Goheen, S.C., Gilman, T.H., Kauffman, J.W. & Garvin, J.E. The effect of Raman spectra of extraction of peripheral proteins from human erythrocyte membranes. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **79**, 805–814 (1977).
268. Hu, J., Sheng, R.S., u, Z.S. & Zeng, Y. Surface enhanced Raman spectroscopy of lysozyme. *Spectrochimica Acta* **51A**, 1087–1096 (1995).
269. Ivleva, N.P., Wagner, M., Horn, H., Niessner, R. & Haisch, C. In Situ Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis of Biofilm. *Anal. Chem.* **80**, 8538–8544 (2008).
270. Lord, R.C. & Yu, N.T. Laser-excited Raman Spectroscopy of Biomolecules II. Native Ribonuclease and alpha-Chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology* **51**, 203–& (1970).
271. Mahadevan, A. et al. Optical Techniques for the Diagnosis of Cervical Precancer: A Comparison of Raman and Fluorescence Spectroscopies. *Proceedings of SPIE* **2388**, 110–120 (1995).
272. Maiti, N.C., Apetri, M.M., Zagorski, M.G., Carey, P.R. & Anderson, V.E. Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins: α -Synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2399–2408 (2004).
273. Manoharan, R., Wang, Y. & Feld, M. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A* **52**, 215–249 (1996).
274. Mendelsohn, R. & Moore, D.J. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids* **96**, 141–157 (1998).
275. Nie, S., Bergbauer, K.L., Ho, J.J., Kuck, J.F.R. & Yu, N.-T. Applications of Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy in Biology and Medicine. *Spectroscopy* **5**, 24–32 (1990).
276. Redd, D.C.B., Frank, C.J., Feng, Z.C., Gansler, T.S. & McCreery, R.L. Raman spectroscopic characterization of human malignant tissues: implications for a percutaneous optical biopsy technique for in-situ tissues diagnosis. *Optical Biopsy* **2081**, 1–6 (1993).
277. Reipa, V., Gaigalas, A. & Abramowitz, S. Conformational alterations of bovine insulin adsorbed on a silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* **348**, 413–428 (1993).
278. Willets, K.A. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 85–94 (2009).
279. Yazdi, Y. et al. Resonance Raman Spectroscopy at 257 nm Excitation of Normal and Malignant Cultured Breast and Cervical Cells. *Appl. Spectrosc.* **53**, 1–4 (1999).
280. Steidtner, J. & Pettinger, B. Tip-enhanced Raman spectroscopy and microscopy on single dye molecules with 15 nm resolution. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 236101–1–236101–4 (2008).

-
281. Bayburt, T., Carlson, J. & Sligar, S. Single molecule height measurements on a membrane protein in nanometer-scale phospholipid bilayer disks. *Langmuir* **16**, 5993–5997 (2000).
 282. Giebel, B. et al. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **104**, 2332–2338 (2004).
 283. Malm, J., Giannaras, D., Riehle, M.O., Gadegaard, N. & Sjoval, P. Fixation and Drying Protocols for the Preparation of Cell Samples for Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis. *Anal. Chem.* **81**, 7197–7205 (2009).
 284. Meade, A.D. et al. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1781–1791 (2010).

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1: Übersicht über eine vereinfacht dargestellte humane eukaryontische Zelle. Dargestellt sind unter anderem der Zellkern (Nukleus), raues und glattes ER, der Golgi-Apparat, Mitochondrien und verschiedene Vesikel. (Abbildung basiert auf Ref. ²⁷) 15
- Abbildung 2.2: Aufbau Bestandteile der Lipidmembran einer eukaryontischen Zelle: Phospholipid (am Beispiel von Phosphatidylcholin), Glykosphingolipid und Cholesterol. Die Strukturformeln des Phosphatidylcholins und des Glykosphingolipids verdeutlichen die Unterteilung der Lipide in ihre hydrophilen, hydrophoben und funktionellen Gruppen. (Abbildung basiert auf Ref.²⁸) 18
- Abbildung 2.3: Ansicht auf die Zellmembran einer menschlichen Zelle (A) und auf ein ‚Lipid Raft‘ in der Membran (B). Die vermehrte Akkumulation von Cholesterol und Sphingolipiden als auch die Einlagerung von Membranproteinen in das ‚Lipid Raft‘ sind deutlich zu erkennen. (Abbildung basiert auf Ref.³⁰)..... 20
- Abbildung 2.4: Integrine liegen in der Zellmembran als Dimere vor, bestehend aus α - und β -Untereinheiten. Es gibt verschiedene Integrinkombinationen, denen im menschlichen Körper vielfältige und biologisch essenzielle Aufgaben zugesprochen werden³⁸ 22
- Abbildung 2.5: Integrine existieren in verschiedenen Formen auf der Zellmembran. Sie können entweder inaktiv, aktiv oder in Form von Clustern vorliegen. Dabei können sowohl ‚outside-in‘- als auch ‚inside-out‘- Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Obwohl beide Prozesse hier getrennt erwähnt werden, sind sie oft miteinander verknüpft. 23
- Abbildung 2.6: Struktur von Lipopolysaccharid. Das Molekül setzt sich aus der O-Antigen- und den äußeren und inneren Kernregion-Untereinheiten zusammen, welche aus Monosacchariden aufgebaut sind. Zusätzlich zu Monosacchariden beinhaltet die Lipid-A-Gruppe Phosphat- und Fettsäurereste. (Abbildung basiert auf Ref.⁶²) 26
- Abbildung 2.7: Die Lipopolysaccharid-(LPS)-induzierte Osteopontin-(OPN)-Überexpression in den HT29-Zellen hat unter der Einbeziehung spezifischer Signalmoleküle (CD44 und Src) die Aktivierung und das Clustering der $\alpha_v\beta_3$ Integrine in Lipid Rafts zur Folge..... 27
- Abbildung 2.8: A) Schematische Darstellung eines Temperaturprofils eines PCR-Zyklus (n) mit den Schritten 1) Denaturierung, 2) Annealing und 3) Elongation. B) Während der Denaturierung kommt es temperaturbedingt zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs. Das darauf folgende Annealing beinhaltet die Anlagerung der Primer und der Taq-Polymerase, welche in der Elongationsphase die Zielsequenz verlängert..... 30

- Abbildung 2.9: a) Schematische Darstellung der durch die Amplifizierung der PCR-Produkte hervorgerufenen Zunahme des Fluoreszenzsignals einer SYBR green I RT-qPCR. Deutlich lassen sich die exponentielle und die Plateauphase erkennen. Zusätzlich eingezeichnet ist der Schwellenwert für die Bestimmung der für die relative Quantifizierung benötigten CT-Werte. b) Im Anschluss an die Plateauphase durchgeführte Schmelzkurve der PCR-Produkte zwecks Überprüfung der Bindungsspezifität von SYBR green I. Beim Auftragen der ersten Ableitung der Fluoreszenzabnahme würden unspezifische Bindungsereignisse weitere Peaks in der Schmelzkurve mit geringerem Schmelzpunkt (hier $<85^{\circ}\text{C}$) hervorrufen. 33
- Abbildung 2.10: Darstellung von direkter (1) und indirekter (2) Fluoreszenzmarkierung an einer Zellmembran 37
- Abbildung 2.11: Vereinfacht dargestellter Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops, bestehend aus Lichtquelle, Detektor und im Mikroskop eingebaute (auf das Fluorophor abgestimmte) Filtersätze. 38
- Abbildung 2.12: Termschema eines Fluorophors mit möglichen Übergängen. Die Energie des absorbierten Lichtes (Blau) versetzt das Molekül in den elektronisch angeregten Zustand (S_1 und S_2). Nach Anregung in die schwingungsangeregten Zustände S_1 bzw. S_2 erfolgt eine strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand S_1 . Von hier aus wird durch Emission (Grün) wieder in den elektronischen Grundzustand S_0 zurückgekehrt. 39
- Abbildung 2.13: An einer CH_2 -Gruppe lassen sich die unterschiedlichen Arten der Schwingung verdeutlichen. Möglich sind unter anderem symmetrische und asymmetrische Schwingungen, Schwingungen, welche mit Veränderung der Bindungslänge (Valenzschwingung) bzw. der Bindungswinkel (Deformationsschwingung) einhergehen und Schwingungen aus der Molekülebene heraus („out-of-plane“). 42
- Abbildung 2.14: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers und dessen Implementierung in einen FTIR-Aufbau. 44
- Abbildung 2.15: Die symmetrische Valenzschwingung von CO_2 ist Raman-aktiv (a), wohingegen die asymmetrische Valenzschwingung (b) und die Deformationsschwingung IR-aktiv sind (c). 46
- Abbildung 2.16: a) Darstellung des Termschemas für die elastische und inelastische Streuung. b) Durch die unterschiedlichen Vibrationstypen variieren die Intensitäten der Stokes- (rot-verschoben), der Rayleigh- und der Anti-Stokes-Streuung (blau-verschoben). 47
- Abbildung 2.17: Schematische Darstellung eines Raman-Systems bestehend aus: a) Anregungslichtquelle, b) Optik für Probenbeleuchtung und Sammlung des gestreuten Lichtes, c) Spektrometer und d) CCD-Kamera. Des Weiteren eingezeichnet sind: die Position der Photodiode und die Position sowohl des Interferenz- als auch des Kantenfilters/Notchfilters. 51

