

Untersuchungen an ausgewählten Brustkrebszelllinien mittels Raman-Mikrospektroskopie und chemometrischen Methoden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena von

Melanie Becker-Putsche, M. Sc.

geboren am 05.09.1980 in Apolda

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Popp
Institut für Physikalische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling
Institut für Humangenetik Core Unit Chip Applikationen, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.12.2013

Für meine Familie



* Rembrandt: Bathsheba with David's letter. The Yorck Project: 10.000 Meisterwerke der Malerei. DVD-ROM, 2002. ISBN 3936122202. Distributed by DIRECTMEDIA Publishing GmbH.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Zusammenfassung	1
1.1 Einleitung und Motivation	1
1.1.1 Krebs - Entstehung, Biologie und Ursachen	1
1.1.2 Aktuelle Statistiken	3
1.1.3 Das Mammakarzinom	4
1.1.4 Raman-spektroskopische Methoden in der medizinischen Forschung	7
1.2 Stand der Forschung	10
1.3 Ziel dieser Arbeit	13
1.4 Eigene Forschungsergebnisse	14
1.4.1 Raman-Mikrospektroskopie - Die Methode der Wahl	14
1.4.2 Voruntersuchungen zur Auswahl der Messparameter	14
1.4.3 Zur Klassifizierung und Identifizierung verschiedener Zelllinien aus Brustgeweben	16
1.4.3.1 Studien zur Identifizierung maligner und “normaler” Brust- drüsenzellen (MCF-7 und MCF-10A) basierend auf zell- kernspezifischen Raman-Spektren [MBP1]	16
1.4.3.2 Zur Klassifizierung verschiedener Brustkrebszelllinien nach krebsspezifischen Aspekten [MBP3]	20
1.4.4 Zur Erforschung der medikamentösen Krebstherapie (Chemothe- rapie) - Studien über den Wirkungsmechanismus und die Effek- tivität von Docetaxel (DCT) am Beispiel der Brustkrebszelllinie MCF-7 [MBP2]	25
1.4.5 Schlussfolgerung und Aussichten	30
Literaturverzeichnis	32
2 Veröffentlichungen	49
2.1 A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis. [MBP1]	53
2.2 A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy. [MBP2]	61
2.3 Electronic Supplementary Material. [MBP2]	71
2.4 Toward improving fine needle aspiration cytology by applying Raman microspectroscopy. [MBP3]	75
Publikationen	84
Danksagung	86

Lebenslauf	88
Selbständigkeitserklärung	89

Abkürzungsverzeichnis

<i>in situ</i>	lat.: am (Ursprungs-)Ort
<i>in vitro</i>	lat.: im Glas
<i>in vivo</i>	lat.: im Lebenden
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANN	<i>artificial neural network</i> , künstliches neuronales Netz
BET	brusterhaltende Therapie
CAF	<i>cancer associated fibroblasts</i> , Tumor-assoziierte Fibroblasten
CARS	<i>coherent anti-stokes Raman spectroscopy</i> , kohärente Anti-Stokes Raman-Spektroskopie
CSCs	<i>cancer stem cells</i> , Krebsstammzellen
DCIS	<i>ductale carcinoma in situ</i> , duktales Karzinom <i>in situ</i>
DCT	Docetaxel, Taxotere [®]
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
ER	Estrogenrezeptoren, Östrogenrezeptor
ERBB2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, alternativ auch HER2/neu
et al.	<i>et alii</i> oder <i>et aliae</i> , lat.: und andere
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FNA	<i>fine needle aspiration</i> , Feinnadelaspiration
FNAB	<i>fine needle aspiration biopsy</i> , Feinnadelaspirationsbiopsie
FP	<i>false positive rate</i> , Falsch-Positiv-Rate, 1-Spezifität
FT	<i>Fourier transform</i> , Fourier-Transformation
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/neu ...	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, alternativ auch ERBB2
IDC	<i>invasive ductale carcinoma</i> , invasives duktales Karzinom
IHC	Immunhistochemie
ILC	<i>invasive lobular carcinoma</i> , invasives lobuläres Karzinom
IR	<i>infrared</i> , Infrarot
LCIS	<i>lobular carcinoma in situ</i> , lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
LDA	<i>linear discriminant analysis</i> , lineare Diskriminanzanalyse
LOO-CV	<i>leave-one-out cross-validation</i> , <i>leave-one-out</i> -Kreuzvalidierung
MCF-10A	Zelllinie der Brust, gutartig
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i> , Brustkrebszelllinie
MDA-MB435 .	Brustkrebszelllinie
Mio.	Million
NA	numerische Apertur

NIR	<i>near infrared</i> , nahes Infrarot, von 780 <i>nm</i> bis 1400 <i>nm</i>
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCA	<i>principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PCs	<i>principal components</i> , Hauptkomponenten
PPV	<i>positive predictive value</i> , positiver Vorhersagewert
PR	Progesteronrezeptor
pTNM	<i>postoperative tumor nodes metastases</i>
RACS	<i>Raman-activated cell sorting</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> , Grenzwertoptimierung
RRS	<i>resonance Raman spectroscopy</i> , Resonanz-Raman-Spektroskopie
SBR	<i>Scarff-Bloom-Richardson</i>
SERRS	<i>surface enhanced resonance Raman scattering</i> , oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie
SERS	<i>surface enhanced Raman spectroscopy</i> , oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie
SORS	<i>spatially offset Raman spectroscopy</i>
SVM	<i>support vector machine</i> , Support Vector Machine
TAM	<i>tumor associated macrophages</i> , Tumor-assoziierte Makrophagen
TERS	<i>tip enhanced Raman spectroscopy</i> , spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie
TGF- β 2	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TME	<i>tumor microenvironment</i> , Tumormikroumgebung
TNM	<i>tumor nodes metastases</i>
TP rate	<i>true positive rate</i> , Richtig-Positiv-Rate, Sensitivität
UICC	Union Internationale Contre le Cancer, Internationale Vereinigung gegen Krebs
UV	<i>ultraviolet</i> , Ultraviolett
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation

Kapitel 1

Zusammenfassung

1.1 Einleitung und Motivation

1.1.1 Krebs - Entstehung, Biologie und Ursachen

Der Begriff *Krebs* umfasst die Variabilität aller malignen (bösartigen) Neoplasien (Gewebe Neubildungen) in lebenden Organismen. Diese malignen Tumoren grenzen sich von den anderen Neoplasien und benignen (gutartigen) Tumoren ab, da es sich bei den beiden letzteren um unterschiedlich hervorgerufene Gewebevermehrungen ohne Metastasenbildung handelt. [1, 2]

Einleitend soll in den folgenden Abschnitten auf die Entstehung, Biologie sowie die Ursachen und Auslöser von Krebserkrankungen eingegangen werden.

Karzinogenese

Der Prozess der Karzinogenese (Krebsentstehung) ist ein sehr komplexer Mechanismus, der in seinen Einzelheiten noch sehr umstritten ist. Es wird von einem Mehrstufenmodell ausgegangen, wobei aufeinanderfolgende Mutationen im Laufe eines Lebens über mehrere Etappen normale Zellen und deren Tochtergenerationen soweit verändern, dass diese sich schließlich zu Krebszellen entwickeln [3, 4]. Gegner des Mehrstufenmodells engagieren sich für die chromosomale Evolutionstheorie, wobei Aneuploidie (Genommutation, Änderungen in der Chromosomenzahl) ursächlich für die Krebsentstehung ist [5, 6, 7]. Eine weitere Theorie vermutet die Existenz von Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften, sogenannte *cancer stem cells* (CSCs). Diese Zellen bringen Krebszellen hervor, die zur Vergrößerung des Tumors führen. Damit würde sich auch die Therapieresistenz vieler Tumoren und das Aufkommen von Rezidiven (wiederkehrende Tumoren) erklären [8, 9].

Dass Krebs als genetische Erkrankung anerkannt wurde, ist auf Theodor Boveri, der 1914 das Buch *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren* veröffentlichte, zurückzuführen [10]. Allgemein wird akzeptiert, dass Mutationen (Gen- oder Genommutationen) Schädigungen der Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*, DNA) bedingen [11]. Diese Veränderungen inaktivieren Tumorsuppressorgene, die für die Zellzykluskontrolle und die Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) zuständig sind, und aktivieren aus Proto-Onkogenen Onkogene, welche das Zellwachstum kontrollieren [12, 13, 14]. Es handelt sich hierbei um einen mehrstufigen Prozess [3, 11, 7, 14], während dessen eine irreversibel veränderte Zelle Auslöser der Karzinogenese ist (Initiation), Tumorpromotoren das Wachstum stimulieren sowie den Übergang zur Seneszenz

(Verlust der Zellteilungsfähigkeit) und Apoptose verhindern können (Promotion) und die Akkumulation von Mutationen indessen ein steigendes invasives Potential hervorbringen (Progression). [15, 16, 17] Jeder Tumor hat seinen Ursprung in nur einer Zelle und ist somit klonal [11], damit lässt sich der Ursprung von invasiven Krebszellen im Lymphsystem, im Aszites (krankhafte Flüssigkeitsansammlungen in der Bauchhöhle) oder Pleuraerguss (Flüssigkeitsansammlung in der Pleurahöhle) feststellen, wodurch schließlich eine Wertigkeit bezüglich der Malignität des Tumors selbst möglich ist (Dignität).

Merkmale von Krebszellen

Um die Auswirkungen und den Umfang der mutationsbedingten Änderungen erfassen zu können, sollen hier die Charakteristika der Krebszellen im Detail erläutert und die damit erlangte Malignität der Zellen verdeutlicht werden.

Die genetische Instabilität der Krebszellen beeinträchtigt deren Fähigkeit, bestimmte Schädigungen der DNA zu reparieren, wodurch die zellzyklusregulierenden Mechanismen, welche die normale Zellproliferation und die Homöostase (Gleichgewichtszustand) steuern, beeinträchtigt werden. Die Zellen sind dadurch in der Lage, die Apoptose zu umgehen. Indem sie die replikative Seneszenz und die Zelldifferenzierung vermeiden, entziehen sie sich den programmierten Beschränkungen der Proliferation. Darüber hinaus sind für Krebszellen die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren und die Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen sehr charakteristisch. [18]

Krebszellen haben die Eigenschaft, ihren eigenen Metabolismus (Energiestoffwechsel) umzuprogrammieren. [19] Dabei wird die Energiegewinnung auch unter aeroben Bedingungen hauptsächlich durch anaerobe Glykolyse (Abbau von Monosacchariden durch Milchsäuregärung) unter Produktion von Laktat durchgeführt [20, 21]. Hierzu besagt die Warburg-Hypothese, dass der erhöhte Laktatgehalt in Krebszellen auf eine mitochondriale Funktionsstörung zurückzuführen und somit die Ursache für die anaerobe Energiegewinnung ist [22]. Im Vergleich zur aeroben Glykolyse, bei der die Energiegewinnung in den Mitochondrien (Citratzyklus) stattfindet, ist die anaerobe Glykolyse energetisch ineffizient und findet normalerweise nur unter Sauerstoffmangel (in Muskelzellen) und in den Erythrozyten statt [23].¹

Äußerst beeindruckend ist, dass Krebszellen, die doch so enorme Veränderungen vollzogen haben, nicht durch die körpereigene Immunabwehr angegriffen werden [24, 19, 14]. Hierzu konnte in einigen Zelllinien (Glioblastoma und Prostatakrebs) die Expression von multifunktionalen Proteinen, wie dem *transforming growth factor* (TGF- β 2), welchem eine immunsuppressive Wirkung zugeschrieben wird, nachgewiesen werden. [25, 26].

Betrachtet man den Tumor selbst als Einheit, fällt sofort dessen Komplexität auf. Hier befinden sich die eigentlichen Tumorzellen inmitten eines Verbandes vieler Zelltypen, welche das zur Karzinogenese notwendige *tumor microenvironment* (TME) darstellen [27, 28, 29]. Das TME gewährleistet eine extensive Kommunikation zwischen den einzelnen Tumorzellen mit deren Umgebung. Darüber hinaus besitzt das TME enormen Einfluss auf die Tumordynamik, die Fähigkeit zur Metastasierung sowie auf das Verhalten der stromazugehörigen Zellen [30]. Das Stroma, ein Zwischengewebe, in welchem die Tumorzellen und deren *cancer stem cells*, das Parenchym [27], eingebettet vorliegen, wird von den Tumor-assoziierten Fibroblasten (engl.: *cancer associated fibroblasts*,

¹Diese Angaben beziehen sich nur auf Säugetierzellen.

CAF), den Perizyten, den Endothelzellen und den Tumor-assoziierten Makrophagen (engl.: *tumor associated macrophages*, TAM) gebildet. [19, 30, 28] Zwischen den Zellen befindet sich die extrazelluläre Matrix (engl.: *extracellular matrix*, ECM), welche die Gesamtheit der notwendigen Makromoleküle, wie z. B. Kollagen, Fibronectin, Glykoprotein und Elastin enthält. Durch diese Makromoleküle ist der Tumorverband, für die Metastasierung oder das Tumorwachstum, mit entsprechenden biomechanischen Eigenschaften ausgerüstet. Mit steigendem Tumorwachstum wird auch die Versorgung durch ein tumoreigenes Gefäßsystem notwendig. Durch die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF-A (engl.: *vascular endothelial growth factor*, Wachstumsfaktor des vaskulären Endothels) [31, 32] wird die Vaskulogenese (Blutgefäßbildung) und die Angiogenese (Blutgefäßwachstum) angetrieben. Hierdurch entstehen krankhafte Blutgefäße, die eine ausreichende Versorgung des Tumorgewebes gewährleisten. [27, 28, 29, 18] Schließlich verhalten sich die Krebszellen invasiv und können das Ursprungsgewebe verlassen. Damit sind diese Zellen in der Lage zu metastasieren und Tochtergeschwüre im Körper auszubilden. [18]

Ursachen für Krebs

Die wirklichen Ursachen und Auslöser, welche im Detail für die verschiedenen Krebserkrankungen zuständig sind, konnten noch nicht eindeutig konkretisiert werden. Bekannt ist, dass während der Zellteilung bestimmte Karzinogene krebsfördernd oder sogar krebsverursachend wirken können. Zu diesen karzinogenen Faktoren zählen chemische Noxen² [33, 34], wie die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) oder Benzol. Physikalische Noxen, wie elektromagnetische Strahlung (UV-Licht, Röntgen- und radioaktive Strahlung) [35, 36] und bestimmte Viren (Hepatitis B-Virus, Hepatitis C-Virus und humanes Immundefizienz-Virus) [37, 38], zählen ebenso zu den karzinogenen Einflüssen. Übergewicht und Adipositas (Fettleibigkeit) [39], eine genetische Prädisposition [12] (genetisch bedingte, ererbte Empfänglichkeit) und immunsuppressive Therapien mit beispielsweise Azathioprin [40] können die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken, erheblich steigern. Ebenso erhöhen Umweltverschmutzungen [41] und der Konsum von Alkohol, Tabak sowie die Inhaltsstoffe einiger Lebensmittel (z. B. chinesischer Salzfisch) das Krebsrisiko [42].

1.1.2 Aktuelle Statistiken

Im Jahr 2008 erkrankten weltweit 12,7 Mio. Menschen an Krebs. Zudem wurden 7,6 Mio. durch Krebs verursachte Todesfälle verzeichnet. [43] Hierbei sind mehr als die Hälfte der Neuerkrankungen und Todesfälle in den Entwicklungsländern zu finden. Zu den häufigsten Krebserkrankungen zählen weltweit Lungenkrebs (1,61 Mio. Fälle), Brustkrebs (1,38 Mio. Fälle) und Darmkrebs (1,23 Mio. Fälle). Betrachtet man die Bevölkerung nach dem Geschlecht getrennt, fällt auf, dass bei Männern am häufigsten Tumoren der Lunge, gefolgt von Tumoren der Prostata und schließlich des Darms auftreten. Bei Frauen dagegen zeigen sich die häufigsten Krebserkrankungen, tendenziell sinkend, in der Brust, dem Darm und dem Gebärmutterhals. [43]

Das Mammakarzinom stellt mit ca. 460.000 Todesfällen (13,7 % bezogen auf alle krebsbedingten Todesfälle außer den Basalzellkarzinomen) weltweit die häufigste durch

²Eine detaillierte Übersicht ist in der *Liste der krebserzeugenden, erbgutverändernden oder fortpflanzungsgefährdenden Stoffe* (KMR-Liste) des Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA) zu finden.

Krebs verursachte Todesursache und mit ca. 1,4 Mio. Fällen (22,9 %) die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen dar. [43] Allein in Deutschland sind 2008 ca. 71.000 Frauen (32,1 %) an Brustkrebs erkrankt. Zusätzlich liegt mit 17,3 % (ca. 17.000 Todesfälle) die Mortalitätsrate für Brustkrebs bei Frauen ebenfalls an oberster Stelle. Die absolute Überlebensrate nach fünf Jahren lag in Deutschland 2008 bei nur 78 %. [44]

Auch wenn es ungewöhnlich erscheint, soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass weltweit jährlich ca. 13.000 Männer an Brustkrebs erkranken [45]. Hierzu wurden allein in Deutschland 2008 ca. 520 Neuerkrankungen und 136 Krebssterbefälle in Männern verzeichnet, wobei die absolute Überlebensrate nach fünf Jahren bei nur 63 % lag. [44] Insgesamt treten zwar weniger als ein Prozent der gesamten Mammakarzinome in Männern auf [46, 47, 48, 49], jedoch wird eine stete Zunahme der Inzidenzen beobachtet [49, 50, 51].

1.1.3 Das Mammakarzinom

In Anbetracht der oben erwähnten Statistiken zu den Krebserkrankungen in Frauen und Männern wird deutlich, dass in Bezug auf das Mammakarzinom (maligne Erkrankung der Brustdrüse) die Notwendigkeit besteht, Verbesserungen in der Diagnostik und Therapie zu erreichen, um die Mortalitätsrate erheblich zu senken und einen Anstieg der absoluten Überlebensrate zu erreichen.

Dementsprechend wird in den folgenden Abschnitten auf die Charakterisierung des Mammakarzinoms und die hierzu verwendeten Klassifizierungsverfahren eingegangen. Darüber hinaus werden ein Einblick in die Therapiemethoden sowie ein kleiner Exkurs speziell in die Chemotherapie gegeben.