- Abbildung 2.18: Termschema für den CARS-Prozess. Ausgehend vom elektronischen Grundzustand erreicht das Molekül durch den Pump-Laser (ω_1) und das Stokes-Signal (ω_{Stokes}) den ersten schwingungsangeregten Zustand (ω_{vib}). Durch eine weitere Anregung (ω_1) wird ein CARS-Photon (ω_{CARS}) erzeugt..... 53
- Abbildung 2.19: Elektronenmikroskopieaufnahmen von a) der Oberfläche einer Metallelektrode (Gold)¹²², b) Kolloiden (Silber)¹²⁰ und c) Nanodrähten (Gold)¹²¹..... 54
- Abbildung 2.20: Lithographisch hergestellte SERS-Substrate in Form von Rhomben (a)¹³¹, Rechtecken (b)¹³¹ und Dreiecken (c)¹³²..... 55
- Abbildung 2.21: a) Darstellung induzierter LSP bzw. eines evaneszenten Feldes E_{ev} durch das elektromagnetische Feld des Anregungslichtes E_0 . b) Mechanismus der elektromagnetischen SERS-Verstärkung. Sowohl E_0 als auch E_{ev} wirken auf das Molekül und induzieren die Dipolstrahlung E_{Dip} , welche zum einen direkt detektiert werden und zum anderen eine zweite Verstärkung erfahren kann (E_{sc}). (Abbildung basiert auf Ref.¹³³)..... 56
- Abbildung 2.22: ‚Surface-enhanced optical microscope‘ als Lösungsansatz nach Wessel (Wessel 1985). Das verwendete SERS-Nanopartikel (a) interagiert mit dem einstrahlenden Laserlicht der Wellenlänge ω_{in} , und das von der Probe (b) stammende Ramansignal ω_{out} wird detektiert. Für das Abrastern der Probenoberfläche wird die optisch transparente Partikelhalterung (c) durch Piezo-Elemente (d) bewegt. 62
- Abbildung 2.23: Detektion der lateralen und vertikalen Auslenkung des Cantilevers mit Hilfe einer Vier-Quadranten-Photodiode und dem Lichtzeigerprinzip. Hierbei wird die Auslenkung durch die Veränderung der gemessenen Ströme festgestellt..... 64
- Abbildung 2.24: Aufgrund der auftretenden Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe verursacht die daraus resultierende Resonanzverschiebung eine Veränderung der gemessenen Amplitude bei der beobachteten Frequenz (gestrichelte Linie). Wird der Soll-Wert (schwarz) unterschritten bzw. überschritten (Ist-Wert, rot bei Zunahme der Probenhöhe bzw. grün bei Abnahme der Probenhöhe), wird die Position der Spitze via Piezoelement korrigiert, bis die Amplitude wieder über dem Soll-Wert entspricht. 66
- Abbildung 2.25: Durch die Beschaffenheit der Spitze können Artefakte in der Topographie vorkommen. Die relevanten Größen sind hierbei der Spitzendurchmesser d und der halbe Öffnungswinkel des Konus α . Die gemessene Topographie (grau) kann dadurch von der realen Topographie (schwarz) abweichen..... 67

Abbildung 2.26: a) Bei der aperturbasierenden SNOM wird das evaneszente Feld durch die Apertur an der Spitze der submikroskopischen Lichtquelle erzeugt. Die Apertur hat hierbei gewöhnlich eine Größe von 50-70 nm ^{165,166} . b) Bei der Streu-SNOM wird die Spitze durch eine normale Lichtquelle (Laser) beleuchtet. Dabei entsteht an der Metallspitze ein evaneszentes Feld.	69
Abbildung 2.27: Schematische Darstellung des Ätzzvorgangs eines Metalldrahtes für dessen Verwendung als STM- oder TERS-Spitze.....	72
Abbildung 2.28: SEM-Abbildungen einer mit Silber bedampfter AFM-Spitze.....	73
Abbildung 2.29: Schematische Darstellung eines TERS-Aufbaus in Reflexionsgeometrie (a) und in Transmission (b).....	74
Abbildung 2.30: Schematische Darstellung eines TERS-Setups. a) Das Raman-Mikroskop wird um das AFM erweitert. b) Das AFM besteht bei einem TERS-Setup aus einem Probenstück und einem Rasterkraftmikroskop. Beide können sich Piezo-betrieben in x,y und z-Dimension bewegen.....	75
Abbildung 2.31: Durch das Rastern des Cantilevers durch den Laserfokus lässt sich anhand des zurückgestreuten Lichtes die TERS-Spitze lokalisieren. A) verdeutlicht schematisch das Rastern ¹⁸³ und B) veranschaulicht die Lokalisierung der TERS-Spitze mit unterschiedlich räumlicher Auflösung.	76
Abbildung 2.32: (A) 3-dimensionale Darstellung der Punktwolke eines Datensatzes. (B) Festlegung eines neuen Koordinatensystems entlang der größten Varianz im Datensatz und anschließende Neukonstruktion des Datenraumes (C). (D) „Score“-Plot der beiden ersten Hauptkomponenten verdeutlicht die Unterteilung des Datensatzes in 3 Gruppen.....	79
Abbildung 2.33: Darstellung eines Datensatzes im 3-dimensionalen Raum. Jeder Punkt in der Datenwolke entspricht einem Spektrum. Das vom N-FINDR gebildete Simplex ist schematisch mit den entsprechenden „endmembers“ eingezeichnet.	81
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des für die RT-PCR verwendeten Temperaturprofils.....	84
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des CARS-Systems nach Vogler et al. (2010) ¹¹⁴	87
Abbildung 4.1: Auf Deckgläschen fixierte und mit FITC mouse anti human Cd51/CD61 angefärbte HT29-Zellen der Kontrollgruppe. Die Pfeile markieren Integrin-Aggregate auf der Zelloberfläche. Der Skalierbalken entspricht 10 µm.....	92
Abbildung 4.2: Anfärbung (FITC mouse anti human Cd51/CD61) von LPS-aktivierten HT29-Zellen fixiert auf Deckgläschen. Die neben der generellen Integrinverteilung auftretenden Aggregate sind durch Pfeile gekennzeichnet. (Skalierung 10 µm)	92

- Abbildung 4.3: Basislinien-korrigierter Verlauf der Fluoreszenzkurven der SYBR green I RT-PCR für die untersuchten Zielproteine ITGAV (A), ITGB3 (B), ITGB5 (C) und SPP1 (D). Vergleichend dargestellt sind die Kurven der Kontrollgruppe (schwarz) und LPS-aktivierten Gruppe (rot)..... 94
- Abbildung 4.4: Die Normierung der Fluoreszenz bzw. die logarithmische Darstellung der Fluoreszenz ermöglicht die Bestimmung des ct-Wertes für jede Amplifikationskurve bei einem Schwellenwert von 0.0019..... 95
- Abbildung 4.5: Ermittlung des ct-Mittelwertes \pm SD für die untersuchten Ziel- und Referenzgene der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe (LPS): Integrin $\alpha_v\beta_3$ (ITGAV), Integrin $\alpha_v\beta_3$ (ITGB3), Integrin $\alpha_v\beta_5$ (ITGB5), Osteopontin (SPP1) und β -Actin (bet act)..... 95
- Abbildung 4.6: Relative Veränderung der Genexpression nach LPS-Behandlung. Während SPP1 verstärkt exprimiert wird (160x), lässt sich bei ITGAV und ITGB5 lediglich eine kleine Zunahme feststellen. ITGB3 kann als nicht signifikant betrachtet werden. 96
- Abbildung 4.7: Beurteilung der Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte ITGAV (A), ITGB3 (B), ITGB5 (C) und SPP1 (D) mittels Schmelzkurvenanalyse. Kontrollgruppe (schwarz) und LPS-aktivierte Gruppe (rot). 98
- Abbildung 4.8: Beurteilung der Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte ITGAV (A), ITGB3 (B), ITGB5 (C) und SPP1 (D) mittels Gelelektrophorese. Die Größe der Markerbanden ist in Basenpaaren (bp) zum Vergleich angegeben. 100
- Abbildung 4.9: Optische Darstellung der Messbereiche einer Probe der Kontrollgruppe (A) und der LPS-Gruppe (B). Alle vermessenen Areale beinhalten zwischen 100 und 150 Zellen pro Messung. Die Skalierung (weiß) beträgt 100 μ m..... 101
- Abbildung 4.10: Gemessenes IR-Spektrum der Kontrollgruppe mit RMieSc-Effekten (A). Im Vergleich dazu das nach der Korrektur mit Hilfe des von Paul Bassan entwickelten Algorithmusses erhaltene Absorptionsspektrum nach 20 Wiederholungen (B)..... 103
- Abbildung 4.11: Vergleich der RMieSc-Korrektur mit 11 (rot) bzw 20 Iterationen (schwarz) von ein und demselben gemessenen IR-Spektrum. Anpassungen der Bandenintensität im Fingerprintbereich und Veränderung der Bandenform der Amid A-Bande lassen sich deutlich erkennen..... 104
- Abbildung 4.12: Darstellung der score plots (A – C) und der loadings (D) als Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse der FTIR-Daten. Der Datensatz setzt sich aus 29 Kontrollmessungen (rot) und 30 Messungen der LPS behandelten Zellen (blau) zusammen, wobei jede Messung 100 – 150 vermessene Zellen beinhaltet. 105

- Abbildung 4.13: Der Median (50. Perzentil; schwarz), das 5. Perzentil und das 95. Perzentil wurden für die Kontrollgruppe (A) und für die LPS-behandelte Gruppe (B) errechnet. Biologisch relevante Markerbanden wurden gekennzeichnet..... 106
- Abbildung 4.14: Differenzspektrum (HT29 minus HT29 + LPS) berechnet aus dem 95. Perzentil beider Gruppen. Die stärksten spektralen Variationen sind gekennzeichnet und wurden chemischen Komponenten zugeordnet (Tab. 4.2). Deutlich lassen sich LPS-induzierte Veränderungen erkennen..... 107
- Abbildung 4.15: Optische Darstellung der für die Ramanuntersuchung vermessenen Proben. Untersuchte Zellen sind weiß hervorgehoben. Die Skalierung (weiß) beträgt $20\mu\text{m}$ 109
- Abbildung 4.16: Intensitätsverteilung der Bande der Ringatmung von Phenylalanin bei 1003 cm^{-1} . Verteilung bei HT29-Zellen (A – D) und LPS behandelten HT29-Zellen (E – I) . Der Skalierbalken entspricht $3\mu\text{m}$ 110
- Abbildung 4.17: Ergebnis der Clusteranalyse eines Ramandatensatzes. Die abgebildete Falsch-Farben-Karte liefert die räumliche Verteilung der einzelnen Cluster. In Kombination mit den dargestellten Mittelwertsspektren der einzelnen Cluster lassen sich die Cluster entweder dem Substrat oder der Zelle zuordnen. 111
- Abbildung 4.18: Falsch-Farben-Darstellung und dazugehörige Mittelwertsspektren einer sich in der Mitose befindenden Zelle. 112
- Abbildung 4.19: Trainingsergebnisse der auf die Ramadaten angewandten SVM. Dargestellt sind neben der Richtigkeit der Vorhersage sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität..... 113
- Abbildung 4.20: Ergebnisse der während der SVM-Analyse durchgeführten Tests der zuvor trainierten Modelle. Dargestellt sind neben der Richtigkeit der Vorhersage, die Sensitivität und die Spezifität..... 113
- Abbildung 4.21: Box-Whisker-Plots der statistischen Verteilung der SVM-Ergebnisse für das Training der Modelle und der daraus resultierenden Vorhersage. 115
- Abbildung 4.22: A) Mittelwertsspektren der mit Raman-Spektroskopie untersuchten Zellen der Kontrollgruppe (schwarz) und der mit LPS-behandelten Gruppe (rot) mit gekennzeichneten, biologisch relevanten Markerbanden. B) Differenzspektrum der in A) dargestellten Mittelwertsspektren (HT29 minus HT29 LPS). Die spektralen Unterschiede sind markiert und wurden chemischen Komponenten zugeordnet (Tab. 4.3). 116
- Abbildung 4.23: Darstellung der unbehandelten Intensitätsverteilung des CARS-Signals bei 2806 cm^{-1} für Kontrollgruppe (A) und LPS-behandelte Gruppe (B)..... 120