Charakterisierung und Diagnoseverfahren

Unter dem Begriff Mammakarzinom sind maligne Neoplasien der Brustdrüse zu verstehen, die entweder einen invasiven oder nicht-invasiven Charakter haben können. Befinden sich veränderte Epithelzellen in den Milchgängen (engl.: *ductale carcinoma in situ*, DCIS) oder in den Drüsenlappen (engl.: *lobular carcinoma in situ*, LCIS), geht man von nicht-invasiven Mammakarzinomen aus [52, 53]. Dagegen liegen invasive Karzinome vor, wenn sich die Tumorzellen außerhalb der Drüsenstrukturen befinden [54] (vgl. Abbildung 1.1). Zu den invasiven Tumoren zählen unter anderen das invasive duktales Karzinom (engl.: *invasive ductale carcinoma*, IDC), das invasive lobuläre Karzinom (engl. *invasive lobular carcinoma*, ILC) sowie das medulläre, muzinöse, tubuläre, inflammatorische und das Paget-Karzinom [55]. Diese histologische Klassifizierung basiert auf der Grundlage der WHO-Richtlinien (engl.: *World Health Organization*) [14].

Histopathologische und zytologische Methoden zur Charakterisierung von Biopsieproben (Feinnadelbiopsie, Stanzbiopsie und offene Exzisionsbiopsie) stellen immer noch den Goldstandard in der Krebsdiagnose dar [56]. Für die histologische Klassifikation (engl.: *staging*) und das *Grading* ist somit das Wissen um die Histomorphologie unabdingbar. Entsprechend wird das *Staging* nach der Tumorgöße, dem Lymphknotenbefall und dem Vorkommen von Metastasen auf Grundlage der TNM-Klassifikation (engl. *tumor nodes metastases staging system*, Tumor, Lymphknoten, Metastasen) [57, 58] nach den Richtlinien des AJCC (engl. *American Joint Committee on Cancer*) und der UICC (franz.: *Union Internationale Contre le Cancer*) [59, 60] durchgeführt. Für eine postoperative Charakterisierungen des Tumorgewebes wird die pTNM-Klassifikation (pa-

³Die Beschriftung stammt teilweise aus Carneiro, Junqueira, Gratzl (Hrsg.), *Histologie*, Heidelberg, 2005.

thologisch/postoperativ) [58] nach den Richtlinien der UICC vorgenommen. Daneben findet das *Grading* zur Bestimmung des Entartungsgrades [58] nach dem Scarff-Bloom-Richardson (SBR) System [61] oder Nottingham *Grading* System [62]) (Milchgang-Formation, nuklearer Grad und Mitoserate nach Elston und Ellis) [62] mittels mikroskopischer Bewertungen der morphologischen Veränderungen der Zellen statt. Weitere Methoden zur Charakterisierung sind die Stadien- bzw. Risikogruppierung nach der Konsensuskonferenz in St. Gallen von 2005 [63], die B-Kategorisierung benigner Tumoren von Stanzbiopsien [64, 65] sowie die prognostische Einschätzung des DCIS nach dem Van-Nuys-Prognostic-Index [66, 67].

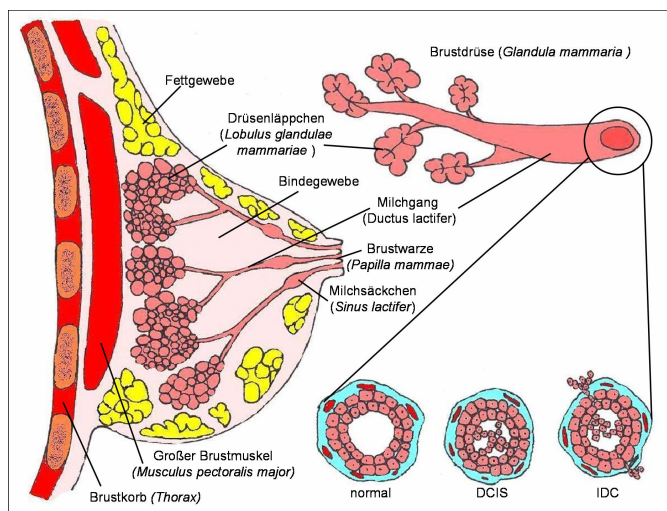


Abb. 1.1: Querschnitt durch die weibliche Brust und angeschnittener normaler Milchgang, duktales Karzinom *in situ* (DCIS) und invasives duktales Karzinom (IDC) (Abb. privat³).

hinaus wird der Status des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (engl.: *human epidermal growth factor receptor*, HER2/neu) immunhistochemisch [69, 70] sowie mittels zusätzlicher FISH-Analysen (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) untersucht [71, 72, 73, 56]. Mit der Molekularpathologie besteht zusätzlich die Möglichkeit tumorspezifische Gene auf Mutationen zu untersuchen. Hierzu wird unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) die Amplifikation (Vervielfältigung) bestimmter Gene erreicht und Genexpressionsanalysen werden realisierbar. [58, 56] Auf Grundlage der letztgenannten Technik wurden enorme Korrelationen zwischen den etablierten Brustkrebs-Subtypen [74, 75, 76] und den immunhistochemischen Ergebnissen [69] konkretisiert.

Des Weiteren kann der Grad der Aneuploidie (Genommutation) mittels Zytophotometrie oder Durchflusszytophotometrie festgestellt werden. Die Anzahl der Zellen, die sich in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus befinden, korreliert mit der Proliferationsaktivität und gibt somit Auskunft über die Zellteilungs- und Wachstumskinetik. [58, 56] Die Analyse von Chromosomenaberrationen kann ebenso genutzt werden. Hierzu wird der Chromosomensatz zytogenetisch untersucht. Mit Hilfe der Aberrations-Einstufung können Rückschlüsse auf das erreichte Stadium der Krebserkrankung geschlossen werden. [58]

Neben den histopathologischen und zytopathologischen Diagnoseverfahren stehen weitere Techniken zur Verfügung, um zusätzliche Informationen aus Patientenproben zu erhalten. Der Status der Hormonrezeptoren Östrogen (ER) und Progesteron (PR) besitzt bei der Mammakarzinomklassifizierung einen hohen Stellenwert. Durch immunhistochemische Untersuchungen (IHC) [68] kann der Hormonrezeptorstatus bestimmt werden, indem die Zugabe von Markersubstanzen (fluoreszierenden Stoffen) den Nachweis von Proteinen mit antigenem Charakter erlaubt. Darüber

All diese Klassifizierungsmethoden dienen der extensiven Tumorcharakterisierung, welche eine unabdingbare Grundlage für eine optimale therapeutische Entscheidung darstellt.

Therapiemethoden

Die optimale und personalisierte Therapieerstellung ist erheblich von der Charakterisierung der Krebserkrankung abhängig. Unter Betrachtung der enormen Individualität aller Mammakarzinome erübrigt sich die Frage nach einer *Standardtherapie*, denn es gibt keine. Die Krebstherapie muss für jeden Patienten individuell angepasst werden.

In Deutschland wird die Therapieerstellung durch die Deutsche Krebsgesellschaft e.V. in den S3-Leitlinien [55], welche auf medizinisch-wissenschaftlichen Erkenntnissen von Experten basieren, festgelegt. Darin wird zwischen präinvasiven Neoplasien, invasiven Karzinomen und den rezidierten oder metastasierten Mammakarzinomen sowie den Metastasen unterschieden. In diesen Leitlinien werden neoadjuvante Therapien mittels Strahlentherapie und/oder Chemotherapie empfohlen, um präoperativ eine Verkleinerung der Tumoren zu erzielen, da mit jeder erfolgreichen neoadjuvanten Behandlung die Rate der brusterhaltenden Therapien (BET) steigt. Während der operativen Therapie steht die Tumorsektion (komplette Entfernung des Krebsgewebes) mittels brusterhaltender Verfahren oder der modifizierten radikalen Mastektomie (Entfernung der Brustdrüse) im Vordergrund. Entsprechend der Malignität des Mammakarzinomes muss gegebenenfalls die Axilladisektion (Entfernung der Lymphknoten) [77] durchgeführt werden. Nach der operativen Tumorentfernung folgen adjuvante (unterstützende) Therapien, wobei mittels Bestrahlung, Chemotherapie, Antikörpertherapie [78] und antihormoneller Therapie ein Ausbreiten des Tumors durch Mikrometastasen verhindert werden soll. Im Anschluss folgen kurative (heilende) und palliative (lindernde) Therapien, welche die Lebensqualitäten verbessern sollen. [55] Für jeden Patienten findet eine individuell Therapieentscheidung, welche eine Kombination aus verschiedenen Brustkrebstherapien enthält, statt, wobei festgelegt wird, welche Methoden als sinnvoll und zum Erfolg führend betrachtet werden können. Dementsprechend wird beispielsweise bei einem Rezidiv die vollständige operative Entfernung empfohlen, ohne neoadjuvante Therapien vorzulagern. Studien zeigten, dass anschließende medikamentöse Therapien keinen Einfluss auf die Überlebensrate hätten, wohl aber die krankheitsfreie Phase verlängert werden würde. In Abhängigkeit von der Primärtherapie kann bei dem Aufkommen von Rezidiven über eine Strahlentherapie diskutiert werden. [55]

Schon im 16. Jahrhundert wurden im Bereich der Behandlungsmethoden von Brustkrebs revolutionäre Schritte, wie die Grundsteinlegung für die Chemotherapie durch den Arzt und Alchemisten Paracelsus (1493-1541), vollzogen. Indem er den Lebensprozessen im menschlichen Körper eine chemische Grundlage zu schrieb, gelang er zur Ansicht, dass chemische Änderungen zu Erkrankungen führen. In seinem Buch *De Grandibus* beschrieb er Therapien unter Verwendung verschiedener Chemikalien wie Quecksilber, Schwefel, Arsen, Zink und Kupfer, welche in entsprechenden Konzentrationen zur Behandlung von Krebs dienten. [79, 80] Erst 1906 wurde der Ansatz Paracelsus' durch Paul Ehrlich (1854-1915) wieder aufgegriffen. Er fasste in seinem Buch *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie* Ergebnisse zur Behandlung von Infektionskrankheiten zusammen. [79]

Die Chemotherapie zählt heute neben der Therapie mit beispielsweise monoklonalen Antikörpern zu den medikamentösen Therapiemethoden, wobei Zytostatika, wie Tamoxifen [55, 81], Docetaxel [82, 83], Fluoruracil [82, 81], Doxorubicin [82, 81], Paclita-

xel [84, 85] und Cyclophosphamid [82, 81], einzeln oder in Kombination, verabreicht werden. Indem die Chemotherapeutika/Zytostatika beispielsweise während der Mitose mikrotubulistabilisierend (Docetaxel, Paclitaxel) wirken oder die DNA- bzw. RNA-Synthese stören (Doxorubicin, Fluoruracil), soll das Tumorwachstum eingedämmt, die Ausbreitung von Tumorzellen verhindert sowie der programmierte Zelltod induziert werden.

Während der letzten Jahrzehnte erfuhr das Chemotherapeutikum Docetaxel (DCT, Taxotere[®]) [86] enormen Anklang in der Behandlung von Tumoren der Prostata, der Lunge, des Magen und der Eierstöcke. Bekannt als ein hochaktives Zytostatikum in der Krebstherapie ist es das effektivste Medikament bei der Behandlung gegen Brustkrebs [87]. DCT selbst ist ein semisynthetisches Taxan, welches bei der Veresterung von 10-Deacetylbaccatin III (Extrakt aus den Nadeln der Europäischen Eibe *Taxus baccata* L.) entsteht [88].

DCT zeichnet sich durch seine hohe Affinität zum β -Tubulin der Mikrotubuli (röhrenförmige Proteinfilamente) des Zytoskeletts aus. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung der Mikrotubuli. Diese dynamische Reorganisation der Mikrotubuli spielt während verschiedener zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle. Zu diesen Prozessen zählen die Aufnahme, der Transport und die Sekretion von Vesikeln, die Zellbewegung, die Gestaltung der Zellform und die Trennung der Chromosomen während der Mitose. [89]

Die Behandlung mit DCT hat eine Störung in der Depolymerisation der Mikrotubuli des Spindelapparates während der Mitose zur Folge und verursacht schließlich den Zellzyklusarrest. [89, 90, 91] Über den tatsächlichen Wirkungsmechanismus und damit verbundene Art des Zelltodes existieren verschiedene Ansichten. Zu den vorrangigen Theorien zählt die nicht-apoptotische mitotische Katastrophe mit der fehlerhaften Trennung der Chromosomen während der Mitose und der daraus resultierenden Mikronuklei, die ursächlich für den Zelltod sind [89]. Zum anderen wird die Ansicht vertreten, dass die Apoptose nach der durch DCT induzierten mitotischen Katastrophe eintritt. [85, 92, 93] Dabei verursacht DCT eine dosis- und zelllinienspezifische Mischung zwischen Apoptose und mitotischem Zelltod, welche vom genetischen Hintergrund abhängig ist [90, 89, 94].

Gegenwärtige Methoden in der klinischen Praxis zur Wahl der geeigneten Chemotherapeutika basieren auf klinischen Studien und auf der Grundlage von Beobachtungen der Krankheitsverläufe anderer Patienten. Hierbei wird jedoch die Individualität der einzelnen Patienten vernachlässigt. Also fundiert die Wahl der Zytostatika für die Chemotherapie auf Erfahrungen der Kliniker sowie dem Versuch-und-Irrtum-Prinzip. Mit der Erforschung der Wirkmechanismen in verschiedenen Krebstypen und dem Wissen über die Effektivität der einzelnen Medikamente könnten in der neoadjuvanten und adjuvanten Brustkrebstherapie immense Fortschritte erreicht werden. Hierdurch würden optimal eingestellte Chemotherapien Verwendung finden, wodurch bessere Prognosen erzielt werden könnten.

1.1.4 Raman-spektroskopische Methoden in der medizinischen Forschung

Wie schon eingangs erwähnt wurde, besteht die Notwendigkeit, weitere Methoden/Techniken zu mobilisieren, um zusätzliche Informationen und mehr Wissen über Tumorzellen und effektive Therapiemethoden zu erlangen. Dementsprechend soll in

diesem Abschnitt eine Methode aus der Materialforschung, die Raman-Spektroskopie, zeigen, wie sie im Laufe der letzten Jahrzehnte den Rang eines medizinischen Werkzeugs erreicht hat.

Im Jahr 1928 entdeckte der indische Physiker C.V. Raman die inelastische Streuung von Licht an Molekülen (Nobelpreis 1930) [95, 96]. Mit dem Raman-Effekt, welcher die Grundlage der Raman-Spektroskopie ist, wird die Wechselwirkung zwischen Licht (elektromagnetischer Strahlung) und Probe (Elektronenhülle der Moleküle) beschrieben. Wenn monochromatisches Licht (Laserstrahlung) auf eine Probe fällt, wechselwirkt der größte Anteil, nahezu 100 %, des Lichtes nicht mit der Probe, wohingegen ein sehr kleiner Teil des Lichtes inelastisch (eins von 10^7 Photonen [97]) und ein größerer Teil elastisch gestreut wird (Rayleigh-Streuung). [95] Der inelastische Streuprozess beschreibt eine molekülspezifische Energieänderung, welche auf der, durch das eingestrahlte Licht verursachten, Deformation der Elektronenhülle der Moleküle während des Schwingungsvorgangs (Polarisierbarkeit) basiert. Entsprechend der Licht-Materie-Wechselwirkung gibt das Molekül entweder Energie an das Photon ab (anti-Stokes-Streuung) oder das Molekül nimmt die Energie vom Photon auf (Stokes-Streuung). In beiden Fällen unterscheidet sich die Frequenz des Streulichtes von der Frequenz des eingestrahlten Lichts. Diese Frequenzänderung ist im Raman-Spektrum in Form von Stokes- und anti-Stokes-Banden zu erkennen und kann den spezifischen Schwingungen und Rotationen der untersuchten Moleküle zugeordnet werden, wodurch Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Probe vorgenommen werden können. Zusätzlich zeigt das Raman-Spektrum das Signal des elastisch gestreuten Lichtes, welches der Frequenz der Anregungswellenlänge entspricht, die Rayleigh-Bande. Bei der Raman-Spektroskopie werden normalerweise die Stokes-Banden untersucht. [98, 99, 100]

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte hat sich die Raman-Spektroskopie neben der Infrarot-Absorptions-Spektroskopie (IR-Absorptions-Spektroskopie) bei der Erforschung biologischer und medizinischer Fragestellungen als analytische Methode durchgesetzt. Für die Untersuchungen an *In-vivo*-Proben stellt die Raman-Spektroskopie gegenüber der IR-Absorptions-Spektroskopie die geeignetere Technik dar [101, 102, 103], da Wasser ein starker Absorber von IR-Strahlung ist. Dies hat bei der *In-vivo*-Anwendung zur Folge, dass im IR-Absorptions-Spektrum das Wassersignal alle anderen Signale überlagert [104].

Eine limitierende Eigenschaft der Raman-Spektroskopie zur Untersuchung biologischer Materialien ist das äußerst schwache Raman-Signal, welches im geringen Raman-Streuquerschnitt (*cross section*) der Biomoleküle begründet liegt [105, 106]. Daher werden für bestimmte Fragestellungen spezielle Raman-Techniken, wie die Resonanz-Raman-Spektroskopie (engl.: *resonance Raman spectroscopy*, RRS), die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (engl.: *surface enhanced Raman spectroscopy*, SERS) und die oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (engl.: *surface enhanced resonance Raman spectroscopy*, SERRS), verwendet.

Bei der RRS wird die Intensität des Raman-Signals erhöht, indem die gewählte Anregungswellenlänge nahe einem Absorptionsmaximum im Elektronenanregungsspektrum der zu untersuchenden Moleküle liegt. Beispielsweise werden unter Verwendung von Wellenlängen unter 260 nm die molekülspezifischen Raman-Signale von bestimmten Proteinen und Nukleinsäuren erhöht [104]. Für biologische Systeme hat sich die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie als sehr geeignet erwiesen [107, 108].

Eine Erhöhung des elektromagnetischen Feldes und damit verbunden ein gestiegenes Raman-Signal der Moleküle, die an entsprechenden metallischen Nanostruk-

turen (aus z. B. Silber oder Gold) adsorbieren, kann mittels SERS erreicht werden [109, 110, 111, 112]. Hierdurch besteht beispielsweise die Möglichkeit zur Detektion spezifischer Antikörper auf der Zelloberfläche [113], die zur Charakterisierung von Krebszellen wertvoll sind.

Eine Kombination aus RRS und SERS stellt die oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie dar. Hierbei liegt die gewählte Anregungswellenlänge entsprechend dem nachzuweisenden Molekül in Resonanz. In Kontrast zu beiden einzelnen Methoden wird eine noch höhere Verstärkung des Raman-Signals erreicht. Diese Technologie ist geeignet für den Nachweis von Substanzen, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, beispielsweise zur Untersuchung zellulärer Prozesse und der Ortung von Medikamenten während deren Aufnahme in die Zellen [114].