-
- Abbildung 4.24: Falsch-Farben-Darstellung der normierten Intensitätsverteilung des CARS-Signals bei 2806 cm^{-1} für Kontrollgruppe (A) und LPS-behandelte Gruppe (B)..... 120
- Abbildung 4.25: Wellenlängenabhängiges Intensitätsprofil der HT29 (A) und der HT29-LPS-Gruppe (B) durch Integration der Intensität des CARS-Signals eines jeden Pixels errechnet..... 121
- Abbildung 4.26: A) AFM-Topographie einer auf Deckglas fixierten HT29-Zelle ($20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, Kontrollgruppe). Das mit TERS untersuchte Gebiet auf der Zelloberfläche wird durch das schwarze Quadrat veranschaulicht. Der Ort, an dem die Kontaminationskontrolle durchgeführt wurde, wird durch das weiße Sternchen gekennzeichnet. B) Für die TERS-Messung gitterförmig angeordnete Messpunkte (10×10 Punkte) auf einer Fläche von $270\text{nm} \times 162\text{nm}$ 123
- Abbildung 4.27: Unbehandelte Rohdaten der TERS-Messung auf einer HT29-Zelle (Kontrollgruppe). 124
- Abbildung 4.28: Raman- und TERS-Spektrum einer HT29-Zelle. Das konventionelle Raman- Spektrum (1) wurde verwendet, um eine Hintergrundkorrektur des gemessenen TERS-Spektrums (3) durchzuführen. (4) Korrigiertes TERS-Spektrum (resultierend aus der Subtraktion von Spektrum 3 – 1. (2) TERS-Kontrollspektrum neben der Zelle auf Glas. Alle Spektren wurden mit 5s aufgenommen. Die Si-Bande der TERS-Spitze ist durch das schwarze Sternchen gekennzeichnet. 125
- Abbildung 4.29: Darstellung der Verteilung der durch die HCA gewonnenen Cluster (A) und die dazugehörigen Mittelwertsspektren des jeweiligen Gebietes (B)..... 126
- Abbildung 4.30: Graphische Darstellung der abgedeckten spektralen Varianz bei variierender Anzahl von Endmitgliedern..... 128
- Abbildung 4.31: Schematische Darstellung der Lage der 9 Endmember innerhalb des analysierten Areals. Alle Endmember sind durchgängig nummeriert und wurden mit dem „input“-Spektrum des jeweiligen Messpunktes verglichen. 129
- Abbildung 4.32: Verifizierung der Datenanalyse mit 9 Endmitgliedern. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebnis der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 9) am oberen Rand der jeweiligen Graphen..... 130
- Abbildung 4.33: Positive Validierung der Datenanalyse mit 10 Endmitgliedern. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebniss der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 10) am oberen Rand der jeweiligen Graphen. 131

Abbildung 4.34: Schematische Darstellung der Messpunkte und der für die Validierung verwendeten Punkte (B; rot und blau unterlegt). Beide Areale beinhalten einen Endmember (rotes bzw. blaues Kreuz). A+C) Die „input“-Spektren (schwarz) wurden mit den korrelierenden Linearkombinationen (rot) verglichen. Alle Spektren wurden auf die gleiche Intensität skaliert.	133
Abbildung 4.35: Illustration der durch die N-FINDR-Analyse bestimmten Endmemberverteilung (A + B) und der TERS-Spektren (B + D) der jeweiligen Endmember. Die Einsätze zeigen zur besseren Veranschaulichung jedes Spektrum vergrößert im Bereich von 1500 – 500cm ⁻¹ . ²³	134
Abbildung 4.36: Verteilung von Domänen mit hohem Lipid- (grün) und Proteingehalt (rot) auf der Zellmembran. Areal B (90 x 90nm) stellt einen erneut gemessenen Ausschnitt mit verringertem Messpunktabstand von Areal A (270 x 162nm). Blau kennzeichnet Domänen mit vergleichbarem Protein- und Lipidgehalt. ²³	140
Abbildung 4.37: A) AFM-Topographie einer mit LPS behandelte HT29-Zelle fixiert auf Deckgläschen (13µm x 13µm). Das mit TERS untersuchte Gebiet auf der Zelloberfläche wird durch das schwarze Quadrat veranschaulicht. Der Ort, an dem die Kontaminationskontrolle durchgeführt wurde, wird durch das weiße Sternchen gekennzeichnet. B) Das gesetzte Messgitter besteht aus 10 x 10 Messpunkten auf einer Fläche von 90nm x 90nm.	142
Abbildung 4.38: Verteilung von Domänen mit hohem Lipid- (grün) und Proteingehalt (rot) auf der Zellmembran der Kontrollgruppe (Areal B) und der LPS-behandelten Gruppe (Areal C). Beide Messungen entsprechen 90 x 90nm. Blau kennzeichnen sind Domänen mit gleichem Protein- und Lipidgehalt.	143
Abbildung A.1: Ergebnisse der Clusteranalyse aller Zellen der Kontrollgruppe.	178
Abbildung A.2: Darstellung der Ergebnisse der Clusteranalyse der LPS-behandelten Zellgruppe.	179
Abbildung A.3: Darstellung der unbehandelten Intensitätsverteilung der CARS-Signale von 2686 bis 2962 cm ⁻¹ (siehe Tabelle 4.4) der Kontrollgruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten mit identischer Skalierung).	180
Abbildung A.4: Unbehandelte Intensitätsverteilung der CARS-Signale von 2686 bis 2962 cm ⁻¹ (siehe Tabelle 4.4) der LPS-Ggruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten mit identischer Skalierung).	181
Abbildung A.5: Falsch-Farben-Darstellung der normierten Intensitätsverteilung des CARS-Signals der für die in Tabelle 4.4 notierten Wellenlänge der Kontrollgruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten).	182

-
- Abbildung A.6: Normierte Intensitätsverteilung der CARS-Signale als Falsch-Farben-Darstellung für die in Tabelle 4.4 notierten Wellenlängen der LPS-Gruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten). 183
- Abbildung A.7: Validierung der Endmemberanzahl 10 des Areals B. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebniss der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 10). 184
- Abbildung A.8: Darstellung der durch die N-FINDR-Analyse bestimmten Endmemberverteilung (A, C, E) und der TERS-Spektren (B + D + F) der jeweiligen Endmember von Areal B. Die Einsätze zeigen zur besseren Veranschaulichung jedes Spektrum vergrößert im Bereich von 1500 – 500cm⁻¹. 185
- Abbildung A.9: Positive Validierung der Endmemberanzahl für den Datensatz des Areals C mit 10 Endmembers. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebniss der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 10). 187
- Abbildung A.10: Ergebnisse der N-FINDR-Analyse der Untersuchung der Zellmembran einer mit LPS-behandelten HT29-Zelle (Areal C). Dargestellt sind die Endmemberverteilung (A - C) und die TERS-Spektren (D - F) der jeweiligen Endmember von Areal C. 188

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Basensequenz der verwendeten Primer.....	83
Tabelle 3.2: Basensequenz der möglichen Referenzgene.....	83
Tabelle 4.1: Mittels Schmelzkurven bestimmte Schmelztemperaturen der Amplifikationsprodukte der durchgeführten PCR.....	99
Tabelle 4.2: Zuordnung der im FTIR-Differenzspektrum zwischen Kontrollgruppe und LPS-behandelter Gruppe auftretenden Banden auf Referenzen basierend ^{226-228,233}	108
Tabelle 4.3: Bandenzuordnung der im Raman-Differenzspektrum (HT29 minus HT29 LPS) auftretenden Banden ^{106,189,227,228,238-242}	117
Tabelle 4.4: Liste der spektralen Bereiche des CARS Experiments, bei denen Spektren aufgenommen wurden. Siehe Anhang für die graphische Darstellung der einzelnen Abbildungen.....	119
Tabelle 4.5: Bandenzuordnung der TERS-Spektren (Kontrollgruppe) Areal A Abb. 4.37	136
Tabelle A.1: Bandenzuordnung der TERS-Spektren (Kontrollgruppe) Areal B dargestellt in Abb. 4.37.....	186
Tabelle A.2: Bandenzuordnung der TERS-Spektren (LPS-behandelt) Areal C dargestellt in Abb. 4.39.....	189

A. Anhang

I. Weitere Abbildungen

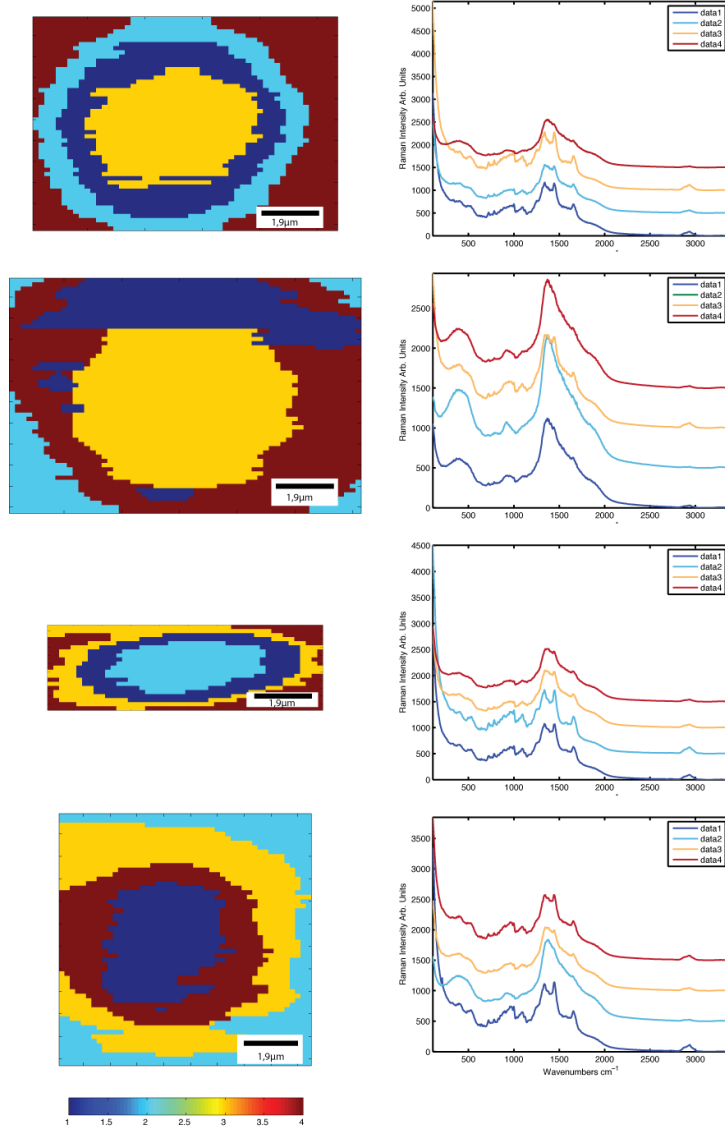


Abbildung A.1: Ergebnisse der Clusteranalyse aller Zellen der Kontrollgruppe.

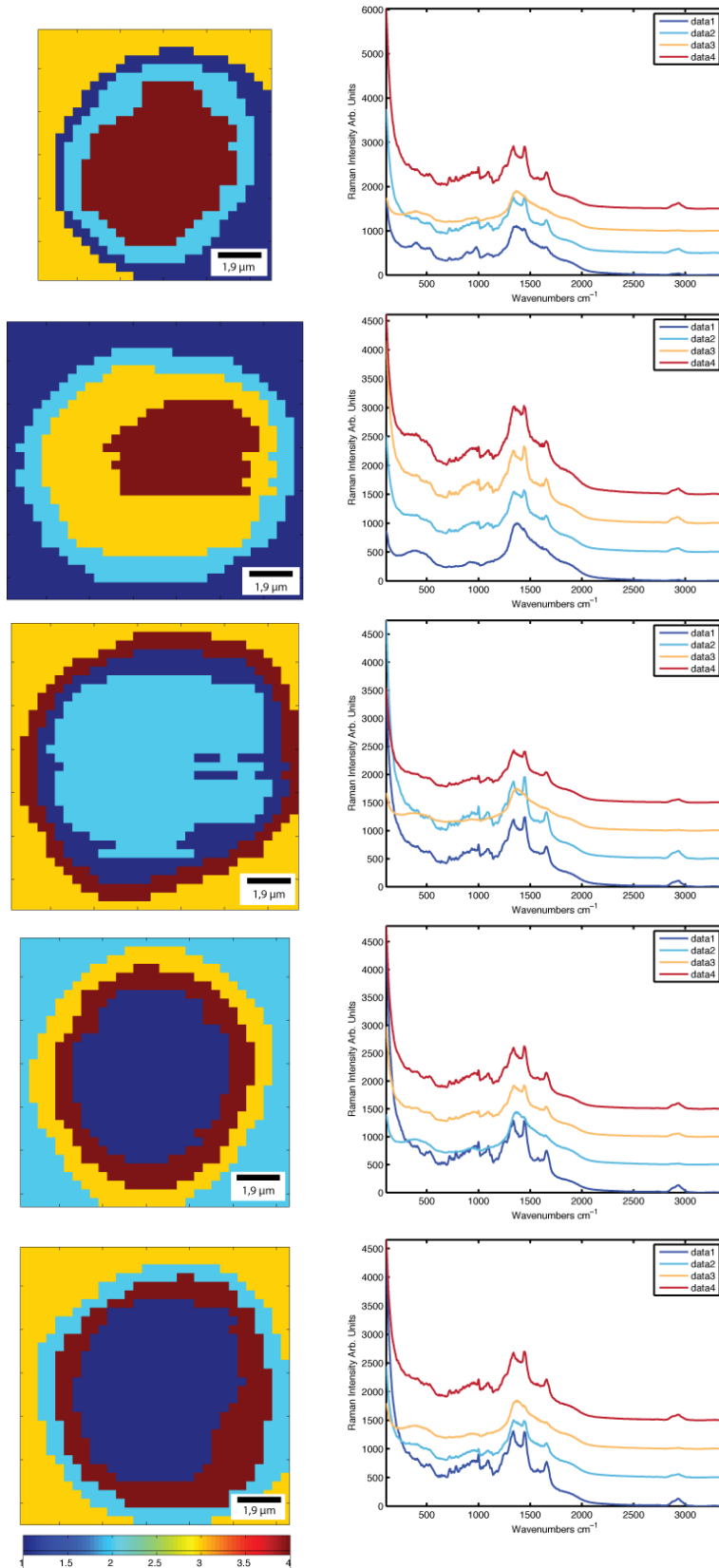


Abbildung A.2: Darstellung der Ergebnisse der Clusteranalyse der LPS-behandelten Zellgruppe.

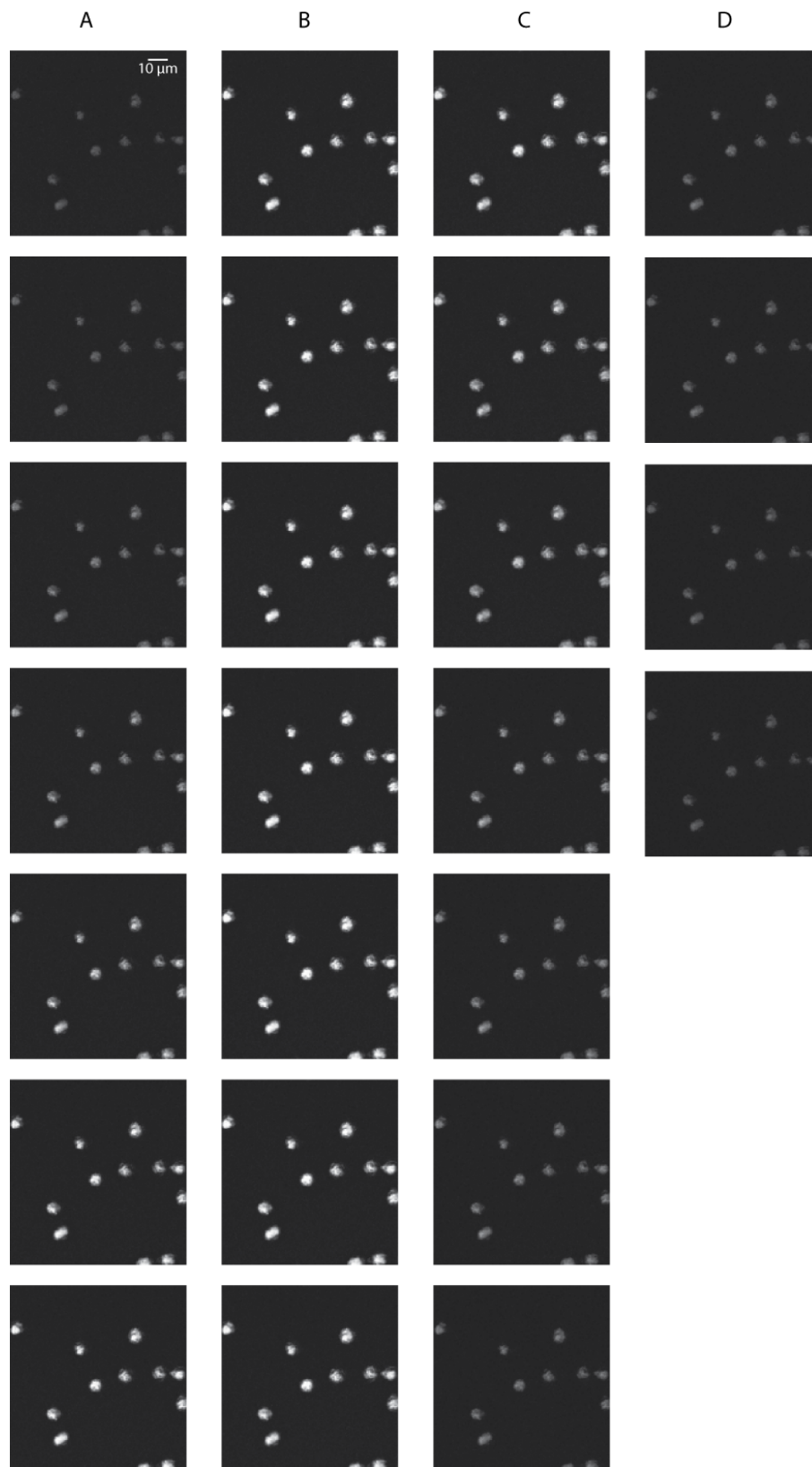


Abbildung A.3: Darstellung der unbehandelten Intensitätsverteilung der CARS-Signale von 2686 bis 2962 cm^{-1} (siehe Tabelle 4.4) der Kontrollgruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten mit identischer Skalierung).