Darüber hinaus sind zwei Techniken erwähnenswert, die seit den letzten Jahren in der Erforschung medizinischer Fragestellungen immer mehr Anwendung fanden. Hierzu zählt die sogenannte spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (engl.: *tip enhanced Raman spectroscopy*, TERS), bei der SERS kombiniert mit der Rasterkraftmikroskopie (engl.: *atomic force microscopy*, AFM) verwendet wird. Hierdurch besteht die Möglichkeit, die Proben mit einer Auflösung von weniger als 10 nm zu untersuchen und daraufhin chemische und strukturelle Informationen über die Probe zu erhalten. [115, 116, 112]. Die Oberflächenstrukturen werden mit einem einzelnen Metallpartikel an der Spitze eines AFM-Cantilevers, der für die Signalverstärkung zuständig ist, abgetastet.

Eine weitere Methode stellt die kohärente Anti-Stokes Raman-Spektroskopie (engl.: *coherent anti-stokes Raman spectroscopy*, CARS), welche zu den nicht-linearen Ausführungen der Raman-Spektroskopie zählt, dar. Die CARS-Mikrospektroskopie ist optimal für sehr schnelle Untersuchungen großflächiger Gewebeschnitte geeignet. Mit der Erstellung von *single-band CARS-Images* wird die Raman-Intensität von nur einer Wellenzahl über den gesamten Messbereich dargestellt [117, 105]. In den letzten Jahren konnte unter Verwendung entsprechender Laser die gebündelte (*multiplex-CARS*) [118] und die breitbandige (*broadband-CARS*) CARS-Mikrospektroskopie [119] entwickelt werden. Hiermit ist es möglich, mit nur geringfügig gestiegenen Messzeiten für die Messpunkte eines bestimmten Messbereiches einer Gewebeprobe komplette CARS-Spektren bzw. CARS-Spektren über einen speziellen Wellenzahlbereich aufzunehmen.

Trotz der enormen Vielseitigkeit der oben erwähnten Raman-Techniken sind limitierende Faktoren dafür verantwortlich, dass für die Untersuchungen in dieser Arbeit die konventionelle Raman-Mikrospektroskopie Verwendung fand. Im Einzelnen handelt es sich beispielsweise um temperaturabhängige Proteindenaturierungen und Verbrennungen der Probe durch die enorme Energieeinwirkung des UV-Lasers während der UV-RRS [120], welche die *Mapping*-Experimente an eukaryotischen Zellen beeinträchtigen würden. Da die hier durchgeführten Charakterisierungen an Krebszellen auf Grundlage der gesamten biochemischen Information einzelner Zellen realisiert werden sollen, sind die RRS und die beiden oben genannten oberflächenverstärkten Methoden, wodurch selektiv Moleküle untersucht werden, als eher ungeeignet anzusehen. Darüber hinaus existieren für die Techniken SERS und SERRS momentan noch keine Standardisierungen bei der Herstellung geeigneter Substrate und Metallpartikel sowie für die Anbindung letzterer an die Zielmoleküle, welche für die Gewährleistung der Reproduzierbarkeit notwendig sind. Prinzipiell sind mittels SERS und SERRS Raman-Signale von der Zelloberfläche oder spezifischer Zielmoleküle detektierbar, wodurch nur eine punktuelle Analyse der Krebszellen durchführbar wäre. Wegen der kostenintensiven

Komponenten und den zeitaufwendigen technischen Vorbereitungen sind die CARS-Mikrospektroskopie und die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie ebenfalls momentan als ungeeignete Methoden in der diagnostischen Charakterisierung von Krebszellen anzusehen.

1.2 Stand der Forschung

Raman-Spektroskopie an Brustkrebs

Die ersten FT-Raman-Spektren (engl.: *Fourier transform*) humaner Brustkrebsproben wurden im Jahr 1991 mit einer Laserwellenlänge von 1064 nm aufgenommen. Hierbei konnten Intensitäts- und Verhältnisänderungen signifikanter Raman-Banden, die mit dem jeweiligen Malignitätsgrad von normalen, benignen und malignen Geweben korrelierten, beobachtet werden. Dass die spektralen Unterschiede mit konkreten biochemischen Änderungen in den Krebszellen korrelieren, konnte zu dieser Zeit noch nicht aufgezeigt werden. [121]

Unter Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen wurden in den 1990er Jahren normale Brustgewebe und Brustkrebsgewebe Raman-spektroskopisch untersucht. Die Raman-Spektren der Brustgewebe enthielten die für Carotinoide, Strukturproteine (z. B. Collagen) und Lipide typischen Signale. Zur Unterscheidung zwischen normalen und erkrankten Geweben wurden signifikante Änderungen in den Signalintensitäten spezifischer Molekülstrukturen entdeckt. So konnte gezeigt werden, dass lipidtypische Raman-Banden in Brustkrebsgeweben im Vergleich zu gesundem Brustgewebe an Intensität verlieren und die Raman-Signale für Proteine enorm ansteigen [122, 123, 124, 125].

Zusätzlich beobachteten Reed et al. [122] relative Intensitätsänderungen der Häm-b-Strukturen und der Carotinoide. Die Trennung zwischen gesundem Brustgewebe und Brustkrebsgewebe unter Verwendung der Raman-Daten zeigte gute Resultate. Die Unterscheidungen zwischen benignen und malignen Geweben waren jedoch noch nicht von Erfolg gekrönt.

Erste Untersuchungen mittels UV-RRS an Zelllinien aus Brustgeweben mit aufsteigendem Malignitätsgrad (MCF-10A, MCF-7 (Brustkrebszelllinie) und MDA-MB435) durch Yazdi et al. [126] zeigten enorme Unterschiede in den Nukleotid/Protein-Verhältnissen und in den Nukleinsäurestrukturen. Hiermit konnte verdeutlicht werden, dass die Erkrankung Krebs mit strukturellen Änderungen in der DNA einhergeht.

Die Kombination eines Raman-Spektrometers mit einem Mikroskop erlaubte die Erstellung von Raman-*Maps*, mit welchen die molekularen und morphologischen Informationen von Einzelzellen (Krebszelllinien) ohne zusätzliche Färbungen für diagnostische Zwecke ersichtlich gemacht werden konnten. [127, 128, 129] Durch Vergleiche der Raman-*Maps* mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten (HE) Bildern und Phasenkontrast-Bildern wurden die chemisch/morphologischen Informationen der Raman-Spektren untersucht und dabei erkannt, dass Zusammenhänge zwischen den Raman-Spektren und dem Grad der Erkrankung bestehen. Folglich konnte festgestellt werden, dass neben den chemischen Informationen für DNA, RNA, Lipiden (speziell Triolein), Cholesterin und Cholesterinestern die Proteine Collagen (extrazellulär) und Actin (intrazellulär) als vorherrschende Komponenten in Raman-Spektren zu finden sind und zur Krebsdiagnose genutzt werden können. [130]

In-vitro-Untersuchungen an Patientenproben (Gewebeschnitte) zeigten auch, dass die chemischen und morphologischen Änderungen in den Raman-Spektren mit dem Grad der Krebserkrankung assoziieren und somit aufschlussreiche Informationen für die Krebsdiagnose enthalten [131, 132, 133, 134]. Signifikante Änderungen konnten hierzu in den Raman-Signalen von Proteinen, Lipiden und DNA erkannt werden [131, 134]. Die DCIS zeichnen sich somit Raman-spektroskopisch durch erhöhte Signale der Nukleinsäuren sowie der nicht-kollagenen Proteine aus, wohingegen normale Gewebe einen höheren Anteil an Lipiden aufweisen [135, 134]. Unter Verwendung statistischer Methoden konnte dementsprechend Krebsgewebe von normalem Brustgewebe und benignem Gewebe gut unterschieden werden. Daraufhin führten Haka et al. [136] erste *In-vivo*-Experimente während Brust-erhaltender Therapien (BET) durch und erreichten eine Diagnosegenauigkeit von über 93 % mittels eines zuvor erstellten morphologischen Modells [130]. Dieses morphologische Modell beinhaltet Basis-Spektren der zellulären Komponenten. Anschließend wurden Gewebeproben an eine lineare Kombination der Basis-Spektren des Modells angepasst. Mit diesen Untersuchungen war der erste große Schritt in Richtung *In-vivo*-Raman-Spektroskopie zur intraoperativen Begutachtung der Tumorränder gemacht.

Studien zur Charakterisierung normaler Zellen und transformierter Brustkrebszellen durch Yu et al. [137] zeigten, dass in Tumorzellen verglichen zu normalen Zellen die DNA-Verdopplung signifikant aktiver betrieben wird. Dass die chemische Information der Raman-Spektren zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen in gemischten Zellpopulationen, wie sie beispielsweise bei einem Krebsvorsorgeabstrich mit einer Bürste vorliegen, verwendet werden kann, zeigte die Studie an Zellpellets verschiedener Zelllinien von Krishna et al. [138].

Das Vorkommen von Mikrokalzifizierungen in Brustgeweben wurde ebenfalls von Haka et al. [139] mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Der Typ I (Calciumoxalat-Dihydrat) kommt vorrangig in benignem und nur selten in malignem Brustgewebe vor, wohingegen der Typ II (Calcium-Hydroxyapatit) bis zu dreimal häufiger auftritt und in benignem wie in malignem Gewebe identifiziert werden kann. Die erreichten Ergebnisse zur Unterscheidung dieser Mikrokalzifizierungen in benignen und malignen Brustgeweben, zeigten gegenüber der Charakterisierung mittels Röntgenmammographie erhebliche Verbesserungen auf. Unter Verwendung statistischer Methoden konnten selbst feinste Unterschiede im Typ II zur Trennung maligner und benigner Proben erkannt werden. Wenig später realisierten Stone et al. [140] die Raman-spektroskopische Detektion von Mikrokalzifizierungen in Gewebetiefen von bis zu 10 mm. Möglich war dies durch die Anwendung der *spatially offset* Raman-Spektroskopie (SORS, Detektion der Raman-Signale ist zum Ort der Lasereinstrahlung räumlich versetzt). Mit den erhaltenen Raman-Daten konnten ebenfalls Trennungen der beiden Kalzifizierungstypen erreicht werden. In einer weiteren Studie erzielten Stone et al. [141] unter Verwendung der Transmissions-Raman-Spektroskopie (Signaldetektion an gegenüber befindlicher Seite der Probe) die Detektion von Raman-Signalen der Kalzifizierungen in einem Brust-“Phantom” aus tierischen Geweben in Probentiefen von ca. 27 mm. Etwas später konnten mittels Raman-Spektroskopie *in vivo* während bildgesteuerter Biopsien Genauigkeiten bei der Detektion von Mikrokalzifizierungen von 96 % (PPV) erreicht werden. [142]

Anhand der biochemischen Informationen in den Raman-Spektren, welche mit malignen Veränderungen in Tumoren korrelieren, erzielten Rehmann et al. [143] die Unterscheidung verschiedener Malignitätsgrade des DCIS und des IDC in 67 Fällen. Auch in

diesen Untersuchungen wurde ein erhöhtes Protein-Signal in erkrankten Geweben im Vergleich zu normalen Geweben erfasst. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die gestiegene Intensität der Raman-Spektren mit dem Anstieg der Malignitätsgrade (I, II, III) in IDC-Proben korreliert. Diese gestiegenen Raman-Intensitäten deuten auf Änderungen im Protein-, DNA- und Lipidgehalt hin. DCIS-Proben mit einem hohem nuklearem Grad zeigen gestiegene Konzentrationen von Acylglycerinen, wohingegen Proteinanreicherungen in DCIS-Proben mit einem geringen nuklearen Grad beobachtet wurden.

Neben Raman-spektroskopischen Studien zur Klassifizierung und Identifizierung benignen und malignen Tumoren wurden Untersuchungen bezüglich der Medikamentenaufnahme, der Wirkmechanismen und der Wirkeffektivität in Brustkrebszellen durchgeführt. Hierzu konnte gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie eine geeignete Methode zur Überwachung von Aufnahmemechanismen über Vesikel (Liposomen) während der Zell-Zell-Interaktionen darstellt. Im Detail wurde die Aufnahme von Lipidstrukturen und die Verteilung derselben in den Zellen untersucht [144]. Herkömmlich genutzter *Nanocarrier*, die zur gezielten Aufnahme von Medikamenten in Zellen dienen, konnte mit Hilfe der Raman-Mikrospektroskopie verfolgt und analysiert werden [145]. Entsprechend konnte ebenfalls die Dynamik spezifischer Medikamente, nach der Aufnahme durch die Zellen beobachtet werden, wodurch verdeutlicht wird, dass mit Hilfe der Raman-Mikrospektroskopie intrazellulär pharmakokinetische Untersuchungen realisierbar sind [146].

In den letzten Jahren fanden multivariate Analysemethoden immer mehr Anklang in der Auswertung Raman-spektroskopisch generierter Daten. Damit verbunden häuften sich Differenzierungs- bzw. Identifizierungsexperimente zur Unterscheidung verschiedener Krebstypen selbst und mit gesunden Zellen/Geweben [147, 148, 149]. Mit der Ermittlung spezifischer Raman-Marker, welche mit den Malignitätsgraden in Brustkrebszellen korrelieren, und dem gestiegenem Wissen über die Tumorentwicklung können immense Fortschritte in der Krebsforschung erzielt werden [150, 151, 152].

Untersuchungen an im Blut zirkulierenden Zellen, wie Erythrozyten, Leukozyten und Tumorzellen, ermöglichten die Identifizierung verschiedenen Zelltypen mit einer Genauigkeit von 92 % [147]. Bei der Unterscheidung von Lymphknoten, die mit Krebszellen befallen sind, und gesunden Lymphknoten konnten ebenso gute Ergebnisse erzielt werden [148, 149].

Raman-spektroskopische Untersuchungen zur strahlentherapieinduzierten Wirkung in verschiedenen Krebszelllinien zeigten Veränderungen in der Konzentration von Aminosäuren, Proteinstrukturen sowie der Nukleinsäuren und auch von Lipidbestandteilen. Diese Studie verdeutlichte damit neue Erkenntnisse über die Mechanismen in lebenden Zellen nach therapeutischen Bestrahlungen. [153]

Auch Nieva et al. [154] untersuchten die Malignität verschiedener Brustkrebszellen in Bezug auf deren Lipidzusammensetzung. Mit Hilfe multivariater Analysemethoden wurden Fettsäure-spezifische Raman-Signale im Wellenzahlbereich zwischen 2820 und 3030 cm^{-1} studiert und Klassifizierungen unterschiedlich maligner Zelllinien mit einer Sensitivität von 90 % und Spezifität von ca. 82 % erreicht.

Die Verwendung beispielsweise sehr guter Objektive erzielte hohe räumliche Auflösungen in den Raman-Zell-Maps, wodurch die Detektion von Zytostatika in Krebszellen [155] realisierbar wurde und Untersuchungen der räumlichen und chemischen Aspekte der Zellkernnukleoli, den Kernkörperchen des Zellkerns, zeigten, dass Verbindungen zwischen der Zellkernorganisation und der Krebsentwicklung [156] erkennbar sind. Des Weiteren erlaubten die technologischen Fortschritte durch Zellvereinzelungs-

methoden die Unterscheidung von verschiedenen Zelltypen anhand einzelner Zellen (Raman-*activated cell sorting*, RACS) unter Verwendung eines mikrofluidischen Chips, wodurch die Durchflusszytometrie unterstützt werden soll. [157]

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Raman-Spektroskopie eine geeignete Methode zur Erforschung biochemischer Änderungen in humanen Zellen, die mit der Tumorentwicklung, medikamentösen bzw. strahlentherapeutischen Eingriffen u. v. m. assoziiert werden können, darstellt.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die Raman-Mikrospektroskopie hat in den letzten Jahrzehnten in der Krebsdiagnostik einen hohen Stellenwert erreicht. Um hier weitere Erfolge zu erzielen, behandelt ein großer Teil dieser Untersuchungen die Unterscheidung zwischen “normalen” und malignen Brustdrüsenzellen. Mit den erhaltenen Raman-Daten werden Raman-Zell-*Maps* erstellt, wodurch die Morphologie und Biochemie einzelner Krebszellen geklärt werden kann. Unter Verwendung chemometrischer Methoden werden somit neue Wege eröffnet, wodurch die Klassifizierung und Identifizierung einzelner Krebszellen realisierbar wird. [siehe MBP1]

In einem weiteren Teil werden Klassifizierungs- und Charakterisierungsexperimente an verschiedenen malignen Krebszelllinien durchgeführt. Die Klassifizierung nach malignitätsgradrelevanten Aspekten wie dem Zelllinienursprung und dem Genexpressionsprofil (Brustkrebssubtypen) mittels Raman-Mikrospektroskopie steht im Vordergrund. [siehe MBP3]

Darüber hinaus wird im dritten Teil der Arbeit die Anwendung der Raman-Mikrospektroskopie zur Untersuchung von zytostatikuminduzierten Auswirkungen dargestellt. Mit Hilfe von Raman-Messungen an einzelnen, mit Docetaxel behandelten Brustkrebszellen werden biochemische Informationen über molekulare Änderungen und die Wirkungseffektivität erfasst. Damit stellt die Raman-Mikrospektroskopie eine geeignete Methode zur Erforschung der Wirkmechanismen innerhalb einzelner Krebszellen nach entsprechender Zytostatikumbehandlung dar und erlaubt es, die Effektivdosis entsprechend der Dosis-Wirkungs-Kurve für verschiedene Zytostatika quantitativ zu ermitteln. [siehe MBP2]

Ziel dieser Arbeit ist es, zusätzliche biochemische und molekularbiologische Informationen für den Kliniker und Pathologen während der Biopsie und Probencharakterisierung verfügbar zu machen, sowie für die Erstellung der optimalen Krebstherapie Entscheidungshilfen bereitzustellen. Dadurch können zukünftig verbesserte Diagnoseergebnisse sowie die Überwachung und Optimierung von Chemotherapien erzielt werden.

1.4 Eigene Forschungsergebnisse

1.4.1 Raman-Mikrospektroskopie - Die Methode der Wahl

Jeder musste sich in seinem Leben schon einmal mit Krebs auseinandersetzen, sei es, als Patient selbst, mit einem Betroffenen aus der Familie oder in den Medien. Statistisch betrachtet ist es auch nicht leicht, die Augen zu schließen. Brustkrebs stellt die häufigste bösartige Veränderung der Brustdrüse in Frauen und Männern dar. [43, 45]

Nach der Devise: “Kenne Deinen Feind ...”⁴ beschäftigt sich die Krebsforschung eingehend mit der Krebsentstehung und dessen Entwicklung, um mit Hilfe einer optimalen Diagnose effektivere Therapien entwickeln zu können.