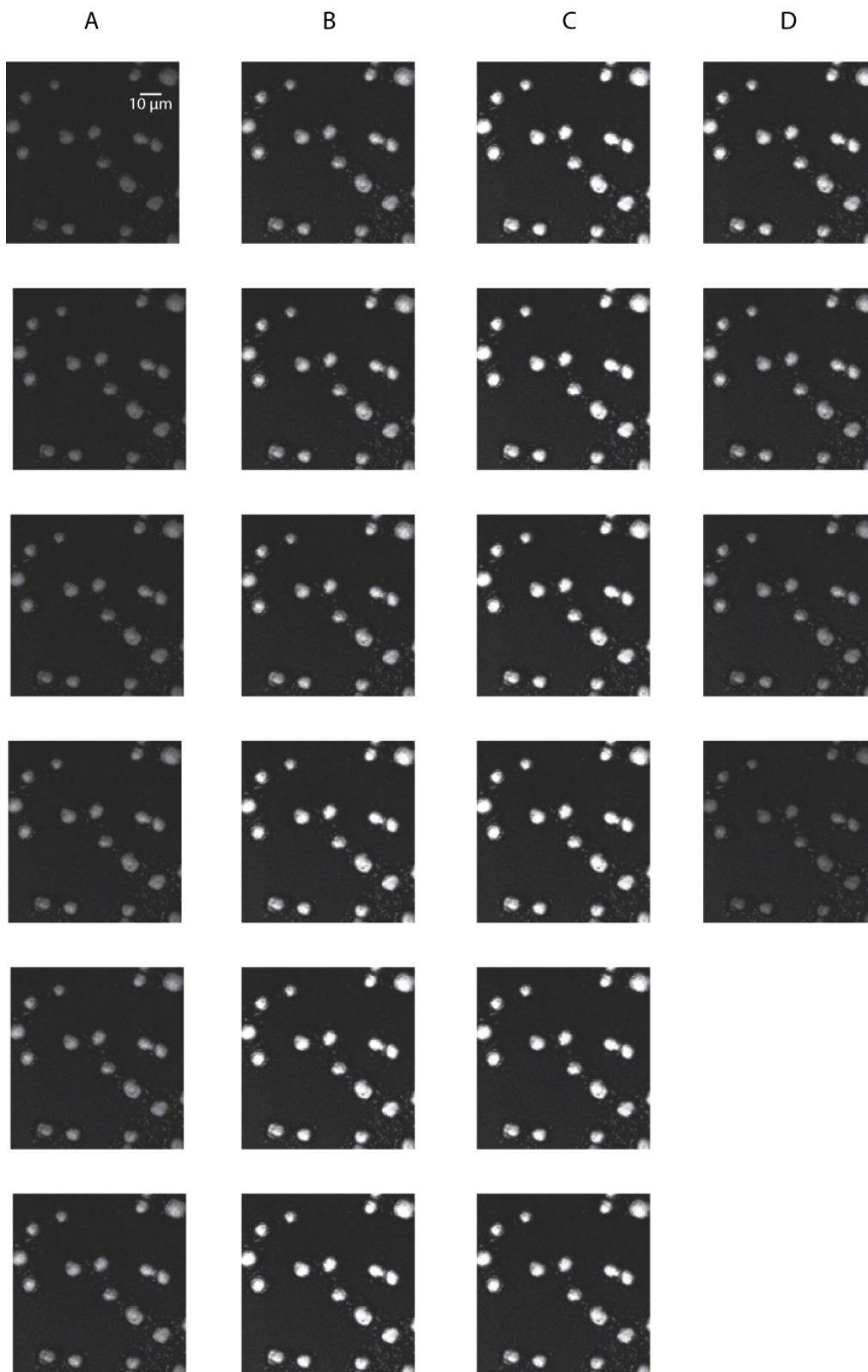


Abbildung A.4: Unbehandelte Intensitätsverteilung der CARS-Signale von 2686 bis 2962 cm^{-1} (siehe Tabelle 4.4) der LPS-Gruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten mit identischer Skalierung).

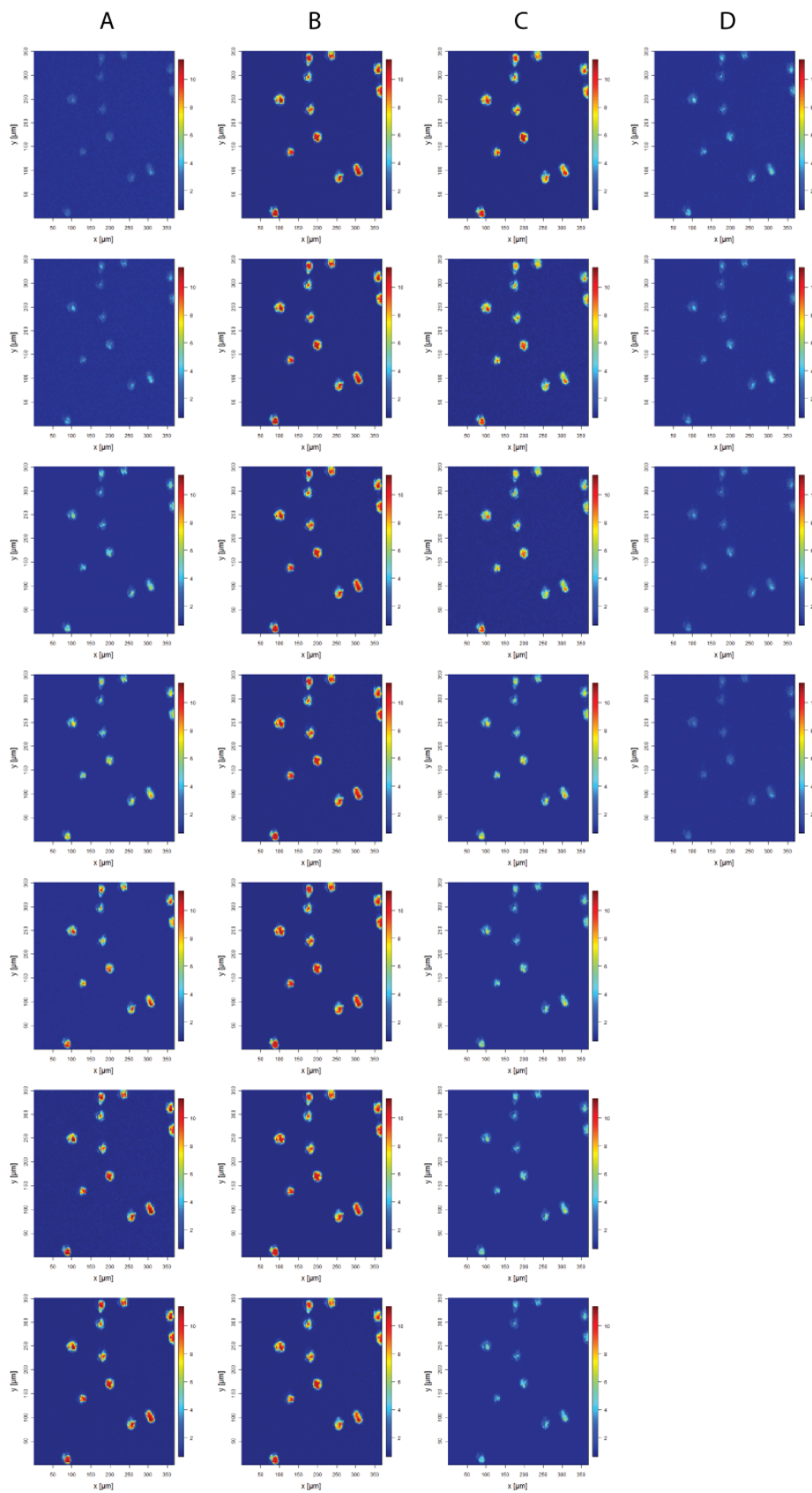


Abbildung A.5: Falsch-Farben-Darstellung der normierten Intensitätsverteilung des CARS-Signals der für die in Tabelle 4.4 notierten Wellenlänge der Kontrollgruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten).

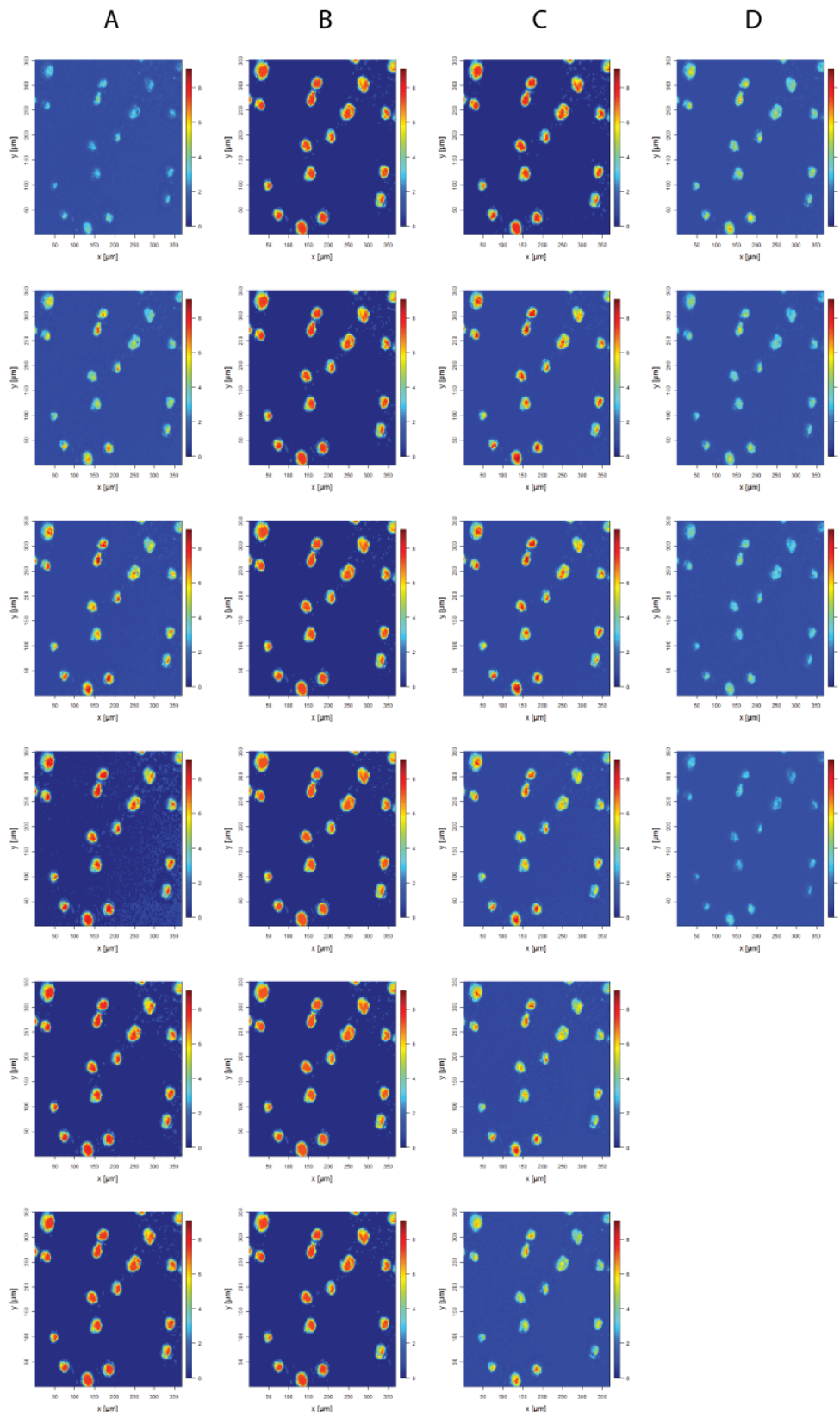


Abbildung A.6: Normierte Intensitätsverteilung der CARS-Signale als Falsch-Farben-Darstellung für die in Tabelle 4.4 notierten Wellenlängen der LPS-Gruppe (Reihenfolge: Von A nach D, jeweils von oben nach unten).