Unter Verwendung der etablierten Diagnosetechniken kann oft erst mit der Kombination aus Histomorphologie und zytodiagnostischer Methode mit fast 100%-iger Sicherheit zwischen einem benignen und malignen Tumor unterschieden werden. Um die medizinische Diagnostik zu verbessern und eine 100%-ige Sicherheit für das Diagnoseergebnis zu erreichen, bedarf es weiterer Techniken, die zusätzliche Informationen über die molekularbiologische Situation in den Krebszellen bereitstellen.

Für die biomedizinische und bioanalytische Anwendung eignet sich besonders die nicht-invasive Raman-Mikrospektroskopie. Da diese Technik die direkte Analyse molekularer Strukturen biologischer Systeme ohne jegliche Probenpräparation oder Markierung mit Farbstoffen bzw. radioaktiven Markern erlaubt, stellt diese Methode optimale Bedingungen für zukünftige *In-vivo*-Untersuchungen zur Verfügung.

1.4.2 Voruntersuchungen zur Auswahl der Messparameter

Mit Hilfe von Voruntersuchungen, welche in Form von Testmessungen an biologischen Materialien wie Gewebeschnitten und einzelnen Zellen durchgeführt wurden, konnte eine geeignete Anregungswellenlänge sowie die Integrationszeit pro Messpunkt gewählt werden. Hierzu muss beachtet werden, dass in Abhängigkeit von der gewählten Laserwellenlänge selektiv Raman-Signale biologischer Systeme untersucht werden können. Die hochspezifischen, fingerabdruckähnlichen Raman-Signale ermöglichen somit Einblicke in die molekularen Eigenschaften und die biochemische Zusammensetzung der Krebszellen. Mit der Anregungswellenlänge von 785 nm (nahe Infrarotstrahlung, NIR-Strahlung) wurden umfangreiche Einblicke in die subzellulären Strukturen, wie Proteine, DNA, Lipide und Kohlenhydrate, während der Testmessungen erreicht. Im Vergleich zu kürzeren Anregungswellenlängen wurden mit 785 nm auf Grund der geringeren Frequenz und der damit verbundenen niedrigeren Energie schwächere Raman-Intensitäten erzielt. Dennoch erwies sich die Verwendung von NIR-Strahlung in Bezug auf das Vorkommen von Fluoreszenz in den Raman-Spektren als vorteilhaft. Verglichen zu kürzeren Anregungswellenlängen ist die Laserwellenlänge von 785 nm weit entfernt von elektronischen Übergängen von Molekülen der biologischen Probe und somit war die Emission von Licht (Fluoreszenz) nach der Anregung im Vergleich zu kürzeren Anregungswellenlängen geringer [158].

Zudem ist bekannt, dass im Gegensatz zu kurzen Anregungswellenlängen (UV) lange Wellenlängen (NIR) vergleichsweise tief in Gewebe eindringen [159, 160, 161], wodurch die Datenaufnahme über die gesamte Probendicke (hier Einzelzellen mit einer Probendicke von 10-20 µm) realisiert werden konnte.

⁴Ausspruch von Sun Tsu (um 544 v. Chr. - um 496 v. Chr.) aus seinem Werk “Über die Kriegskunst”.

Darüber hinaus haben die Testmessungen gezeigt, dass die Anregungswellenlänge von 785 nm minimal invasive auf die Proben wirkt, wodurch Messungen an einzelnen Zellen möglich waren. Hingegen haben Messungen mit der Anregungswellenlänge von 244 nm schon nach geringen Integrationszeiten von weniger als einer Sekunde zur Verbrennung der Proben geführt, daher waren nur Bulkmessungen unter ständiger Bewegung der Probe möglich.

Da die Zellen nach den Raman-spektroskopischen Untersuchungen mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm keinerlei Zerstörung erfahren haben, konnten im Anschluss zusätzliche histomorphologische und zytologische Diagnoseverfahren, wie die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, durchgeführt werden.

Bezüglich der Probenpräparation haben Raman-spektroskopische Voruntersuchungen gezeigt, dass Raman-Spektren von luftgetrockneten Zellen im Vergleich zu mit Paraformaldehyd und Ethanol sowie mit Methanol fixierten Zellen nahezu keine Artefakte aufweisen. Darüber hinaus konnten molekulare Änderungen als Konsequenz der Fixierung in den Raman-Spektren fixierter Zellen in Form von Modifikationen des Profils Protein-spezifischer Banden beobachtet werden. Dementsprechend wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Raman-Messungen an luftgetrockneten Zellen (*in vitro*) durchgeführt.

Wie oben erwähnt, wurde die Raman-Mikrospektroskopie verwendet. Hierdurch wurden die einzelnen Zellen mit einer räumlichen Auflösung von weniger als einem μm (mit einer Laserspotgröße von einem μm und einem Messpunkt Abstand von 0,5 μm) untersucht. Das hierfür verwendete Objektiv zeichnet sich durch eine hohe numerische Apertur (NA) von 0,95 und eine 50-fache Vergrößerung aus. Dementsprechend war es möglich, einzelne Zellen Punkt für Punkt mit einer räumlichen Auflösung von 0,5 μm zu vermessen. Gute Messergebnisse wurden schon nach wenigen Sekunden (10 s Integrationszeit) Anregung mit dem Laser erreicht. Mit Hilfe dieser *Mapping*-Experimente [162] wurde die Erstellung chemischer Karten über die einzelnen Zellen (*Raman-Zell-Maps*) möglich, wodurch zusätzlich zu den biochemischen Informationen morphologische Änderungen/Merkmale der Krebszellen in den Fokus genommen werden konnten.

Wegen des immensen Datenvolumens, der enormen Komplexität der molekularen Informationen in den Raman-Spektren sowie der großen Ähnlichkeit einzelner Spektren innerhalb einzelner Zellmessungen ist eine manuelle Auswertung nahezu unmöglich und macht daher die Verwendung chemometrischer Analysemethoden notwendig.

Mit den erhaltenen Daten waren Untersuchungen zur Wirkungsweise und Effektivität eines bei der chemotherapeutischen Behandlung von Brustkrebspatienten verwendeten Zytostatikum an einzelnen Zellen realisierbar. [MBP2] Darüber hinaus dienen die gesammelten Raman-Daten zur Durchführung von Klassifizierungs- und Identifizierungsexperimenten. [MBP1 und MBP3]

Damit ist die Raman-Mikrospektroskopie eine vielseitig einsetzbare Technologie, die zur Unterstützung und Verbesserung in der Krebsforschung, der medizinischen Diagnostik und Therapie beitragen kann.

1.4.3 Zur Klassifizierung und Identifizierung verschiedener Zelllinien aus Brustgeweben

In der Krebsdiagnose stellt die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) neben der chirurgischen Biopsie und der Stanzbiopsie eine sehr schnelle, kosteneffiziente und wenig invasive Technik [163, 164, 165] zur Probenentnahme dar. Da nur wenige Zellen aus dem Tumorverband entnommen werden, besteht jedoch eine hohe Falsch-Positiv-Rate [166, 167, 168, 169]. Dadurch werden zusätzliche Techniken notwendig, um größere Proben zu erhalten und damit verbunden weitere histologische Diagnosen zu erzielen. Diese Eingriffe sind jedoch mit einem größeren Aufwand und mit Mehrkosten verbunden. Dennoch werden in der histologischen und zytologischen Krebsdiagnose keine 100%-igen Resultate für das *Grading* und *Staging* erreicht. [165, 169]

Um mittels Raman-Mikrospektroskopie, einer markerfreien Methode, objektive Informationen zur Verbesserung der Diagnoseresultate allein aus Feinnadelaspiraten zu erzielen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Identifizierungs- und Klassifizierungsexperimente auf Einzelzellebene unternommen (siehe [MBP1] und [MBP3]).

Hierfür wurde die maligne Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 mit der “normalen” Zelllinie MCF-10A verglichen. Die eigentliche Differenzierung zwischen der malignen und “normalen” Zelllinie wurde mit Hilfe der zellkernspezifischen Raman-Signale realisiert, worauf Identifizierungsexperimente nachfolgend möglich wurden. [MBP1]

Darüber hinaus wird hier die Klassifizierung von sechs malignen Brustkrebs-Zelllinien aufgezeigt, wobei zur Unterscheidung die gesamte Raman-spektroskopische Zellinformation Verwendung fand. Weiterführend wird gezeigt, dass unter Betrachtung unterschiedlicher Aspekte, wie dem Ursprung der Zelllinien oder den auf dem Genexpressionsprofil basierenden Brustkrebssubtypen, die Differenzierung verschiedener Brustkrebs-Zelllinien möglich war. [MBP3]

1.4.3.1 Studien zur Identifizierung maligner und “normaler” Brustdrüsenzellen (MCF-7 und MCF-10A) basierend auf zellkernspezifischen Raman-Spektren [MBP1]

Ursächlich für Krebs sind aufeinanderfolgende Mutationen des Genoms, die nicht durch reguläre Reparaturmechanismen beseitigt werden können und im Zuge der Karzinogenese Veränderungen verursachen, welche sich in den typischen Eigenschaften der Krebszellen widerspiegeln (siehe Absatz *Merkmale der Krebszellen*). Diesen Wandel kann man in der Morphologie der Zellkerne erkennen. Mittels geeigneter Färbungen werden diese Änderungen sichtbar und der Pathologe kann sie als Kriterium während der Tumorcharakterisierung nutzen.

Entsprechend wurden in dieser Arbeit Untersuchungen auf Einzelzellebene anhand von zellkernspezifischen Raman-Spektren durchgeführt. [MBP1] Hierfür war es zuvor notwendig die Raman-Spektren mit Zellkerninformation zu extrahieren. Im Anschluss daran wurde zwischen “normalen” Epithelzellen der Brust und malignen Brustkrebszellen unterschieden. Die hier verwendeten Klassifizierer (chemometrischer Methoden) wurden im Vorfeld mit nur wenigen Raman-Daten trainiert, um für die anschließende Identifizierung einen sehr großen Anteil unbekannter Daten zur Verfügung stellen zu können. Das ist ein notwendiger Schritt in der Evaluierung einer statistischen Analyse, damit nicht nur nach der Individualität jeder einzelnen Zelle, welche in eukaryotischen Zellen schwingungsspektroskopisch detektierbar ist, getrennt wird, sondern eine reale Identifizierung einzelner Raman-Spektren als zugehörig zur benignen (MCF-10A)

oder malignen (MCF-7) Zelllinie realisiert werden kann. Diese beiden Zelllinien wurden gewählt, um mit einem einfachen Modell die Unterscheidung zwischen Krebszellen und "normalen" Zellen auf Einzelzellebene zu realisieren. Mit der erfolgreichen Klassifizierung, dem Zusammenfassen einzelner Raman-Spektren der jeweiligen Zelllinien in definierte Klassen, welche auf Grundlage bestimmter Merkmale vorgegeben werden, wurden weiterführende Identifizierungsexperimente durchgeführt. Die Identifizierung erlaubt es unbekannte Raman-Spektren, durch das Vorhandensein bestimmter Merkmale, richtig in definierte Klassen einzuordnen. Für die Umsetzung der Klassifizierungs- und Identifizierungsexperimente wurden geeignete statistische AuswerteprozEDUREN erarbeitet.

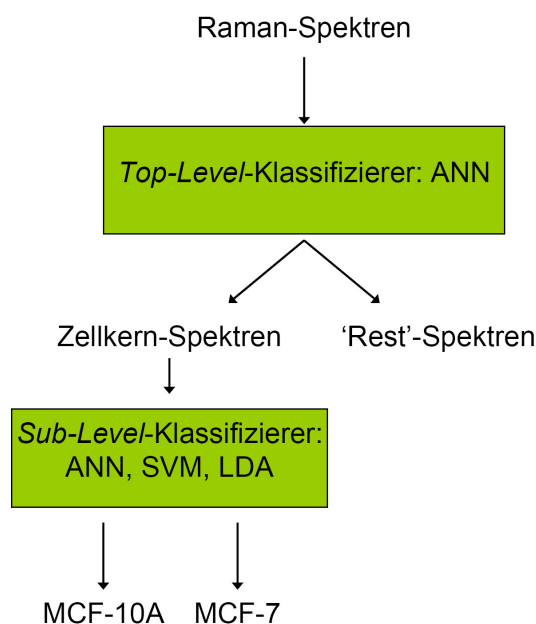


Abb. 1.2: Das Prinzip des zweistufigen Klassifizierungsmodells. Die aufgenommenen Raman-Daten werden durch den *Top-Level-Klassifizierer* in Kern-Spektren und 'Rest'-Spektren unterschieden. Worauf die Zuordnung der Kern-Spektren zu den beiden Zelllinien (MCF-7 und MCF-10A) mittels *Sub-Level-Klassifizierer* ermöglicht wird.

Ein künstliches neuronales Netz (engl.: *artificial neural network*, ANN) fungiert als *Top-Level-Klassifizierer*, wodurch die Zellkern-Spektren von den 'Rest'-Spektren, welche Informationen des Substrates und Zytoplasmas enthalten, getrennt werden. Im zweiten Teil dieses Modells trifft der *Sub-Level-Klassifizierer* die Entscheidung über die Zugehörigkeit der Raman-Daten zu den Zelllinien MCF-7 und MCF-10A. Für diesen zweiten Schritt wurden als Klassifizierer sechs überwachte Methoden getestet, in welchem Maß diese für die Klassifizierung geeignet sind. Hierbei handelt es sich um die lineare Diskriminanzanalyse (LDA), eine lineare, polynomiale und radiale *support vector machine* (SVM) sowie die ANNs (60:10:1) und (60:15:1)⁵. Die Modelle wurden durch eine 25-fache Kreuzvalidierung bewertet. Im Anschluss an die Klassifizierungs-

Mit dem Ziel der Vergleichbarkeit der Raman-Spektren wurden vor der eigentlichen Auswertung entsprechende Methoden zur Vorbehandlung der Raman-Daten durchgeführt. Hierzu zählen die Entfernung der kosmischen *Spikes*, die Wellenzahlkalibrierung (Referenzsubstanz 4-Acetamidophenol), die Korrektur des Fluoreszenzuntergrundes, die Vektornormierung sowie eine Dimensionsreduzierung durch eine Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principal component analysis*, PCA) auf 60 Hauptkomponenten (*principal components*, PCs), die ca. 98% der Varianz der Daten abdecken und wodurch zusätzlich das weiße Rauschen in den Raman-Spektren unterdrückt wurde.

Um die Differenzierung der beiden Zelllinien auf Grundlage der Zellkerninformation zu realisieren, wurde die Analyse der Daten in einem Zweistufenmodell, das aus einem *Top-Level-Klassifizierer* und einem *Sub-Level-Klassifizierer* besteht (siehe Abbildung 1.2), hierarchisch organisiert.

⁵Die Werte geben an, wie viele künstliche Neuronen in den jeweiligen Schicht vorhanden sind. Hier beispielsweise 60 in der Eingabeschicht, 15 in der versteckten Schicht und eins in der Ausgabeschicht.

experimente wurden dann Identifizierungen an unbekanntem Raman-Daten (*Test-Set*) durchgeführt.

Für das Training des *Top-Level*-Klassifizierers war es zuvor notwendig, geeignete Raman-Kernspektren auszuwählen. Hierfür wurde die Intensität der zellkernspezifischen Raman-Banden einzelner Spektren innerhalb einzelner Zellmessungen manuell miteinander verglichen, wodurch 328 Raman-Kernspektren für das Training zur Verfügung standen. Die Raman-Signale bei 811 und 785 cm^{-1} , welche entsprechend der O-P-O-Streckschwingung des RNA-Rückgrades und der O-P-O-Streckschwingung des DNA-Rückgrades zugeschrieben werden, zählen neben der Schwingung für die Nukleobasen Adenin und Guanin bei 1575 cm^{-1} zu den kernspezifischen Schwingungen, auf welchen während der manuellen Datenauswahl der Fokus lag. Mit diesen 328 Raman-Kernspektren wurde dann der *Top-Level*-Klassifizierer trainiert.

Wie in Abbildung 2 in [MBP1] dargestellt wird, zeigen die Mittelwert-Raman-Spektren der manuell ausgewählten (1) und der berechneten Raman-Spektren nach der Klassifizierung (2) große Übereinstimmungen in den Raman-Signalen. Diese Ähnlichkeiten der Raman-Spektren beruhen auf der Erhöhung der DNA/RNA-Signale. Im Gegensatz dazu zeigt das Mittelwert-Raman-Spektrum der kernfernen Zellbereiche (3) große Unterschiede im Vergleich zu den Kernspektren (siehe Abbildung 2 in [MBP1]). Die Unterschiede zwischen den Raman-Spektren (2) und (3) begründen sich nicht nur in den unterschiedlichen Signalintensitäten der DNA/RNA-Banden, sondern auch in der Amid-I-Schwingung bei 1660 cm^{-1} , der $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ Schwingung von Proteinen bei 1316 cm^{-1} und der Amid-III-Schwingung bei 1251 cm^{-1} . Diese Resultate verdeutlichen ein vergleichsweise höheres Raman-Signal von Proteinen in den kernspezifischen Raman-Spektren und ein höheres Lipid-Signal bei 1746 cm^{-1} in den zytoplasmazugehörigen Raman-Spektren. Der hohe Anteil an Proteininformationen lässt sich dadurch erklären, dass die Raman-Kern-Spektren im Bereich der größten Probentiefe verglichen zum Randbereich einer Zelle gemessen wurden. Der hohe Lipidanteil begründet sich in dem Vorhandensein von Lipiddoppelschichten der Zellmembran und einzelner Kompartimente (Golgi-Apparat, Vesikel, Mitochondrien), welche in hohem Maße im Zytoplasma zu erwarten sind.

Insgesamt wurden durch den *Top-Level*-Klassifizierer 2.588 Raman-Spektren des Trainings-Sets als Kernspektren identifiziert. Darin sind 596 von 9.273 Raman-Spektren aus fünf Zellen der Zelllinie MCF-10A und 1992 von insgesamt 16.431 Raman-Spektren aus fünf Zellen der Zelllinie MCF-7 zusammengefasst (siehe Tabelle 1 in [MBP1]). Das Ungleichgewicht in der Kernspektren-Verteilung zwischen den Zelllinien resultiert aus der Tatsache, dass maligne Zellen durch einen höheren DNA/RNA-Gehalt charakterisiert sind. Ein ähnlicher Effekt konnte in der Datenverteilung des *Test-Sets* beobachtet werden. Hier wurden 4.266 Raman-Kern-Spektren aus insgesamt 34.284 Raman-Spektren identifiziert. Im Detail sind 828 Raman-Spektren von insgesamt 16.896 Raman-Spektren aus einer Zelle der Zelllinie MCF-10A und 3.438 Raman-Kern-Spektren von 17.388 Zell-Spektren aus einer Zelle der Zelllinie MCF-7 identifiziert worden (siehe Tabelle 1 in [MBP1]).

Zur Untersuchung der Fähigkeit des *Top-Level*-Klassifizierers wurden mit Hilfe der Referenzspektren von DNA, Kollagen I, Histon und Lipoproteinen verschiedene Mischspektren inklusive eines simulierten Rauschens kalkuliert. Durch eine "Pseudo"-Kalibrierung wurden die Daten, welche aus dem *Top-layer*-ANN resultieren, so angepasst, dass die DNA-Verteilung als Konsequenz der Kernmorphologie dargestellt werden konnte (siehe Abbildung 3 in [MBP1]). Hierzu deutet ein Korrelationskoeffizient

von 0,98 auf einen hohen Anteil an DNA und somit auf eine hohe Übereinstimmung der Daten. Erreichten die Daten Korrelationskoeffizienten mit negativen Werten, so konnten nur Zusammenhänge mit den Referenzsubstanzen Kollagen I, Lipoprotein und Histon gefunden werden und es gab keinen Zusammenhang zu den kernspezifischen Bereichen in den Zellen. Die Visualisierung der Kernstrukturen innerhalb der Zellen lässt eine Beurteilung morphologischer Änderungen zu. Dementsprechend stellen die Raman-Zell-Maps ein geeignetes Mittel dar, um dem Pathologen während der Diagnose zusätzliche Informationen zur Verfügung zu stellen.

Im zweiten Teil wurden dem *Sub-Level*-Klassifizierer die zellkernspezifischen Raman-Spektren des Trainings-Sets (25.704 Kernspektren) zugetragen und mit einer LDA, linearen SVM, polynomialen SVM, radialen SVM, mit einer ANN (60:15:1) und einer ANN (60:10:1) klassifiziert. Durch eine 25-fache Kreuzvalidierung wurden diese Methoden bewertet. Die Ergebnisse der Bewertung sind in der *Receiver Operating Characteristic*-Grafik (ROC) in Abbildung 5 in [MBP1] dargestellt. In dieser Grafik sind für die sechs Klassifizierer die Sensitivität und die *false positive rate* (1-Spezifität) gegeneinander aufgetragen. Daraus wurden die Klassifizierungsgenauigkeiten, welche zwischen 97,75 % (radiale SVM) und 99,59 % (60:10:1 ANN) lagen, berechnet. Die Klassifizierungsgenauigkeit gibt für den Klassifizierer einen Wert für die Korrektlassifikationsrate an, indem die Gesamtheit der richtig klassifizierten Raman-Spektren durch die Gesamtzahl aller Daten dividiert wird. Die Sensitivität (*true positive rate*, *TP rate*) lag für alle Methoden über 98,5 % und gibt, indem sie aufzeigt, wieviele der tatsächlichen positiven auch als positiv eingeordnet wurden, eine Auskunft über die Empfindlichkeit der Klassifizierer an. Die Spezifität (*true negative rate*) hingegen erreichte nur für vier Modelle mehr als 95,0 % (siehe Abbildung 5 in [MBP1]).

Im nächsten Schritt wurde die Identifizierung als maligne oder "normale" Zelle anhand der kernspezifischen Raman-Spektren des Test-Sets unter Verwendung der drei ausgewählten Modelle, die LDA, die linearen SVM und das ANN (60:15:1), umgesetzt. Die Identifizierungsraten der drei überwachten Methoden zeigten gute Ergebnisse (siehe Tabelle 2 in [MBP1]). Hierbei wurden Identifizierungsgenauigkeiten von 96,51 % (lineare SVM) bis 99,11 % (ANN) erreicht. Die *TP rate* lag für die verwendeten Methoden zwischen 99,65 % (lineare SVM) und 99,79 % (LDA). Speziell mit der ANN konnten gute Identifizierungsergebnisse erreicht werden. Dementsprechend lag die Wahrscheinlichkeit krebsspezifische Zellkernspektren auch als solche zu erkennen (Sensitivität), bei 99,71 %. Die *false positive rate* (FP rate) lag bei 3,38 % (Spezifität von 96,62 %).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass mit der Raman-Mikrospektroskopie unter Verwendung chemometrischer Auswerteverfahren (ANN) die Untersuchung morphologischer Änderungen der Zellkerne in Brustdrüsenzellen *in situ* ohne zusätzliche Färbungen möglich ist. Die hierbei verwendeten Raman-Spektren enthalten ausreichend biochemische Informationen, um in der Krebsdiagnostik die Unterscheidung zwischen "normalen" und malignen Zellen zu erleichtern. Mit den hier erlangten Ergebnissen konnte dargestellt werden, dass Klassifizierungsgenauigkeiten zur Unterscheidung zwischen einer "normalen" und einer malignen Zelllinie (MCF-10A und MCF-7) mit der Raman-Spektroskopie und Chemometrie zwischen 97,75 % und 99,59 % möglich sind. Für die klinische Diagnose stellt jedoch die Identifizierung unbekannter Proben den entscheidenderen Aspekt dar. Dementsprechend wurden Identifizierungsexperimente mit dem Modell unbekanntem Raman-Spektren der beiden Zelllinien durchgeführt. Mit Hilfe der zuvor trainierten Klassifizierer wurden die Raman-Spektren

mit Identifizierungsgenauigkeit zwischen 96,51 % bis 99,11 % korrekt als Zugehörige der entsprechenden Zelllinien erkannt.

Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Differenzierung verschiedenen malignen Krebszelllinien, sowie mit der Unterscheidung der Zelllinien nach deren Ursprung und den Genexpressionsprofilen (Brustkrebssubtypen). Der Fokus lag in den folgenden Untersuchungen nicht auf der Identifizierung unbekannter Proben sondern eher auf der Ausarbeitung krebspezifischer Kriterien in den Raman-Spektren, die für erfolgreiche Klassifizierungsexperimente einsetzbar sind.

1.4.3.2 Zur Klassifizierung verschiedener Brutkrebszelllinien nach krebs-spezifischen Aspekten [MBP3]

Nachdem zuvor das Potenzial der Raman-Mikrospektroskopie zur Unterscheidung zwischen "normalen" und malignen Zellen dargestellt werden konnte, soll nun auf die Differenzierung verschiedener Brustkrebszelllinien und die Klassifizierung nach verschiedenen Merkmalen wie dem Ursprung und den Brustkrebssubtypen der Zelllinien eingegangen werden.

Für die Untersuchungen wurden die Brustkrebszelllinien MCF-7, BT-20, HCC-1143, T47-D, MT-3 und JIMT-1 ausgewählt. [MBP3] In Tabelle 1.1 werden die Informationen zur histologischen Diagnose, den Brustkrebssubtypen (im Detail der Status der Östrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und dem Status der ERBB2/HER2-Proteine) sowie dem Ursprung der Brustkrebszelllinien dargelegt. Der Ursprung der jeweiligen Zelllinien sowie die Einordnung zu den jeweiligen Brustkrebs-Subtypen soll die Variabilität der gewählten Zelllinien verdeutlichen. Im Detail wurden die Zelllinien entweder dem Primärtumor entnommen (MT-3, BT-20, HCC-1143) oder sie sind metastatischen Ursprungs (MCF-7, T47-D, JIMT-1). Des Weiteren gehören die Brustkrebszelllinien verschiedenen Subtypen an. Dementsprechend werden die Zelllinien MT-3, BT-20 und HCC-1143 dem basalartige Subtypen zugeordnet, die Zelllinien MCF-7 und T47-D zählen zum luminalen Subtypen und die Zelllinie JIMT-1 gehören dem HER2+/ER- Subtypen an.

Die Subtypen wurden entsprechend dem Genexpressionsprofil der Zelllinien charakterisiert [176, 74]. Da Brustkrebs auf molekularer Ebene als sehr heterogene Erkrankung bekannt ist, sind Klassifizierungsexperimente auf Grundlage der Subtypen vielversprechend. Die Zuordnung der einzelnen Subtypen zu den jeweiligen Brustkrebszelllinien wurde anhand entsprechender Literatur durchgeführt und orientiert sich hauptsächlich an dem Status der Hormonrezeptoren (ER, PR) sowie dem Vorhandensein des ERBB2/HER2-Proteins. Dementsprechend ist der basalartige Subtyp durch einen negativen Status für ER, PR und ERBB2/HER2 charakterisiert. Ein positiver Status für die Progesteron- und Östrogenrezeptoren verbunden mit einem negativen Status für ERBB2/HER2 zeichnen die Zelllinien aus, die dem luminalen Subtyp angehören. Im Gegensatz dazu zeichnet den HER2+/ER- Subtypen ein positiver ERBB2/HER2-Status und ein negativer Status für ER und PR aus. Die Variabilität der gewählten Brustkrebszelllinien soll ein lebensnahes Modellsystem darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Klassifizierungsexperimente durchgeführt [MBP3]. Hierfür fanden alle Raman-Zell-Spektren der sechs Brustkrebszelllinien Verwendung. Durch die Anwendung einer *support vector machine* (SVM) wurden die Raman-Daten entsprechend der einzelnen Zelllinien klassifiziert. Zusätzlich wurden die Raman-Spektren nach dem Ursprung der Zelllinien (primärer Tumor vs. Pleuraerguss) mittels LDA getrennt und im letzten Klassifizierungsexperiment fand

Tabelle 1.1: Übersicht der Charakteristika aller im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersuchten Brustkrebszelllinien. Die **fett** markierten Zelllinien beziehen sich auf die aktuelle Arbeit [MBP3]. Die angegebene Gesamtzahl der Zell-Scans je Zelllinie bezieht sich ebenfalls nur auf die Arbeit [MBP3].

Zelllinie	Anzahl Zell-Scans	Ursprungsgewebe	histopathologische Diagnose	ER-Status	PR-Status	ERBB2/HER2 Status	Subtypen	Referenzen
MCF-10A		normales Brustepithel	fibrozystisches Brustgewebe				normal basalartig HER2+/ER-	[170, 171]
MT-3	5	Primärtumor	Adenocarcinoma	-	-	-	basalartig	[172, 173] [174, 175]
BT-20	19	Primärtumor	Adenocarcinoma (IDC)	-	-	-	basalartig	[176, 177] [178, 179]
HCC-1143	23	Primärtumor Carcinoma	Ductales	-	-	-	basalartig	[176, 179]
MCF-7	16	Metastase Pleuraerguss	metastatisches Adenocarcinoma (IDC)	+	+	-	luminal A	[176, 74, 177] [179, 180] [181, 171]
T47-D	19	Metastase Pleuraerguss	Invasives Ductales Carcinoma (IDC)	+	+	-	luminal A	[176, 74, 177] [179, 171, 182]
JIMT-1	26	Metastase Pleuraerguss	Invasives Ductales Carcinoma (IDC)	-	-	+	HER2+/ER-	[183, 171]

die Differenzierung der Raman-Daten entsprechend der Brustkrebssubtypen durch eine LDA statt.

Hierfür wurden zur Auswertung der aufgenommenen Raman-Daten angepasste Klassifizierungsmodelle erarbeitet. Zuvor sind die gesamten Raman-Daten einer Vorbehandlung zur Korrektur der Basislinie, des Fluoreszenzuntergrundes und der kosmischen Strahlung unterzogen wurden. Wie schon erwähnt, wurde auch hier die Wellenzahlkalibrierung mit den Referenzspektren der Substanz 4-Acetamidophenol durchgeführt. Anschließend wurde zur Dimensionsreduktion eine PCA durchgeführt. Da die Anzahl der Hauptkomponenten jeweils vom Klassifizierer selbst und der Anzahl der zu trennenden Klassen abhängig ist, variiert diese entsprechend für jedes Klassifizierungsexperiment. Dementsprechend wurden für die SVM 20 PCs, für die LDA zur Trennung nach dem Zelllinien-Ursprung 30 PCs und 50 PCs für die Klassifizierung nach den Brustkrebssubtypen empirisch ermittelt.

Für die Klassifizierungsexperimente wurden zwei unabhängige Datensätze genutzt, die insgesamt 108 Raman-Scans der verschiedenen Zelllinien beinhalten. Die Raman-Zell-Scans des ersten Datensatzes erreichen Dimensionen von ca. 50 x 70 Messpunkten, welche mit einem Abstand von 0,5 μm aufgenommen wurden. Demzufolge beinhalten die Raman-Daten die chemische Information der gemessenen Krebszelle sowie des umgebenden Substrates (Quarzobjektträger). Um den Anteil der Substratinformation gering zu halten, wurde eine Vorselektion geeigneter Raman-Spektren notwendig. Dementsprechend wurde der 'cell value' für jedes Raman-Spektrum berechnet. Mit diesem 'cell value' wurde der Anteil an biochemischer Information in den einzelnen Raman-Spektren definiert und ein Maß für die experimentelle Verwertbarkeit der einzelnen Raman-Spektren festgelegt.

Im Einzelnen wurde hierfür das Verhältnis aus der maximalen Raman-Intensität im Wellenzahlbereich zwischen 1426 und 1467 cm^{-1} (CH_2 -Schwingung) und der Summe der Raman-Intensitäten im Wellenzahlbereich zwischen 737 und 876 cm^{-1} (Schwin-

gungen des Phosphat-Rückgrad der DNA, der Aminosäuren sowie Quarzsignale vom Untergrund) betrachtet. Erreicht der 'cell value' einen Wert größer als 0,013, beinhalten die Raman-Spektren einen ausreichend großen Anteil an biologischer Information und werden als Raman-Zell-Spektren eingeteilt. Zusätzlich wurden zur Verifizierung Vergleiche der visualisierten 'cell values' über die gemessene Region mit Weißlichtbildern der Zellen durchgeführt. Zur Verdeutlichung ist das Beispiel einer BT-20-Zelle in Abbildung 1.3 dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass der visualisierte 'cell value' über 0,013 mit der Form der Zelle in dem dazugehörigen Weißlichtbild übereinstimmt.

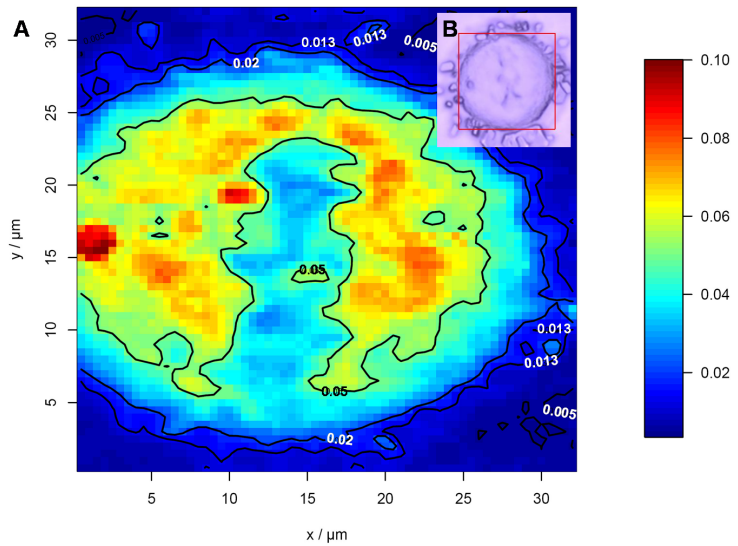


Abb. 1.3: Darstellung des 'cell value' als Raman-Map einer Zelle der Zelllinie BT-20 (A). Die schwarzen Linien verdeutlichen die Grenzen der 'cell value' von 0,005, 0,013 und 0,02. Diese deuten darauf hin, dass ein 'cell value' von 0,013 ein optimaler Schwellenwert zur Trennung zwischen Zellinformation und Substrat ist. Im Vergleich dazu das Weißlichtbild derselben Zelle (B).

'cell value' der Daten jeder einzelnen Zellmessung beider unabhängiger Datensätze wurden 65,7 % der gesamten Raman-Daten (61.580 Raman-Zell-Spektren) für die Klassifizierungsexperimente verwendet.

Das Klassifizierungsexperiment zur Unterscheidung der einzelnen Raman-Zell-Spektren nach der jeweiligen Zelllinie erbrachte nahezu fehlerfreie Ergebnisse siehe Tabelle 1 in [MBP3]. Die Raman-Zell-Spektren konnten mit einer Genauigkeit von 99,52 % den entsprechenden Brustkrebszelllinien zugeordnet werden. Dabei wurden Spezifitäten (*true negative rate*) von 99,99 % (MT-3) bis 99,96 % (T47-D und JIMT-1) erreicht. Die Sensitivitäten lagen zwischen 98,05 % (MT-3) und 99,89 % (MCF-7).

Mit den erhaltenen Resultaten lässt sich verdeutlichen, dass die Raman-Zell-Spektren signifikante Merkmale und somit charakteristische Unterschiede der einzelnen Zelllinien enthalten. Dementsprechend ist die Zuordnung zu den verschiedenen Brustkrebszelllinien anhand einzelner Raman-Zell-Spektren mit einer erheblichen Genauigkeit realisierbar (siehe Tabelle 1 in [MBP3]).

Zusätzlich wurden die Daten der einzelnen Zellen bezüglich ihrer zellinternen Korrelation korrigiert. Hierzu wurden die Raman-Daten Zellweise mittels *leave-one-cell-out*

Im zweiten Datensatz sind ausschließlich kleinere Raman-Messungen enthalten. Der Messbereich befand sich hierfür inmitten der Krebszellen und ist auf 10 x 10 Messpunkte begrenzt, die ebenfalls mit einem Abstand von 0,5 µm aufgenommen wurden. Mit dieser Messmethode wurde die Messzeit pro Zelle enorm verringert. Gegenüber der benötigten Messzeit zur Untersuchung einer kompletten Zelle konnten ca. 15 kleinere Zellmessungen durchgeführt werden, wodurch zusätzlich die Variabilität innerhalb der einzelnen Zelllinien berücksichtigt werden konnte.

Nach der Vorselektion durch die Bestimmung des

Kreuzvalidierung evaluiert. In diesem Zusammenhang konnten die Raman-Daten mit einer Genauigkeit von 97,22 %, welche vergleichbar mit dem Ergebnis des korrekturfreien Modells ist, richtig zugeordnet werden. Da in der späteren praktischen Anwendung nur wenige Einzelmessungen/Punktmessungen und keine Raman-Zell-Scans über eine gesamte Zelle durchgeführt werden können, wurde bei der Auswertung auf die rechnerisch aufwendige Korrektur der internen Korrelation verzichtet.