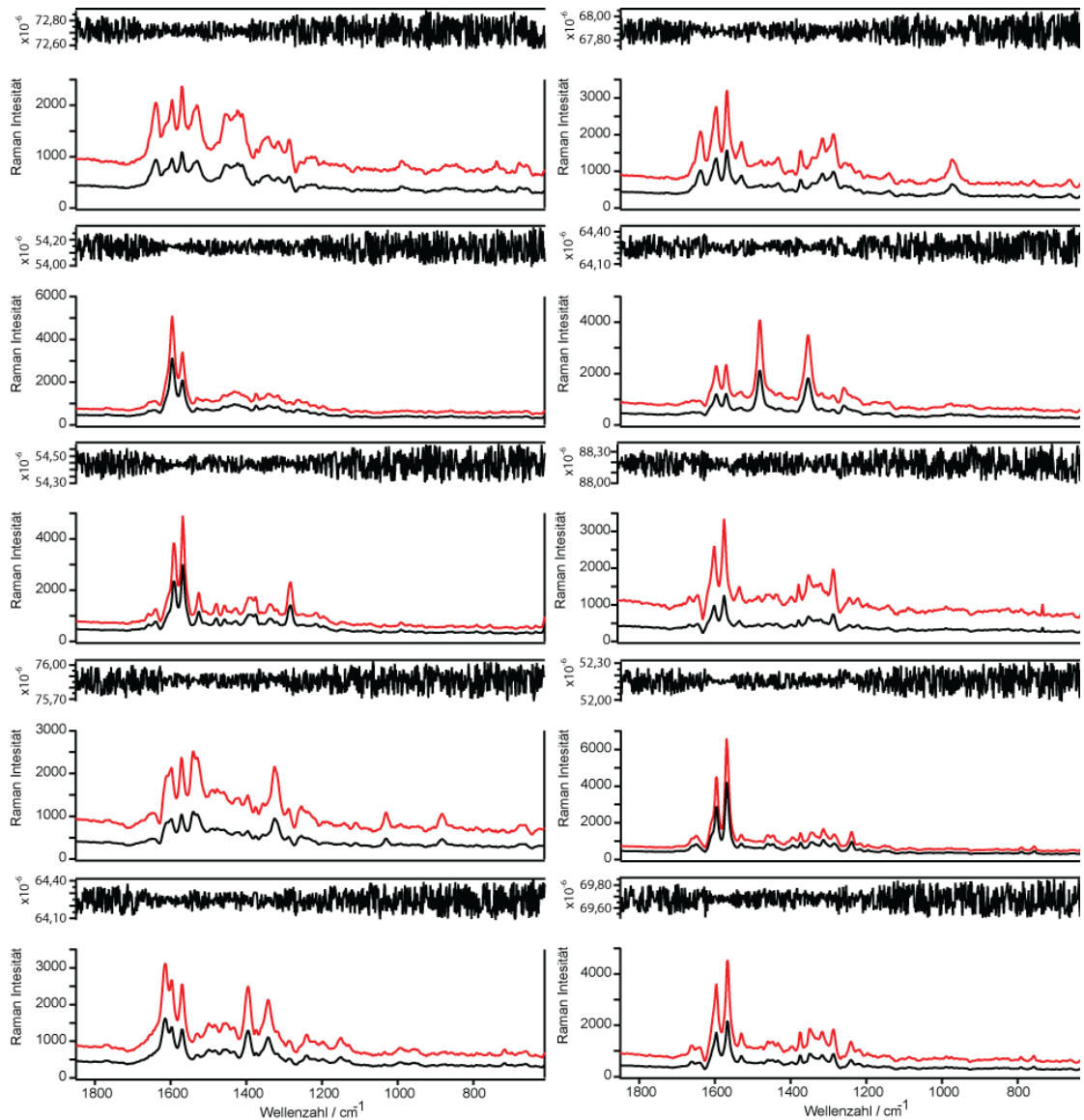


Abbildung A.7: Validierung der Endmemberanzahl 10 des Areals B. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebnis der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 10).

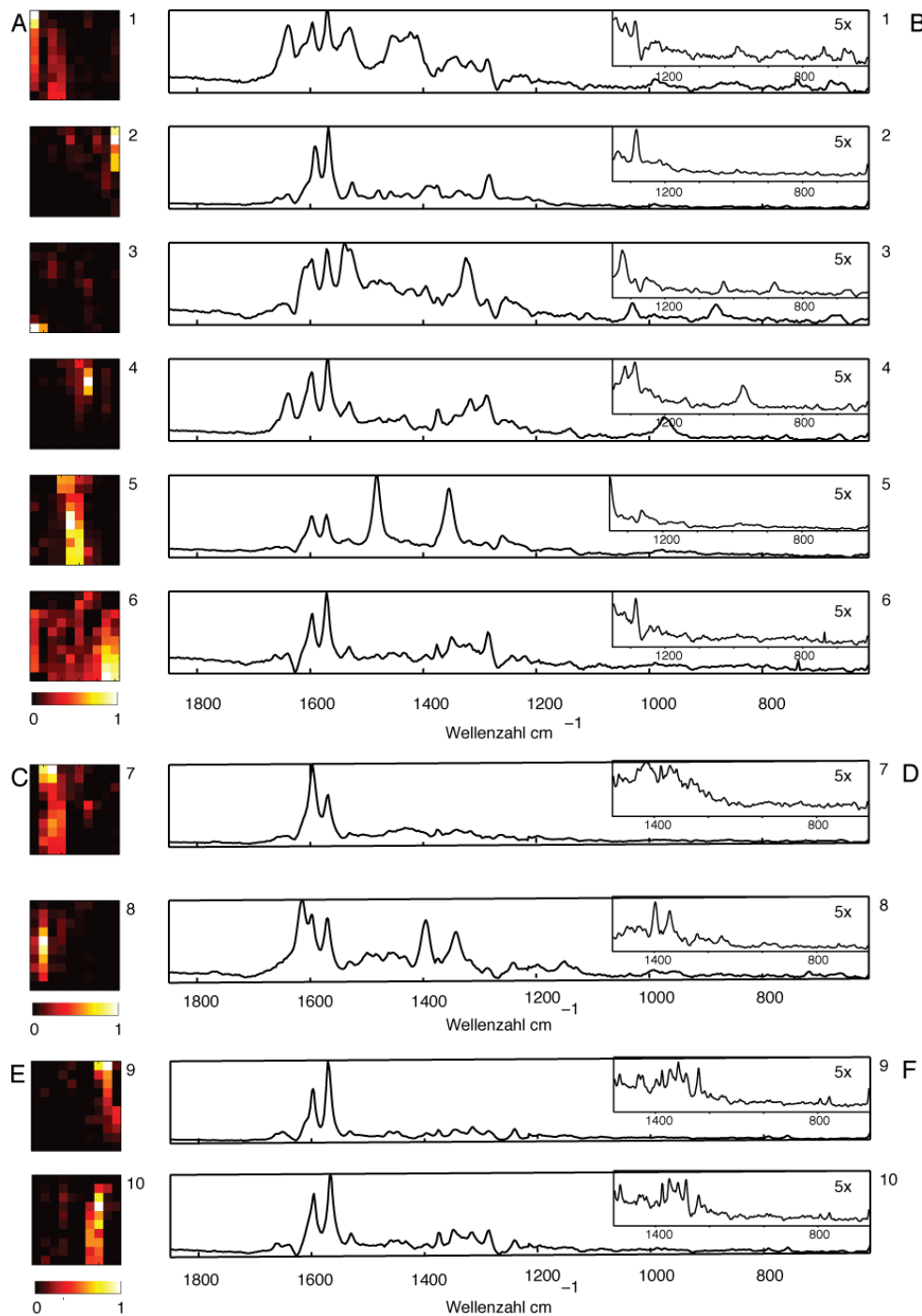


Abbildung A.8: Darstellung der durch die N-FINDR-Analyse bestimmten Endmemberverteilung (A, C, E) und der TERS-Spektren (B + D + F) der jeweiligen Endmember von Areal B. Die Einsätze zeigen zur besseren Veranschaulichung jedes Spektrum vergrößert im Bereich von 1500 - 500cm⁻¹.

Tabelle A.1: Bandenzuordnung der TERS-Spektren (Kontrollgruppe) Areal B dargestellt in Abb. 4.37

Endmember										Zuordnung ref 44 suppl
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		1763						1770	1766	
		1725	1727	1725				1725		$\nu(\text{C}=\text{O})$
	1658			1660	1661	1661	1661			Amid I α -Helix, $\nu(\text{C}=\text{O})$, ungesättigte Fettsäure C=C
								1657		Amid I α -Helix, Amid I $\nu(\text{C}=\text{C})$
1638	1638	1648	1638	1642	1640		1651	1640	1640	Amid I α -Helix, $\nu(\text{C}=\text{O})$ Amid gebunden an NH_2 in plane
									1614	Amid I α -Helix C=C aromatisch
1596	1591	1597	1597	1597	1596	1597	1596	1596	1597	C=C aromatisch
	1580									$\nu(\text{C}=\text{C})$
1571		1571	1570	1571	1571	1571			1570	C=C Lipid, Amid II
								1566		Amid II, Phe, Trp
									1568	Amid II C=N
		1540								Amid II, Trp
1530			1530	1533	1532	1532	1530	1530	1530	Amid II, NH def vib
	1525									Amid II NH β -form Kette
								1506	1499	Amid II, Trp
		1479	1488		1483	1482				Amide II, $\nu(\text{C}=\text{C})$ aromatisch
		1476	1478				1478			Amide II, $\tau(\text{NH})$ in plane
	1458	1458	1461				1460	1460	1460	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
1455					1452				1453	$\delta(\text{CH}_2)$
						1447	1447			$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$ der Lipidmethylgruppe, Phospholipid
			1433	1435				1432	1433	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, Phospholipid
1424	1427		1427							$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
		1420								$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, Trp (Indol NH in plane), $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
		1396				1396	1396		1396	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ Lipid, Trp, $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1373	1376	1374	1373		1394	1376	1374	1374	1372	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, $\rho(\text{CH}_3)$ Methyl gebunden in Membran
	1360									COO^-
		1353		1355	1350	1346	1350			$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ Lipid
1342			1343					1340	1341	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, Trp CH
	1337									$\delta(\text{CH}_2)$ Trp
		1325								$\delta(\text{CH}_2)$ Lipid
1315	1320		1317	1319	1319	1315	1315	1315	1317	$\rho_{\text{w}}(\text{CH}_2)$ Lipid
1287	1283	1287	1287	1289	1286	1286	1286	1283	1286	Amid III α -Helix
1256	1251	1253	1255	1260				1263		Amid III zufällige Anordnung
			1243		1243	1240	1242	1240	1240	Amid III ungeordnet
1219	1217		1219		1219	1217	1218	1219	1219	CH_2 , $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$ Lipid
	1196				1196	1196	1196	1197	1197	$\rho(\text{NH})$ in plane
	1150							1151	1150	$\nu(\text{CO})$ der $-\text{CR}_2\text{OH}$ Gruppe Lipid
1143		1140	1140	1140	1141				1141	sec. and tert. Amine CH_2 - N, C-O Lipid
		1110								$\nu(\text{C}-\text{C})$ Lipid; His Ring $\nu(\text{C}=\text{N})$ $\delta(\text{CH})$
					1087	1087	1086	1087		$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2)$
	1071									Lipidkopfgruppe
991	1035	1030			990				1035	Phe C-H in-plane
	991						987		994	Phe C-C
			974	977						His C-C, C-N, C-C Rückgrat β -Faltblatt
									954	
		881							917	C=CH ₂ Lipidende
										Pc $\nu_{\text{as}}(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$, Trp Hydroxyprolin
845					826				858	Tyr CCH aliphatisch
										freiliegendes Tyrosin, $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2)$ Lipid
		798								
789	792		792		792	792	792	756	758	CH_2 Lipid
	756		758			758	758			Trp Ringatmung, CH_2 Lipid
740					736					Cholin, Sphingomyelin
									712	Sphingomyelin, Pc
			699						699	Cholesterol Ring, CH_2
679				683						C-H out of plane, cis -CH=CH-
		669	664						661	
659	659				657			659		cis -CH=CH-
	635									Phe
			624							Amid IV NC=O, His Ring, Phe

v strecken, **ρ** biegen, **τ** Torsion, **δ** deformieren, **s** symmetrisch, **as** asymmetrisch, **t** twisting, **w** wagging, **Phe** Phenylalanin, **Tyr** Tyrosin, **Trp** Tryptophan, **His** Histidin, **Pc** Phosphatidylcholin