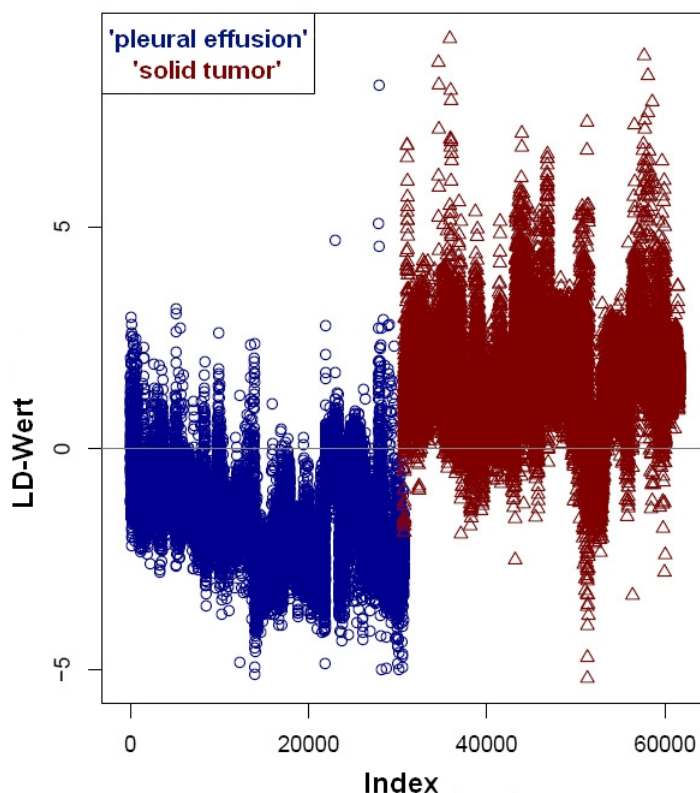


Abb. 1.4: Die Darstellung zeigt das Resultat der Klassifizierung nach dem Ursprung der Zelllinien. Die Grafik verdeutlicht die Verteilung der einzelnen Raman-Spektren für die beiden Gruppen 'solid tumor' (Δ) und 'pleural effusion' (\circ).

Raman-Spektren in die Gruppe 'pleural effusion' wurde für 29.022 von 30.749 Raman-Spektren erreicht. Damit lag die Klassifizierungsgenauigkeit für dieses LDA-Modell zur Trennung nach dem Zelllinienursprung bei 94,04 % mit Spezifitäten von 94,4 % und 93,7 % jeweils für die Gruppen 'solid tumor' und 'pleural effusion'.

In Abbildung 1.4 wird hierzu die Verteilung der einzelnen Raman-Spektren graphisch dargestellt, wodurch ersichtlich wird, dass der Bereich zwischen den beiden Gruppen 'solid tumor' und 'pleural effusion' keine klare Grenze aufweist, da hier eine Überlagerung vieler Raman-Spektren vorliegt. Die Einflüsse, die während der Etablierung und *in vitro* Kultivierung auf die Zelllinien einwirken, sind in Bezug auf die Information über den Ursprung in gewissem Maße vorhanden und daher ist die Klassifizierung auf Grundlage der Raman-Daten nach dem Zelllinien-Ursprung nur erschwert umsetzbar.

Ein weiterer diagnostischer Schritt war die Trennung der Raman-Zell-Spektren nach den entsprechenden Genexpressionsprofilen, welche den zuvor ausführlich beschriebe-

Darüber hinaus wurde ein Klassifizierungsmodell zur Trennung der Raman-Spektren nach dem physiologischen Zelllinienursprung unter Verwendung einer Linearen Diskriminanzanalyse durchgeführt. Die Zelllinien MT-3, BT-20 und HCC-1143 haben ihren Ursprung in soliden Tumoren (Gruppe 'solid tumor'), wohingegen die Zelllinien MCF-7, JIMT-1 und T47-D aus dem Pleuraerguss (Gruppe 'pleural effusion') von Brustkrebspatienten entstammen. Die erhaltenen Klassifizierungsergebnisse zeigen, dass von insgesamt 30.839 Raman-Spektren der Krebszelllinien, die ihren Ursprung in soliden Tumoren haben, 28.896 Raman-Spektren korrekt zugeordnet und 1.943 Spektren falsch klassifiziert wurden. Die richtige Zuordnung der

nen Brustkrebs-Subtypen entsprechen. Dementsprechend wurden die Raman-Daten mit Hilfe einer LDA nach ihrem molekularen Profil unterschieden. In Abbildung 1.5 ist die Verteilung der einzelnen Raman-Zell-Spektren dargestellt. Innerhalb der Kreise wurden insgesamt 95,4 % der Raman-Daten für die jeweiligen Brustkrebs-Subtypen lokalisiert. Dieses Datenvolumen korreliert mit der doppelten Standardabweichung. Hierzu zeigt Tabelle 3 in [MBP3], dass 30.304 Raman-Zell-Spektren von insgesamt 30.839 korrekt dem basalartigen Subtypen zugeordnet wurden. Außerdem wurden von 13.039 Raman-Daten 12.461 richtig dem HER2+/ER- Subtypen zugeschrieben und 17.253 von 17.710 Raman-Spektren wurden korrekt als dem luminalen Subtypen zugehörig klassifiziert. Dementsprechend konnte eine Klassifizierungsgenauigkeit von 97,45 % erreicht werden. Die Spezifitäten und Sensitivitäten lagen entsprechend für den basalartige, luminalen und den HER2+/ER- Subtypen bei 97,78 % und 98,27 %; 98,97 % und 97,42 % sowie 99,11 % und 95,57 %.

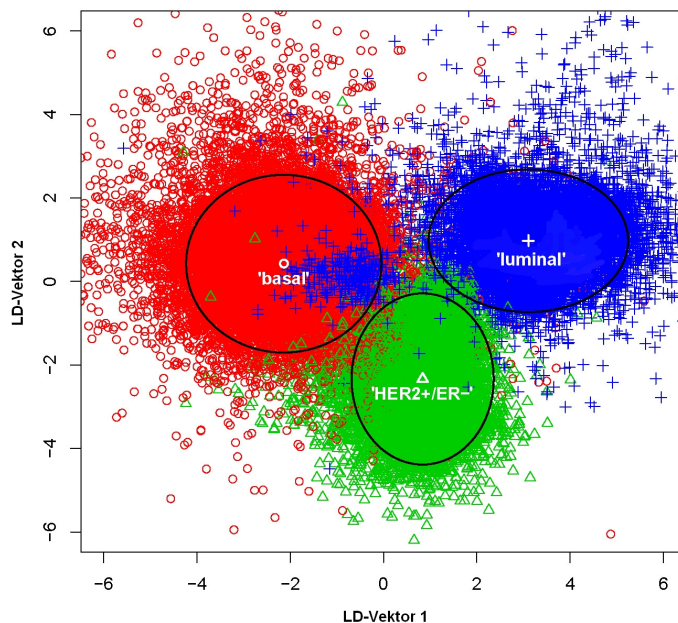


Abb. 1.5: Die dargestellten Wolken verdeutlichen die Trennung der einzelnen Raman-Spektren nach dem 'basalartigen' (○), dem 'luminalen' (+) und dem 'HER2+/ER-' (△) Brustkrebs-Subtypen.

Charakteristika einzelner Krebszellen ohne die Verwendung von zeitaufwendigen Färbemethoden und zusätzlichen Probenentnahmen (Biopsien) dargestellt werden. Durch die Kombination der Raman-Spektroskopie mit ausgewählten chemometrischen Methoden kann die klinische Diagnose verbessert werden, wodurch zusätzliche zytologische und histologische Auswertungen unnötig werden.

Mit diesem Klassifizierungsexperiment konnte dokumentiert werden, dass auch für die Bearbeitung hochspezifischer Fragestellungen die Raman-Mikrospektroskopie eine geeignete Methode darstellt. Die erfolgreiche Trennung einzelner Raman-Zell-Spektren nach den entsprechenden Brustkrebs-Subtypen der Zelllinien eröffnet damit weitreichende Möglichkeiten in der Krebsdiagnose und würde die Charakterisierung der FNABs durch die erfahrenen Pathologen mittels objektiver Informationen unterstützen.

Im Rückblick auf die erlangten Resultate konnte das Potential der Raman-Mikrospektroskopie zur Beurteilung diagnostischer

1.4.4 Zur Erforschung der medikamentösen Krebstherapie (Chemotherapie) - Studien über den Wirkungsmechanismus und die Effektivität von Docetaxel (DCT) am Beispiel der Brustkrebszelllinie MCF-7 [MBP2]

In diesem Abschnitt soll nun auf die Anwendbarkeit der Raman-Mikrospektroskopie kombiniert mit chemometrischen Auswertemethoden in der Erforschung der Wirkungsweise von Zytostatika und der molekularbiologischen Änderungen in Krebszellen nach chemotherapeutischen Behandlungen eingegangen werden.

Wegen der geringen Effektivität von Chemotherapien von nur 25 % [184] und der damit einhergehenden hohen Mortalitätsrate von Brustkrebspatienten ist es von enormer Wichtigkeit, ein umfangreiches Wissen über die Mechanismen und die Effektivität der Zytostatika zu erlangen. Damit verbunden würde eine Verbesserung in der Therapie selbst sowie eine Optimierung in der personalisierten Therapieerstellung ermöglicht werden.

Beispielhaft wurden der Wirkungsmechanismus und die Effektivität des Zytostatikum Docetaxel (DCT), welches, wie zuvor im Abschnitt *Therapiemethoden* erwähnt wurde, während der Mitose an die Mikrotubuli des Spindelapparates bindet und dadurch die dynamische Reorganisation dieser Strukturen stört, untersucht. [MBP2] Hierfür wurden Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen des Zytostatikum DCT inkubiert. Nach unterschiedlichen Behandlungszeiten wurden die Proben durch die Kombination aus Raman-Mikrospektroskopie und chemometrischen Methoden untersucht [MBP3]. Dementsprechend wurden morphologische Änderungen in behandelten Zellen mit Hilfe der Raman-Daten (Raman-Zell-Maps) untersucht und die Ergebnisse mit dem histologischen Goldstandard - der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung - verglichen. Des Weiteren wurden die Raman-Spektren der Zellkerne zur Unterscheidung von behandelten und unbehandelten Zellen verwendet sowie die Zellantwort auf das Zytostatikum DCT (*cell-drug response*) mittels geeigneter Auswerteprozeduren quantifiziert.

Für die Untersuchungen wurden Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 für unterschiedliche Inkubationszeiten (24, 48 und 24+24 h) mit DCT-Konzentrationen von 0, 2,5, 5, 7,5, 10 und 100 nmol/l behandelt (siehe Tabelle 1 in [MBP2]). Bei der Inkubationszeit 24+24 h wurde nach 24 h der DCT-Behandlung eine Weiterkultivierung in DCT-freiem Kulturmedium veranlasst. In der ersten Testserie wurden die Zellen mit DCT-Konzentrationen von 10 und 100 nmol/l für 24, 48 und 24+24 h inkubiert. Für die zweite Testserie wurden die Zellen mit DCT-Konzentrationen von 2,5, 5, 7,5, 10 und 100 nmol/l für 48 h behandelt.

Zu Beginn der Reaktion induziert DCT in Epithelzellen die Fragmentierung der Zellkerne. Um diese DCT-induzierten morphologischen Änderungen zu visualisieren, wurden Raman-Zell-Maps mittels statistischer Methoden erstellt. Für die Analyse der *xy*-Scans der einzelnen Brustkrebszellen wurde ein künstliches neuronales Netz (*artificial neural network*, ANN) verwendet. Mit dieser Methode konnte die Verteilung der Kernstrukturen in den Raman-Zell-Maps unter Verwendung der DNA/RNA-Information aller aufgenommenen Raman-Spektren dargestellt werden. Als zerstörungsfreie Methode erlaubt es die Raman-Mikrospektroskopie, nachträglich Färbemethoden anzuwenden. Dementsprechend wurden zur Evaluierung der chemometrisch erstellten Raman-Zell-Maps HE-Färbungen durchgeführt. Es konnte beispielhaft im Vergleich mit dem entsprechenden HE-Bild einer Zelle gezeigt werden, dass die Raman-Zell-Maps die reale

Verteilung der DNA/RNA-Strukturen deutlich darstellen (siehe Abbildung 1.6). Hohe Konzentrationen der Kernstrukturen sind in den Raman-Zell-Maps in rot und das Fehlen der Strukturen in blau angegeben. Die Form, Größe und Position der Kerne inmitten der abgebildeten Zelle zeigen in beiden Abbildungen identische Eigenschaften. Ein weiteres Beispiel zeigt auch das Vorkommen von DNA/RNA-Strukturen außerhalb des Zellkerns (siehe Abbildung 1 in [MBP2]), was ebenfalls in Form von Raman-Zell-Maps dargestellt wurde. Die Abbildung zeigt eine zusätzliche Kernstruktur (markiert mit dem roten Oval), die in beiden Bildern (HE und Raman) erkennbar ist. Ob es sich bei diesen Strukturen um extranukleare RNA-Strukturen (m-RNA, t-RNA und r-RNA) beispielsweise am rauhen Endoplasmatischen Retikulum handelt, ist unklar. Jedoch deutet das signifikante Raman-Signal des Phosphatrückgrates der RNA bei 811 cm^{-1} [185] in den Raman-Spektren des Zytoplasmas im Vergleich zum Raman-Kern-Spektrum (siehe Abbildung S1 in [MBP2] *Electronic Supplementary Material*) auf das Vorhandensein extranuklearer RNA-Moleküle hin.

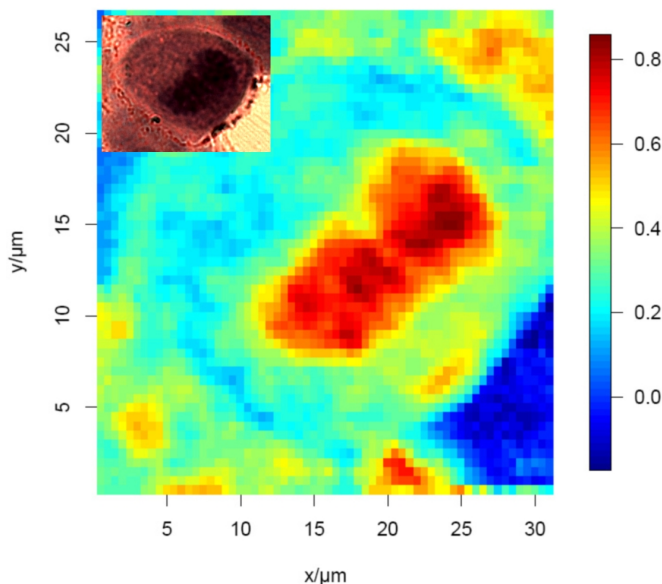


Abb. 1.6: Vergleichende Darstellung der HE-Färbung (links oben) und des Raman-Zell-Map einer unbehandelten MCF-7 Zelle .

Analyse resultierende Bilder und die entsprechenden HE-Bilder der behandelten MCF-7-Zellen für die Untersuchungen erstellt (siehe Abbildung 2 in [MBP2]). Dadurch konnte gezeigt werden, dass unbehandelte Zellen einen kompakten Zellkern aufweisen. Wohingegen nach der Behandlung mit einer DCT-Konzentration von 10 und 100 nmol/l für 48 Stunden Zellkernfragmentierungen in nahezu allen Zellen aufgetreten sind. Mit beiden chemometrischen Methoden, dem ANN und der *k-means*-Klusteranalyse, wurden dieselben Resultate generiert, welche durch zusätzliche HE-Bilder bestätigt werden konnten (siehe Abbildung 2 in [MBP2]). Dass DCT nur während der Mitose zu wirken scheint, lässt sich durch das Auftreten von homogenen Zellkernen in behandelten MCF-7 Zellen zeigen. Hierzu ist eine Zelle dargestellt (siehe Bild *Cell 2* in Abbildung S2 in [MBP2] *Electronic Supplementary Material*), welche nach einer Inkubationszeit von 24+24 h mit einer DCT-Konzentration von 100 nmol/l keine fragmentierten Zellkernstrukturen aufzeigt. Da vor den Zytostatikumbehandlungen keine Synchronisierung der Krebszellen stattgefunden hat, d. h. die Zellen wurden

Um die Effekte der DCT-Behandlung morphologisch zu beschreiben, wurden mit Hilfe der Raman-Zell-Maps unbehandelte Zellen mit behandelten Zellen verglichen. Da das Zytostatikum DCT Störungen der Mikrotubuli-Depolymerisierung während der Mitose verursacht, werden entsprechende Änderungen in den Kernstrukturen erwartet. Dementsprechend lag der Fokus in den Raman-Maps der behandelten Zellen auf der Verteilung der DNA und RNA-Informationen. Zur Verdeutlichung der DCT-Einflüsse wurden Raman-Zell-Maps mit DNA/RNA-Informationen sowie aus einer *k-means*-Kluster-

nicht in ein bestimmtes Stadium des Zellzyklus gezwungen, können auch Zellen auftreten, die sich während der Behandlung nicht in Mitose befunden haben und daher das Zytostatikum DCT nicht an die Mikrotubuli des Spindelapparates binden konnte.

Darüber hinaus wurde die Identifizierung der kernspezifischen Raman-Spektren verwendet, um in den folgenden Untersuchungen quantitative Analysen zur Zellantwort auf die Zytostatikumbehandlung *cell-drug response* zu realisieren. Untersuchungen zur *cell-drug response* sind besonders wichtig, um die Effizienz des Zytostatikums zu kennen. Mit detaillierterem Wissen über die Effizienz der Zytostatika und der Möglichkeit, den Prozess der Wirkung *online* zu überwachen, würden personalisierte Chemotherapien in naher Zukunft realisierbar werden. Dementsprechend wurden mit Hilfe der Raman-Kern-Spektren der MCF-7-Zellen quantitative Analysen zur *cell-drug response* durchgeführt. Zuvor wurde geprüft, ob eine Unterscheidung der Raman-Kern-Spektren von behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen möglich ist. Damit soll gezeigt werden, dass die Einwirkung des Zytostatikum DCT in den Raman-Spektren der Zellen feststellbar ist. Für dieses Klassifizierungsexperiment wurde eine lineare Diskriminanzanalyse (LDA) genutzt. Hierbei konnten 10.176 von 10.253 Raman-Kern-Spektren von behandelten MCF-7-Zellen (48 h mit DCT-Konzentration von 10 und 100 nmol/l) und 8.294 von insgesamt 8.356 Raman-Kern-Spektren unbehandelter Zellen korrekt klassifiziert werden (siehe Tabelle 2 in [MBP2]). Das Klassifizierungsmodell wurde mittels *leave-one-out*-Kreuzvalidierung (LOO-CV) bewertet und erzielte eine Klassifizierungsgenauigkeit von 99,2 %. Mit diesen Resultaten wurde erneut gezeigt, wie hervorragend die Raman-Spektroskopie in Kombination mit statistischen Methoden für Klassifizierungsexperimente an eukaryotischen Zellen geeignet ist.