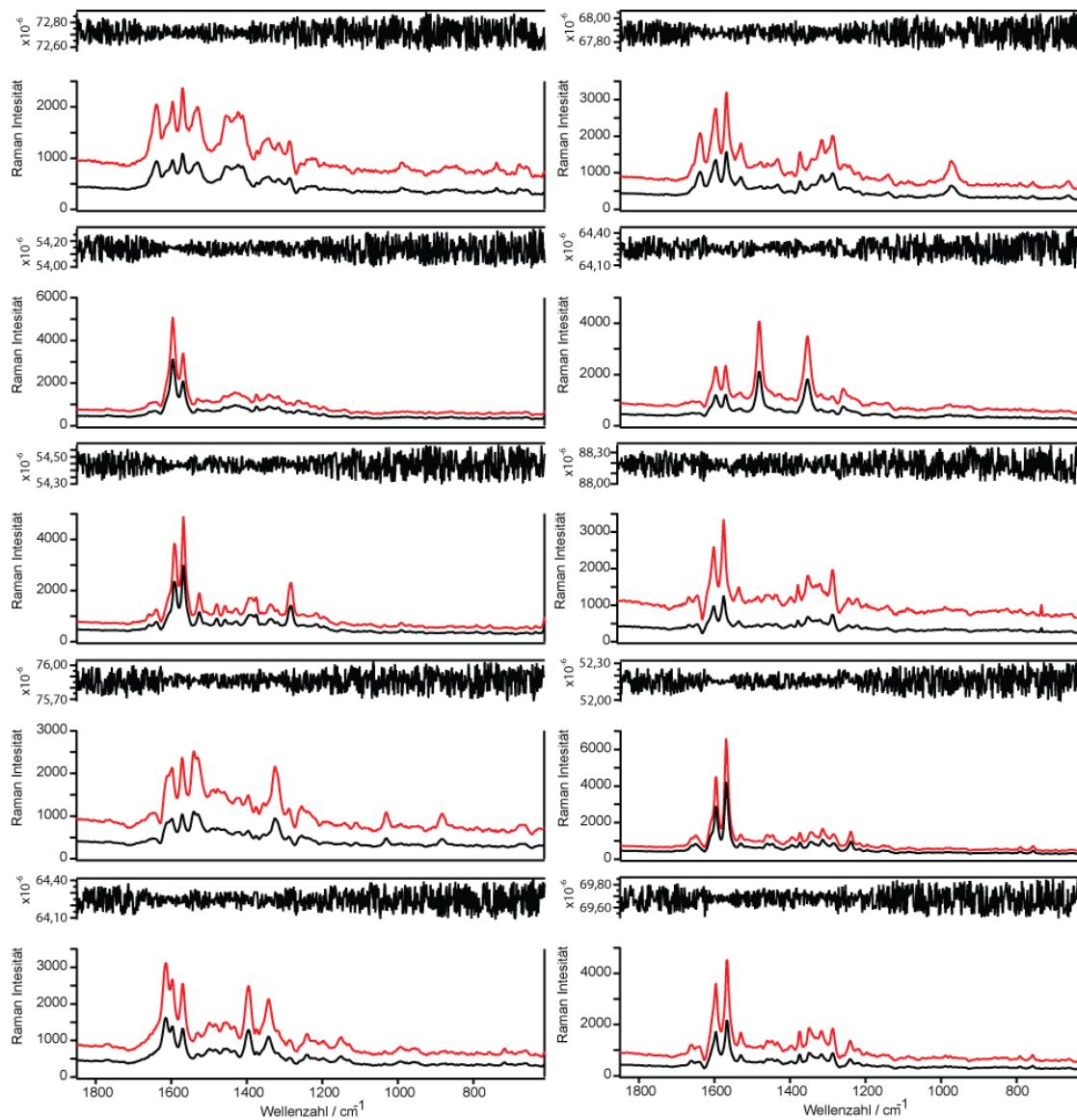


Abbildung A.9: Positive Validierung der Endmemberanzahl für den Datensatz des Areals C mit 10 Endmembers. Dargestellt sind die „output“-Spektren (Endmemberspektrum, rot), die „input“-Spektren (Hintergrundkorrigiertes TERS-Spektrum, schwarz) und das Ergebnis der Division beider Spektrentypen des jeweiligen Endmembers (Endmember 1 – 10).

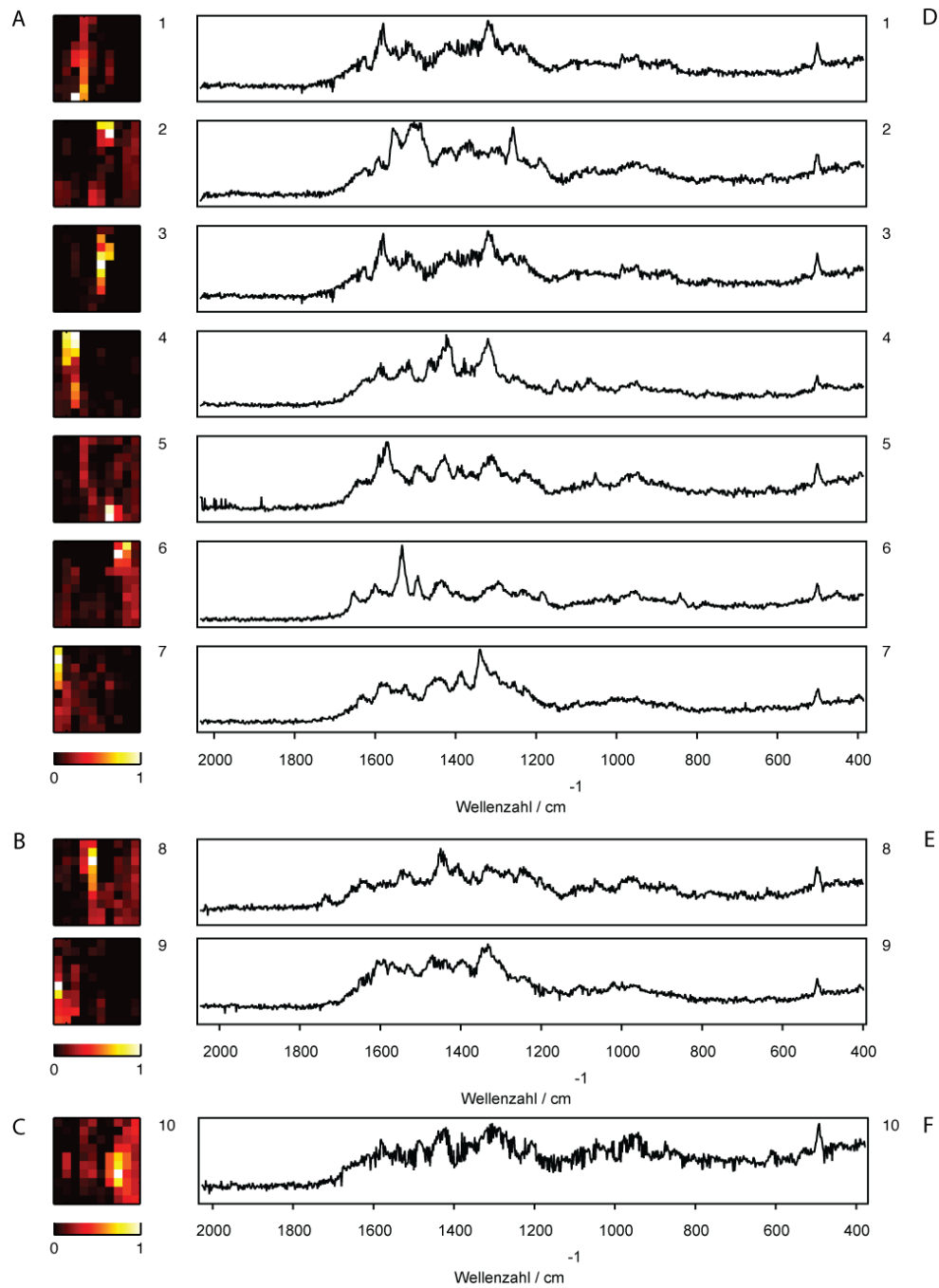


Abbildung A.10: Ergebnisse der N-FINDR-Analyse der Untersuchung der Zellmembran einer mit LPS-behandelten HT29-Zelle (Areal C). Dargestellt sind die Endmemberverteilung (A - C) und die TERS-Spektren (D - F) der jeweiligen Endmember von Areal C.