Um Informationen über die molekularen Hintergründe der Klassifizierung von mit DCT behandelten und unbehandelten Zellen zu erfahren, bietet das LDA-Modell zur Trennung zweier Klassen einen zu den Mittelwertspektren der Klassen korrespondierenden *LD-scaling vector* an (Abbildung 3 in [MBP2]). Dieser *LD-scaling vector* verdeutlicht die für die Klassifizierung relevanten spektralen Unterschiede. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Intensität der Raman-Bande bei 785 cm^{-1} (DNA/RNA-Schwingung) [185, 186] im Mittelwertspektrum der mit DCT behandelten Zellen im Kontrast zu dem Mittelwertspektrum der unbehandelten Zellen vorliegt. Die Zellkernfragmentierung und die damit verbundene gestiegene Chromosomen-Kondensation verursacht in den Zellen eine lokale Erhöhung der DNA-Konzentration und würde den Anstieg der Intensität der DNA/RNA-spezifischen Raman-Bande erklären. Eine weitere Änderung in den Mittelwertspektren betrifft die Erniedrigung der Amid-I-Schwingung bei 1658 cm^{-1} [185, 186] in behandelten Zellen im Vergleich zu den Raman-Spektren unbehandelter Zellen. Die spektrale Änderung hat scheinbar ihre Ursache in der gesunkenen Proteinbiosynthese, wofür die Zellkernfragmentierung ursächlich ist. Mit der sinkenden Proteinproduktion verringert sich der Proteingehalt in den behandelten Zellen und schließlich auch das entsprechende Raman-Signal.

Die Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen *cell-drug response* beschränkten sich ausschließlich auf die Raman-Kern-Spektren der behandelten Zellen der zweiten Testserie. Mit Hilfe eines LDA-Modells wurden die spektralen Unterschiede der fünf verschiedenen DCT-Konzentrationen berechnet. Hierbei wurde das Modell mit Raman-Kern-Spektren der Zellen, welche mit DCT-Konzentrationen von 2,5 und 100 nmol/l für 48 h behandelt wurden, trainiert (*training-set*) und ein entsprechender *LD-scaling vector* konnte berechnet werden. Im *test-set* wurden die kernspezifischen Raman-Daten der Zellen, welche mit DCT-Konzentrationen von 5 nmol/l, 7,5 nmol/l und 10 nmol/l

für 48 h kultiviert wurden, auf den errechneten *LD-scaling vector* projiziert indem das Skalarprodukt (LD-Wert) gebildet wird. Die konzentrationsabhängige Klassenzugehörigkeit der einzelnen Raman-Kern-Spektren wird als Histogramm dargestellt (siehe Abbildung 4 (A) in [MBP2]). Im Detail werden die Verteilung und die Häufigkeit der Diskriminanzwerte (LD-Werte) der einzelnen Raman-Kern-Spektren als Skalarprodukt aus dem jeweiligem Spektrum und dem *LD-scaling vector* aufgezeigt. Insgesamt verdeutlicht das LDA-Modell, dass die stärkste Zellantwort nach der Behandlung mit DCT-Konzentrationen zwischen 7,5 und 10 nmol/l liegt. Daraus schließt sich, dass DCT in den MCF-7-Zellen ab einer Konzentration von 7,5 nmol/l den nahezu größten Effekt am Spindelapparat induziert. Entsprechend sind also nach der Behandlung mit Konzentrationen des Zytostatikum DCT zwischen 7,5-10 nmol/l keine signifikanten spektralen Änderungen in den Raman-Spektren mehr detektierbar. In Abbildung 1.7 wurden die LD-Werte (Diskriminanzwert) aller Raman-Spektren gegen die logarithmierten Werte der DCT-Konzentration aufgetragen. Der LD-Wert wurde hier als Zellantwort auf die DCT-Behandlung interpretiert. Die dargestellten Punkte entsprechen den Maxima der Skalarprodukte der jeweiligen DCT-Konzentration aus dem Histogramm der Abbildung 4 (A) in [MBP2]. Die Kurve beschreibt einen sigmoidalen Verlauf, der mit den Ergebnissen anderer Studien [187, 188] über die Dosis-Wirkungsbeziehung übereinstimmt. Damit konnte aufgezeigt werden, dass schon geringe DCT-Konzentrationen von nur 7,5 nmol/l enorme Einwirkungen auf die Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 haben.

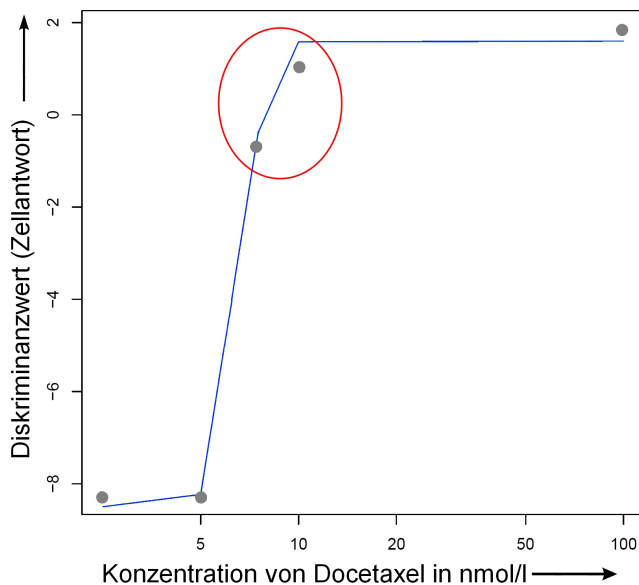


Abb. 1.7: Die Dosis-Wirkungsbeziehung wird hier als Funktion der logarithmischen DCT-Konzentration dargestellt. Dabei wird der lineare Diskriminanzwert als Zellantwort auf die DCT-Behandlung interpretiert und eine sigmoidaler Verlauf wird erkennbar.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass analog zur HE-Färbung - dem Goldstandard - in der Pathologie mittels Raman-Mikrospektroskopie und der Chemometrie Raman-Zell-Maps erstellt werden konnten, die den gleichen Informationsgehalt bezüglich der Kern- und Zytoplasmastruktur haben. Darüber hinaus enthalten die Raman-Spektren chemische und molekularbiologische Informationen über die gesamten zellulären Bestandteile. Hierdurch war es möglich, eine Trennung der Raman-Daten von mit dem Zytostatikum DCT behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen zu erzielen und Aussagen über die Effektivität bzw. die *cell-drug response*, die von der DCT-Konzentration abhängig ist, zu realisieren.

Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass sich die Raman-Mikrospektroskopie für die Erforschung zytostatikainduzierter Änderungen in Zellen eignet und zusätzlich dazu Auskunft über die Effektivität einzelner Behandlungen geben kann.

Da die Raman-Spektroskopie eine markerfreie und sensitive Methode ist, besteht die Möglichkeit, Untersuchungen dynamischer zellulärer Ereignisse auch *in vivo* durchzuführen. Hierbei würde die Funktionalität der Zelle während der Raman-Messungen unberührt bleiben und enormes Wissen über die biochemischen Prozesse in den Zellen gesammelt werden können. Dadurch wäre ein signifikanter Schritt in Richtung personalisierte Therapien getan und die Raman-Spektroskopie würde zusätzlich als Therapieüberwachendes Werkzeug fungieren können.

1.4.5 Schlussfolgerung und Aussichten

Zusammenfassend lässt sich mit den erzielten Ergebnissen aufzeigen, dass die Raman-Mikrospektroskopie in der Krebsdiagnose und für die Erforschung chemotherapeutischer Aspekte eine geeignete Technik darstellt.

Anhand der kernspezifischen Raman-Spektren konnte die Differenzierung und Identifizierung benigner (MCF-10A) und maligner (MCF-7) Zellen realisiert werden. Zusätzlich stehen dem Pathologen Raman-Zell-Maps einzelner Zellen, welche die Kerntopographie aufzeigen und die Untersuchung morphologischer Änderungen des Zellkerns ermöglichen, zur Verfügung. Der informatorische Gehalt der Raman-Zell-Maps korreliert mit den Resultaten der HE-Färbungen. Damit ließ sich zeigen, dass die Raman-Mikrospektroskopie topographische und zusätzlich biochemische Informationen für die Realisierung objektiverer Krebsdiagnosen bereitstellen kann.

Die Beurteilung diagnostischer Aspekte zur Charakterisierung einzelner Krebszellen aus Feinnadelaspiraten ohne die Verwendung von zeitaufwendigen Färbemethoden und zusätzlichen Biopsien konnte durch die statistische Auswertung der Raman-Daten sechs verschiedener Brustkrebszelllinien realisiert werden. In diesem Zusammenhang wurden einzelne Raman-Zell-Spektren den entsprechenden Zelllinien mit einer Genauigkeit von nahezu 100% zugeordnet. Das Klassifizierungsmodell zur Trennung der Raman-Spektren nach dem Ursprung der Zelllinien (Pleuraerguss und solider Tumor) klassifiziert mit einer Genauigkeit von über 94 % die Raman-Zell-Spektren richtig. Eine erfolgreiche Trennung der Raman-Daten nach den entsprechenden Brustkrebs-Subtypen, welche ihren Ursprung in den Genexpressionsprofilen haben, verdeutlicht abermals das große Potenzial dieser Methode zur Anwendbarkeit in der klinischen Diagnose. Schließlich konnte gezeigt werden, dass objektivere Diagnoseerstellung an nur wenigen Zellen, wie sie dem Pathologen in einer FNAB zur Verfügung stehen, realisierbar sind. Damit werden zusätzliche zytologische und histologische Auswertungen, die mit hohen Kosten und Traumata für den Patienten verbunden sind, unnötig.

Die Einwirkung des Zytostatikums Docetaxel wurde unter Verwendung generierter Raman-Daten untersucht. In diesem Zusammenhang wurden kernspezifische Informationen (Raman-Zellkern-Spektren) genutzt, um die Zellkernstrukturen zu visualisieren (Raman-Zell-Maps) und die morphologischen Auswirkungen des Medikaments in einzelnen Zellen zu untersuchen. Unter Verwendung der identifizierten Raman-Kern-Spektren wurden Klassifizierungsexperimente, zur Trennung von unbehandelten und mit dem Zytostatikum DCT behandelten Zellen, durchgeführt. Dieses statistische Modell erzielte eine Klassifizierungsgenauigkeit von über 99 %. Darüber hinaus konnten die chemischen Informationen der Raman-Spektren zur Erstellung aufschlussreicher Aussagen über die Effektivität bzw. die *cell-drug response* verwendet werden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass schon geringe Konzentrationen des Zytostatikums Docetaxel einen Effekt in den Krebszellen hervorrufen können. Damit wird deutlich, dass sich die Raman-Mikrospektroskopie zur Untersuchung und Überwachung von zytostatikainduzierten Änderungen in Brustkrebszellen eignet und außerdem Aussagen über die Effektivität einzelner Behandlungen geben kann, um schließlich personalisierte und effektivere Therapien erstellen zu können.

Für zukünftige Studien, die sich auf Klassifizierungs- und Identifizierungsexperimente beziehen, sollte die Erstellung einer umfangreichen Datenbank im Fokus stehen. Die Datenbank sollte Raman-Messungen verschiedener Brustkrebszelllinien sowie Patientenproben enthalten. Damit wären Informationen zur biochemischen Diversität bezüglich des Alters der Patienten, des Geschlechtes, der ethnischen Abstammung, der

Krankheitsgeschichte, des Genexpressionsprofils (Brustkrebssubtypen), der Diagnose und der Therapie enthalten. Infolgedessen wäre eine Optimierung des statistischen Modells erreichbar, wodurch Identifizierungsexperimente an unbekanntem Patientenproben realisierbar werden. Die exakte Identifizierung realer Proben auf der Einzelzellebene unter Verwendung der Raman-Mikrospektroskopie würde den Pathologen während der klinischen Diagnose verdächtiger FNAs eine erhebliche Unterstützung bieten. Zusätzlich würde die Entwicklung einer optischen Faser als Raman-Sonde umsetzbar werden. Mit dieser Raman-Sonde würde die Raman-Spektroskopie als onkologisches Diagnosewerkzeug *in vivo* während einer Nadelbiopsie [189] Anwendung finden.

Auch der Verwendung Raman-spektroskopischer Methoden in der Medikamentenforschung sollte in umfangreichen Studien thematisiert werden, um den gesamten Pool an Zytostatika zu untersuchen. Hierfür bietet die Raman-Mikrospektroskopie die Möglichkeit, Medikamenteneinwirkungen an lebenden Zellen *in vitro* zu erforschen. Mit dem Raman-spektroskopisch erzielten Wissen über beispielsweise die konzentrationsabhängigen biochemischen Änderungen in behandelten Zellen (*cell-drug response*) lassen sich für viele andere Zytostatika zusätzliche Informationen über die Effektivität der Medikamente erzielen, wodurch in der Krebsbehandlung weitaus mehr Erfolge erreicht werden könnten.

Literaturverzeichnis

- [1] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. E. Darnell. *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2001.
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- [3] B. Vogelstein and K. W. Kinzler. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, 9:138–141, 1993.
- [4] G. Klein and E. Klein. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature*, 315:190–195, 1985.
- [5] P. Duesberg, R. Li, A. Fabarius, and R. Hehlmann. The chromosomal basis of cancer. *Cellular Oncology*, 27:293–318, 2005.
- [6] P. Duesberg, R. Li, A. Fabarius, and R. Hehlmann. Aneuploidy and cancer: From correlation to causation. *Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis.*, 13:16–44, 2006.
- [7] P. Duesberg and R. Li. Multistep carcinogenesis: A chain reaction of anpleuoidization. *Cell Cycle*, 2:202–210, 2003.
- [8] W. Jiang, J. Peng, Y. Zhang, W. C. S. Cho, and K. Jin. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:16636–16657, 2012.
- [9] H. Clevers. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17:313–319, 2011.
- [10] Th. Boveri. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumore*. Verlag von Gustav Fischer in Jena, 1914.
- [11] P. C. Nowell. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194:23–38, 1976.
- [12] C. S. Freeman, M. R. Martin, and C. L. Marks. An overview of tumor biology. *Cancer Investigation*, 8:71–90, 1990.
- [13] R. A. Weinberg. How cancer arises. *Scientific American*, 275:62–71, 1996.

- [14] M. W. Beckmann, D. Niederacher, H.-G. Schnürch, B. A. Gusterson, and H. G. Bender. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, 75:429–439, 1997.
- [15] J. C. Barrett and R. W. Wiseman. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: Relevance to carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 76:65–70, 1987.
- [16] J. C. Barrett. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 100:9–20, 1993.
- [17] J. A. Boyd and J.C. Barrett. Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 46:469–486, 1990.
- [18] D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [19] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144:646–674, 2011.
- [20] O. H. Warburg. On the origin of cancer cells. *Science*, 123:309–314, 1956.
- [21] O. H. Warburg. *Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden, angewandt auf Krebs, Photosynthese und Wirkungsweise der Röntgenstrahlen; Arbeiten aus den Jahren 1945-1961*. Stuttgart, G. Thieme, 1962.
- [22] M. A. Kiebish, X. Han, H. Cheng, J. H. Chuang, and T. N. Seyfried. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *The Journal of Lipid Research*, 49:2545–2556, 2008.
- [23] G. Löffler. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 5. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003.
- [24] E. Gilboa. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 48:382–385, 1999.
- [25] M. Wrann, S. Bodmer, R. de Martin, C. Siepl, R. Hofer-Warbinekl, K. Frei, E. Hoferl, and A. Fontana. T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor- β . *The EMBO Journal*, 6:1633–1636, 1987.
- [26] S. Bodmer, K. Strommer, K. Frei, N. Siepl, C. and de Tribolet, I. Heid, and A. Fontana. Immunosuppression and transforming growth factor- β in glioblastoma - preferential production of transforming growth factor- β 2. *The Journal of Immunology*, 15:3222–3229, 1989.
- [27] H. F. Dvorak, V. M. Weaver, T. D. Tlsty, and G. Bergers. Tumor microenvironment and progression. *Journal of Surgical Oncology*, 103:468–474, 2011.
- [28] I. Stasinopoulou, M.-F. Peneta, Z. Chena, S. Kakkada, K. Glundea, and Z. M. Bhujwalla. Exploiting the tumor microenvironment for theranostic imaging. *NMR in Biomedicine*, 24:636–647, 2011.

- [29] P. Dey. Epigenetic changes in tumor microenvironment. *Indian Journal of Cancer*, 48:507–512, 2011.
- [30] M. A. Swartz, N. Iida, E. W. Roberts, S. Sangaletti, M. H. Wong, F. E. Yull, L. M. Coussens, and Y. A. DeClerck. Tumor microenvironment complexity: Emerging roles in cancer therapy. *Cancer Research*, 72:2473–2480, 2012.
- [31] A. J. Guidi, G. Abu-Jawdeh, K. Tognazzi, H. F. Dvorak, and L. F. Brown. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer*, 78:454–460, 1998.
- [32] S. Ylä-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto, and J. Hartikainen. Vascular endothelial growth factors - biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology*, 49:1015–1026, 2007.
- [33] R. Baan, Y. Grosse, K. Straif, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, and V. Coglianò. A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations. *The Lancet Oncology*, 10(12):1143–1144, 2009.
- [34] *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part F: Chemical Agents and Related Occupations*, volume 100F. IARC, Lyon, France, 2012.
- [35] F. El Ghissassi, R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, and V. Coglianò. A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology*, 10(8):751–752, 2009. 1470-2045.
- [36] *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part D: Radiation*, volume 100D. IARC, Lyon, France, 2012.
- [37] V. Bouvard, R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. E. Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, and V. Coglianò. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology*, 10(4):321–322, 2009.
- [38] *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part B: Biological Agents*, volume 100B. IARC, Lyon, France, 2012.
- [39] K. R. Gillian, K. Pirie, V. Beral, J. Green, E. Spencer, and D. Bull. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the million women study: cohort study. *British Medical Journal*, 335:1134, 2007.
- [40] *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part A: Pharmaceuticals*, volume 100A. IARC, Lyon, France, 2012.