Tabelle A.2: Bandenzuordnung der TERS-Spektren (LPS-behandelt) Areal C dargestellt in Abb. 4.39

Endmember										Assignment
1	2	3	4	7	8	10	5	6	9	
					1671		1743	1733		$\nu(\text{C}=\text{O})$
		1660		1662				1656		Amid I β -Faltblatt, Cholesterol C=C
	1647									Amid I α -Helix, $\nu(\text{C}=\text{O})$, ungesättigte Fettsäure C=C
1643		1613	1640		1619	1650				Amid I α -Helix, Amid I $\nu(\text{C}=\text{C})$
	1609		1605			1603			1607	Amid I α -Helix, $\nu(\text{C}=\text{O})$ Amid gebunden an NH_2 in plane
1599				1588		1591		1599		Amid I α -Helix C=C aromatisch
	1574	1578								C=C aromatisch
					1552				1568	C=C Lipid, Amid II
						1546	1549			Amid II C=N
1528	1536	1535		1513	1513			1539		Amide II, Trp
	1508								1513	Amid II, NH def vib
		1480						1477		Amid II, NH def vib
			1447	1447	1455	1456	1456			Amid II
1442		1442							1447	Amid II, $\nu(\text{C}=\text{C})$ aromatisch
	1437									$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
		1432			1412		1412			$\delta(\text{CH}_2)$
			1404	1404			1402		1407	$\delta(\text{CH}_2)$
1385		1398								$\rho(\text{CH}_3)$
			1380							$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, $\rho(\text{CH}_3)$ Methyl gebunden in Membran
										COO^-
								1375		$\nu_s(\text{CH}_3)$ Lipid
										$\nu_s(\text{CH}_3)$ Lipid
		1351					1359			$\nu_s(\text{CH}_3)$, Trp CH
										$\delta(\text{CH}_2)$ Trp
								1340		$\delta(\text{CH}_2)$ Lipid
1338		1338	1329					1338	1332	$\rho_w(\text{CH}_2)$ Lipid
						1319				$\rho_w(\text{CH}_2)$ Lipid
						1313				$\rho_w(\text{CH}_2)$ Lipid
	1310									$\rho_l(\text{CH}_2)$ Lipid
									1279	CH_2 twist in phase lipid, fatty acid
1282		1287					1273			Amid III α -Helix
	1277					1250	1248			Amid III α -Helix
			1264	1248	1253	1250		1250	1248	Amid III zufällige Anordnung
									1234	Amid III zufällige Anordnung
		1217								Amid III β -Faltblatt
	1211							1211		CH_2 , $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2)$ Lipid
					1206					Tyr Ring, Trp C-H Indol
										$\nu(\text{C}-\text{C})$
		1165					1172		1177	Phenylalanine; Formaldehyd CH_2 in plane rock, Tyr
1133										C-O str COH bend, Trp CH indole
		1118				1114				$\nu(\text{C}-\text{C})$ Lipid
										$\nu(\text{C}-\text{C})$ Lipid
			1091						1111	$\nu(\text{C}-\text{C})$ Lipid; His Ring $\nu(\text{C}=\text{N})$ $\delta(\text{CH})$
										$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
				1072			1073		1093	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$
					1038			1027	1073	Lipidkopfgruppe
1005										Phe C-H in-plane
								990	985	Phe Ringatmung
970	970	970	968	967	972					Phe C-C
									968	His C-C, C-N, C-C Rückgrat β -Faltblatt
889									901	$\text{C}_\alpha\text{-C-N}$ (peptide bond)
										Pc $\nu_{\text{as}}(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$, Trp Hydroxyprolin
					861					Tyr CCH aliphatisch
					828					freiliegendes Tyrosin, $\nu_s(\text{PO}_2)$ Lipid
791					798		794			CH_2 Lipid
			784							$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
	779									
								709	698	Sphingomyelin, Pc
										Cholesterol Ring, CH_2
								645		C-H out of plane, cis- $\text{CH}=\text{CH}$ -
			645						639	Tyrosin (skeletal) C-C
	632		636							Phe
557										
520	522	520	520	520	520	518	520	520	520	Si der TERS-Spitze
	474				471					
						418		412		

v strecken, **ρ** biegen, **τ** Torsion, **δ** deformieren, **s** symmetrisch, **as** asymmetrisch, **t** twisting, **w** wagging, **Phe** Phenylalanin, **Tyr** Tyrosin, **Trp** Tryptophan, **His** Histidin, **Pc** Phosphatidylcholin, **Si** Silizium

II. Eigene Veröffentlichungen

II.1. Wissenschaftliche Artikel

Richter, M., Hedegaard, M., Deckert-Gaudig, T., Lampen, P., & Deckert, V. (2011). Laterally Resolved and Direct Spectroscopic Evidence of Nanometer-Sized Lipid and Protein Domains on a Single Cell. *Small*, 7(2), 209–214.

Richter, M.; Bergner, N., Matthäus, C., Krafft, C., Popp, J., Deckert, V. (2011). Label-free detection and multivariate statistical analysis of the cellular response of Lipopolysaccharide treated colon cancer cells (HT29), in preparation

Böhme, R., Cialla, D., Richter, M., Rösch, P., Popp, J., & Deckert, V. (2010). Biochemical imaging below the diffraction limit – probing cellular membrane related structures by tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS). *Journal Of Biophotonics*, 3(7), 455–461.

Böhme, R., Richter, M., Cialla, D., Rösch, P., Deckert, V., & Popp, J. (2009). Towards a specific characterisation of components on a cell surface-combined TERS-investigations of lipids and human cells. *Journal Of Raman Spectroscopy*, vol. 40 (10) pp. 1452-1457.

Deckert, V., Deckert-Gaudig, T., Richter, M., Treffer, R., & Lin, . (2010). Label free investigation of biomolecules on the nanometer scale using tip-enhanced Raman spectroscopy. *Proceedings of SPIE*, 7560. doi: 10.1117/12.851078

II.2. Buchkapitel

Richter, M., & Deckert, V. (2011). Surface and Thin Film Analysis - 31. Scanning Near-Field Optical Microscopy (SNOM). (G. Friedbacher, H. Bubert, & H. Jenett, Eds.) *A Compendium of Principles, Instrumentation, and Applications* (p. 558). Wiley-VCH.

II.3. Auszeichnungen

Posterpreis: 1. Platz SPEC 2010

Posterpreis: 3. Platz SPM Symposium 2009

II.4. Wissenschaftliche Vorträge

„Label-free identification of lipid and protein areas at the nano-meter scale on single cell“, University of Toronto 2011, Toronto, Kanada

„From Raman Spectroscopy to TERS Applications“, Tel Aviv University 2011, Tel Aviv, Israel

„Label-free identification of lipid and protein areas at the nano-meter scale on single cell“, University of Western Ontario 2011, London, Kanada

„From Raman Spectroscopy to TERS Applications“, University of British Columbia 2010, Vancouver, Kanada

„Label-free identification of lipid and protein areas at the nano-meter scale on single cell“, SPEC 2010, Manchester, UK

„Label-free identification of lipid and protein areas at the nano-meter scale on single cell“, P4L Meeting 2010, St. Andrews, UK

„TERS mapping and membrane characterization of single human cell“, PhD Seminar 2010, Jena, Deutschland

„TERS for label-free cell diagnostics“, BMBF Meeting 2009, Jena, Deutschland

„TERS for label-free cell diagnostic“, PhD Seminar 2009, Jena, Deutschland

II.5. Wissenschaftliche Poster

M. Richter, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „Vibrational Spectroscopy Analysis of artificially induced Inflammation“, ANAKON 2011, Zürich, Schweiz

M. Richter, M. Hedegaard, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „Multivariate Analysis of TERS Maps On A Single Human Colon Cancer Cell“, ICORS 2010, Boston, USA

M. Richter, M. Hedegaard, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „TERS mapping for label-free cell diagnostic“, P4L Meeting 2010, ST. Andrews, UK

R. Böhme, M. Richter, M. Mkandawire, U. Krause-Buchholz, P. Rösch, G. Rödel, J. Popp, V. Deckert, „Lipid bilayers and membrane proteins – spectroscopic comparison of cells and model systems on the nanometer scale“, SPEC 2010, Manchester, UK

M. Richter, M. Hedegaard, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „TERS mapping for label-free cell diagnostic“, 7th FTIR workshop 2009, Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland

M. Richter, M. Hedegaard, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „TERS mapping for label-free cell diagnostic“, SPM Symposium 2009, JPK, Berlin, Deutschland

M. Richter, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „Tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) for label-free cell diagnostics“, ANAKON 2009, Berlin, Deutschland

M. Richter, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, „Tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) for label-free cell diagnostics“, Tag der Chemie – TU Dortmund 2009, Dortmund, Deutschland

III. Lebenslauf

von Marc Oliver Richter

seit 05/2009

PhD- Markerfreie Einzelproteinlokalisierung mit Hilfe von TERS; Friedrich-Schiller-Universität (Jena, Deutschland)

Betreuer: PD Dr. Volker Deckert

07/2007 - 4/2009

PhD- Cell surface analysis with tip enhanced Raman scattering (TERS); Institute for Analytical Sciences & Technische University Dortmund (Dortmund, Deutschland)

Betreuer: PD Dr. Volker Deckert

10/2006 - 7/2007

10/2005 - 7/2006

Wessling, Altenberge, Deutschland

Einstellung als Laborant für Umweltanalytik

9/1998 - 7/2005

Westfälische Wilhelms-Universität Münster (Münster, Germany), Diplom in Biologie (Abschluss Juli 2005)

Titel der Diplomarbeit "Analyse des Säure-Basen-Haushaltes bei *Daphnia magna*"

IV. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Berlin, den 20. November 2011

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn PD Dr. Volker Deckert für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und das damit verbundene Vertrauen in einen Biologen. Ich danke ihm außerdem für die bereichernden und produktiven Anregungen während der gesamten Zeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Jürgen Popp für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Tanja Deckert-Gaudig für die stetige Unterstützung im Forscheralltag, die vielen lustigen Stunden, die wissenschaftlichen Gespräche und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Dr. Christian Budich für die zahlreichen „Biologen-Gespräche“, seine Ausdauer im Erklären, die vielen Tipps und Tricks im Umgang mit den Geräten und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für ihre wissenschaftliche Beratung und Unterstützung danke ich ferner Dr. Christian Matthäus und Dr. Christoph Krafft.

Bedanken möchte ich mich recht herzlich bei Dr. Peter Lampen, Dr. Martin Hedegaard und Norbert Bergner für die Geduld, einem Biologen die mathematischen Grundlagen für diese Arbeit zu erklären und auch immer wieder unterstützend tätig gewesen zu sein.

Den Mitgliedern der AG Deckert (René Böhme, Regina Treffer, Katherine Lau, Dr. Melissa Mariani, Jumei Lin, Helmut Herzog, Erika Pulvermacher, Dr. Elena Bailo, Bernhard Gosciniak) danke ich für die gute Zusammenarbeit, die stetige Unterstützung, die wissenschaftlichen Unterhaltungen und das äußerst freundschaftliche Klima.

Auch den Mitarbeitern des IPCs und des IPHTs gebührt mein Dank. Katharina Hartmann, Melanie Putsche, Petra Rösch, Michael Schmitt, Sebastian Dochow, Dana Cialla, Ute Neugebauer und in besonderem Maße:

Nadine Vogler und Gero Bergner für ihre Unterstützung und die wissenschaftlichen Gespräche während der CARS-Messungen.

Anett Reichert und Eileen Heinrich für ihre Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der RT-qPCR-Messungen.

Konstantin Kirsch und Henrik Schneidewind für die Herstellung der TERS-Spitzen.

Nicht zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und hier ganz besonders meiner Frau für ihre Ausdauer und Fürsorge danken.

Es gibt noch eine Vielzahl an Menschen und Freunden, denen ich danke, mich während meiner Promotion begleitet zu haben, denn ohne sie wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Danke!