- [41] *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part C: arsenic, metals, fibres, and dusts*, volume 100C. IARC, Lyon, France, 2012.
- [42] *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part E: personal habits and indoor combustions*, volume 100E. IARC, Lyon, France, 2012.
- [43] J. Ferlay, D. M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher. Estimates of cancer incidence and mortality in europe in 2008. *European Journal of Cancer*, 46:765–781, 2010.
- [44] *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2012.
- [45] V. Speirs. Not just for women. *Nature*, 485:66, 2012.
- [46] B. Cutuli, C. C.-S. Le-Nir, D. Serin, Y. Kirova, Z. Gaci, C. Lemanski, B. De Lafontan, M. Zoubir, P. Maingoni, H. Mignotte, C. T. de Lara, J. Edeline, F. Penault-Llorcam, P. Romestaing, C. Delva, B. Cometp, and Y. Belkacemi. Male breast cancer. evolution of treatment and prognostic factors. analysis of 489 cases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 73:246–254, 2010.
- [47] D. Muir, R. Kanthan, and S. C. Kanthan. Male versus female breast cancers: A population-based comparative immunohistochemical analysis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127:36–41, 2003.
- [48] M. Bourhafour, R. Belbaraka, A. Souadka, H. M’rabti, F. Tijami, and H. Errihani. Male breast cancer: a report of 127 cases at a moroccan institution. *BMC Research Notes*, 4:219–223, 2011.
- [49] S. H. Giordano, D. S. Cohen, A. U. Buzdar, G. Perkins, and G. N. Hortobagyi. Breast carcinoma in men: A population-based study. *Cancer*, 101:51–57, 2004.
- [50] A. Jemal, T. Murray, A. Samuels, A. Ghafoor, E. Ward, and M. J. Thun. Cancer statistics, 2003. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 53:5–26, 2003.
- [51] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, and E. Ward. Cancer statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60:277–300, 2010.
- [52] M. Guray and A. A. Sahin. Benign breast diseases: Classification, diagnosis, and management. *The Oncologist*, 11:435–449, 2006.
- [53] H. J. Burstein, K. Polyak, J. S. Wong, S. C. Lester, and C. M. Kaelin. Ductal carcinoma in situ of the breast. *The New England Journal of Medicine*, 350:1430–41, 2004.
- [54] *WHO: International Histological Classification of Tumors. No. 2: Histological Typing of breast tumors. 2nd Edition Geneva*. 1981.
- [55] R. Kreienberg, U.-S. Albert, M. Follmann, I. Kopp, T. Kühn, A. Wöckel, and T. Ziemler. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., 2012.

- [56] A. Böcking. *Mit Zellen statt Skalpellen: Wie sich Krebs früh und ohne Operation erkennen lässt*. Lehmanns Fachbuchhandlung GmbH, 2006.
- [57] W. L. Donegan. History of breast cancer. In *Breast Cancer*. Ontario: BC Dekker, 2006.
- [58] C. Wittekind and A. Tannapfel. *Kompendium Internistische Onkologie - Standards in Diagnostik und Therapie*. 4. Auflage. Springer Verlag, 2006.
- [59] S. E. Singletary, C. Allred, P. Ashley, L. W. Bassett, D. Berry, K. I. Bland, P. I. Borgen, G. Clark, S. B. Edge, D. F. Hayes, L. L. Hughes, R. V. P. Hutter, M. Morrow, D. L. Page, A. Recht, R. L. Theriault, A. Thor, D. L. Weaver, H. S. Wieand, and F. L. Greene. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20:3628–3636, 2002.
- [60] S. E. Singletary and J. L. Connolly. Breast cancer staging: Working with the sixth edition of the AJCC cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 56:37–47, 2006.
- [61] H. J. G. Bloom and W. W. Richardson. Histological grading and prognosis in breast cancer: A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*, 11:359–377, 1957.
- [62] C. W. Elston and O. Ellis. Pathological prognostic factors in breast cancer. i. the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19:403–410, 1991.
- [63] A. Goldhirsch, J. H. Glick, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann, H.-J. Senn, and Members. Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of Oncology*, 16:1569–1583, 2005.
- [64] A. J. Maxwell, J. M. Pearson, and H. M. Bishop. Crude open biopsy rates for benign screen detected lesions no longer reflect breast screening quality - time to change the standard. *Journal of Medical Screening*, 9:83–85, 2002.
- [65] A. Kleine-Tebbe and A. Noske. Benign and preinvasive breast lesions. *Gynäkol Geburtsmed Gynäkol Endokrinol*, 5:58–64, 2009.
- [66] M. J. Silverstein, M. D. Lagios, P. H. Craig, J. R. Waisrnan, B. S. Lewinsky, W. J. Colburn, and D. N. Poller. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*, 77:2267–2274, 1996.
- [67] O. Gilleard, A. Goodman, M. Cooper, M. Davies, and J. Dunn. The significance of the Van Nuys prognostic index in the management of ductal carcinoma in situ. *World Journal of Surgical Oncology*, 6:61, 2008.
- [68] C. K. Osborne, M. G. Yochmowitz, W. A. Knight, and W. L. McGuire. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46:2884–2888, 1980.

- [69] A. A. Onitilo, J. M. Engel, R. T. Greenlee, and B. N. Mukesh. Breast cancer subtypes based on ER/PR and HER2 expression: Comparison of clinicopathologic features and survival. *Clinical Medicine & Research*, 7:4–13, 2009.
- [70] A. M. Gown. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology*, 21:S8–S15, 2008.
- [71] D. J. Slamon, W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, and M. F. Press. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244:707–712, 1989.
- [72] M. F. Press, L. Bernstein, P. A. Thomas, L. F. Meisner, J.-Y. Zhou, Y. Ma, G. Hung, R. A. Robinson, C. Harris, A. El-Naggar, D. J. Slamon, R. N. Phillips, J. S. Ross, S. R. Wolman, and K. J. Flom. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 15:2894–2904, 1997.
- [73] F. Penault-Llorca, M. Bilous, M. Dowsett, W. Hanna, R. Y. Osamura, J. Rüschhoff, and M. van de Vijver. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *American Journal of Clinical Pathology*, 132:539–548, 2009.
- [74] C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A.-L. Børresen-Dale, P. O. Brown, and D. Botstein. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747–752, 2000.
- [75] L. A. Carey, C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. U. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp, and R. C. Millikan. Race, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. *The Journal of the American Medical Association*, 295:2492–2502, 2006.
- [76] C. Sotiriou and L. Pusztai. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360:790–800, 2009.
- [77] A. Recht and M. J. Houlihan. Axillary lymph nodes and breast cancer: A review. *Cancer*, 76:1491–512, 1995.
- [78] H. A. Burris III, H. S. Rugo, S. J. Vukelja, C. L. Vogel, R. A. Borson, S. Limen-tani, E. Tan-Chiu, I. E. Krop, R. A. Michaelson, S. Girish, L. Amler, M. Zheng, Y.-W. Chu, B. Klencke, and J. A. O’Shaughnessy. Phase II study of the antibody drug conjugate Trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) –positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 29:398–405, 2011.
- [79] S. I. Hajdu. A note from history: 2000 years of chemotherapy of tumors. *Cancer*, 103(6):1097–1102, 2005.
- [80] S. I. Hajdu. A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 2. *Cancer*, 117:2811–2820, 2011.

- [81] F. S. Al-Joudi, I. Z. Alias, and A. R. Samsudin. The effects of chemotherapeutic drugs on viability, apoptosis, and survivin expression in MCF-7 cells. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 38(5):323–330, 2005.
- [82] M. Martin, T. Pienkowski, J. Mackey, M. Pawlicki, J.-P. Guastalla, C. Weaver, E. Tomiak, T. Al-Tweigeri, L. Chap, E. Juhos, R. Guevin, A. Howell, T. Fornander, J. Hainsworth, R. Coleman, J. Vinholes, M. Modiano, T. Pinter, S. C. Tang, B. Colwell, C. Prady, L. Provencher, D. Walde, A. Rodriguez-Lescure, J. Hugh, C. Loret, M. Rupin, S. Blitz, P. Jacobs, M. Murawsky, A. Riva, and C. Vogel. Adjuvant Docetaxel for node-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 352(22):2302–2313, 2005.
- [83] A. Montero, F. Fossella, G. Hortobagyi, and V. Valero. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncology*, 6:229–239, 2005.
- [84] P. Garcia, D. Btaguer, G. Carles, S. E. Khyari, Y. Barra, C. de Ines, I. Barasoain, and C. Briand. Comparative effects of Taxol and Taxotere on two different human carcinoma cell lines. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 34:335–343, 1994.
- [85] A. L. Blajeski, T. J. Kottke, and S. H. Kaufmann. A multistep model for Paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. *Experimental Cell Research*, 270:277–288, 2001.
- [86] M. L. Miller and I. Ojima. Chemistry and chemical biology of Taxane anticancer agents. *Chemical Record*, 1:195–211, 2001.
- [87] S. M. Radaideh and G. W. Sledge. Taxane vs. Taxane: is the duel at an end? A commentary on a phase-III trial of Doxorubicin and Docetaxel versus Doxorubicin and Paclitaxel in metastatic breast cancer: results of the ERASME 3 study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111:203–208, 2008.
- [88] M.-C. Bissery, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, and F. Lavelle. Experimental antitumor activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol analogue. *Cancer Research*, 51:4845–52, 1991.
- [89] D. L. Morse, H. Gray, C. M. Payne, and R. J. Gillies. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10:1495–1504, 2005.
- [90] H. Hernández-Vargas, J. Palacios, and G. Moreno-Bueno. Telling cells how to die. Docetaxel therapy in cancer cell lines. *Cell Cycle*, 6:780–783, 2007.
- [91] M. Creane, C. B. Seymour, S. Colucci, and C. Mothersill. Radiobiological effects of Docetaxel (Taxotere): a potential radiation sensitizer. *International Journal of Radiation Biology*, 75(6):731–737, 1999.
- [92] M. A. Jordan, K. Wendell, S. Gardiner, W. B. Derry, H. Copp, and L. Wilson. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of Paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*, 56:816–825, 1996.

- [93] C. Demarcq, R. T. Bunch, D. Creswell, and A. Eastman. The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in chinese hamster ovary cells. *Cell Growth and Differentiation*, 5:983–993, 1994.
- [94] H. Hernández-Vargas, J. Palacios, and G. Moreno-Bueno. Molecular profiling of Docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene*, 26:2902–2913, 2007.
- [95] M. Schmitt and J. Popp. Biomedizinische Diagnostik: Raman-Spektroskopie. *Chemie in unserer Zeit*, 45:14–23, 2011.
- [96] C. V. Raman and K. S. Krishnan. A new type of radiation. *Nature*, 121:501–502, 1928.
- [97] Peter W. Atkins and Julio de Paula. *Physikalische Chemie*. 4. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [98] M. Schmitt and J. Popp. Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37:20–28, 2006.
- [99] J. R. Baena and B. Lendl. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8:534–539, 2004.
- [100] R. Petry, M. Schmitt, and J. Popp. Raman spectroscopy - a prospective tool in the life sciences. *Chemical Physics and Physical Chemistry*, 4:14–30, 2003.
- [101] R. Buckmaster, F. Asphahani, M. Thein, J. Xub, and M. Zhang. Detection of drug-induced cellular changes using confocal Raman spectroscopy on patterned single-cell biosensors. *The Analyst*, 134:1440–1446, 2009.
- [102] A. Zoladek, F. C. Pascut, P. Patel, and I. Notingher. Non-invasive time-course imaging of apoptotic cells by confocal Raman micro-spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42:251–258, 2010.
- [103] M. Okada, N. I. Smith, A. F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, and K. Fujita. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:28–32, 2012.
- [104] T. G. Spiro and B. P. Gaber. Laser Raman scattering as a probe of protein structure. *Annual Review of Biochemistry*, 46:553–72, 1977.
- [105] C. Krafft, B. Dietzek, M. Schmitt, and J. Popp. Raman and coherent anti-stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical application. *Journal of Biomedical Optics*, 17:040801–1–040801–15, 2012.
- [106] C. Krafft, B. Dietzek, and J. Popp. Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues. *The Analyst*, 134:1046–1057, 2009.
- [107] W. H. Nelson, R. Manoharan, and J. F. Sperry. UV resonance raman studies of bacteria. *Applied Spectroscopy Reviews*, 27:67–124, 1992.
- [108] M. Baek, W. H. Nelson, D. Britt, and J. F. Sperry. UV-excited resonance Raman spectra of heat denatured lysozyme and Staphylococcus epidermidis. *Applied Spectroscopy*, 42:1312–1314, 1988.

- [109] X. Qian, X.-H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, and S. Nie. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology*, 26(1):83–90, 2008.
- [110] L. R. Allain and T. Vo-Dinh. Surface-enhanced Raman scattering detection of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 using a silver-coated microarray platform. *Analytica Chimica Acta*, 469:149–154, 2002.
- [111] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, and P. G. Etchegoin. Surface enhanced Raman scattering enhancement factors: A comprehensive study. *Journal of Physical Chemistry C*, 111:13794–13803, 2007.
- [112] S. Pahlow, A. März, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kämmer, R. Böhme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, and J. Popp. Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy. *Engineering in Life Sciences*, 12:131–143, 2012.
- [113] I. Freitag, U. Neugebauer, A. Csakia, W. Fritzsche, C. Krafft, and J. Popp. Preparation and characterization of multicore SERS labels by controlled aggregation of gold nanoparticles. *Vibrational Spectroscopy*, 60:79–84, 2012.
- [114] A. M. Fales, H. Yuan, and T. Vo-Dinh. Cell-penetrating peptide enhanced intracellular Raman imaging and photodynamic therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 10:2291–2298, 2013.
- [115] E. Bailo and V. Deckert. Tip-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 37:921–930, 2008.
- [116] R. Böhme, M. Mkandawire, U. Krause-Buchholz, P. Rösch, G. Rödel, J. Popp, and V. Deckert. Characterizing cytochrome c states – TERS studies of whole mitochondria. *Chemical Communications*, 47:11453–11455, 2011.
- [117] C. L. Evans and X. Sunney Xie. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: Chemical imaging for biology and medicine. *Annual review of analytical chemistry*, 1:883–909, 2008.
- [118] J. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie. Multiplex coherent anti-stokes Raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:8493–8498, 2002.
- [119] S. H. Parekh, Y. J. Lee, K. A. Aamer, and M. T. Cicerone. Label-free cellular imaging by broadband coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Biophysical Journal*, 99:2695–2704, 2010.
- [120] M. C. Chen, R. C. Lord, and R. Mendelsohn. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules: IV. thermal denaturation of aqueous lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure*, 328:252–260, 1973.
- [121] E. B. Hanlon, R. Manoharan, T.-W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 45:R1–R59, 2000.

- [122] D. C. B. Redd, Z. C. Feng, K. T. Yue, and T. S. Gansler. Raman spectroscopic characterization of human breast tissues: implications for breast cancer diagnosis. *Applied Spectroscopy*, 47:787–91, 1993.
- [123] C.J. Frank, D.C. Redd, T.S. Gansler, and R. L. McCreery. Characterization of human breast biopsy specimens with near-IR Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 66:319–26, 1994.
- [124] C. J. Frank, R. L. McCreery, and D. C. Redd. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Journal of Analytical Chemistry*, 67:777–83, 1995.
- [125] R. Manoharan, K. Shafer, L. Perelman, J. Wul, K. Chen, G. Deinuml, M. Fitzmaurice, J. Myles, J. Crowe, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging. *Photochemistry and Photobiology*, 67:15–22, 1998.
- [126] Y. Yazdi, N. Ramanujam, R. Lotan, M. F. Mitchell, W. Hittelman, and R. Richards-Kortum. Resonance Raman spectroscopy at 257 nm excitation of normal and malignant cultured breast and cervical cells. *Applied Spectroscopy*, 53:82–85, 1999.
- [127] C. Matthäus, S. Boydston-White, M. Miljkovic, M. Romeo, and M. Diem. Raman and infrared microspectral imaging of mitotic cells. *Applied Spectroscopy*, 60:1–8, 2006.
- [128] N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, E. Volokhina, G. Vrensen, J. Greve, and C. Otto. Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells. *Biophysical Journal*, 84:3968–3981, 2003.
- [129] F. Draux, P. Jeannesson, A. Beljebbar, A. Tfayli, N. Fourre, M. Manfait, J. Sulé-Susob, and G. D. Sockalingum. Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study. *The Analyst*, 134:542–548, 2009.
- [130] K. E. Shafer-Peltier, A. S. Haka, M. Fitzmaurice, J. Crowe, J. Myles, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: Implications for breast cancer diagnosis in vivo. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33:552–563, 2002.
- [131] A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:12371–12376, 2005.
- [132] K. K. Kumar, M. V. P. Chowdary, S. Mathew, L. Rao, C. M. Krishna, and J. Kurien. Raman spectroscopic diagnosis of breast cancers: evaluation of models. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39:1276–1282, 2008.
- [133] M. Diem, M. Romeo, S. Boydston-White, M. Miljković, and C. Matthäus. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004). *The Analyst*, 129:880–885, 2004.

- [134] M. V. P. Chowdary, K. K. Kumar, S. Mathew, L. Rao, C. M. Krishna, and J. Kurien. Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: A spectral deconvolution study. *Biopolymers*, 91:539–546, 2009.
- [135] M. V. P. Chowdary, K. K. Kumar, J. Kurien, S. Mathew, and C. M. Krishna. Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 83(5):556–569, 2006.
- [136] A. S. Haka, Z. Volynskaya, J. A. Gardecki, J. Nazemi, J. Lyons, D. Hicks, M. Fitzmaurice, R. R. Dasari, J. P. Crowe, and M. S. Feld. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Research*, 66:3317–3322, 2006.
- [137] C. Yu, E. Gestl, K. Eckert, D. Allara, and J. Irudayaraj. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detection and Prevention*, 30:515–522, 2006.
- [138] C. M. Krishna, G. D. Sockalingum, G. Kegelaer, S. Rubin, V. B. Kartha, and M. Manfait. Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. *Vibrational Spectroscopy*, 38:95–100, 2005.
- [139] A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. *Cancer Research*, 62:5375–5380, 2002.
- [140] N. Stone, R. Baker, K. Rogers, A. W. Parker, and P. Matousek. Subsurface probing of calcifications with spatially offset Raman spectroscopy (SORS): Future possibilities for the diagnosis of breast cancer. *The Analyst*, 132:899–905, 2007.
- [141] N. Stone and P. Matousek. Advanced transmission Raman spectroscopy: A promising tool for breast disease diagnosis. *Cancer Research*, 68:4424–4430, 2008.
- [142] A. Saha, I. Barman, N. C. Dingari, S. McGee, Z. Volynskaya, L. H. Galindo, W. Liu, D. Plecha, N. Klein, R. R. Dasari, and M. Fitzmaurice. Raman spectroscopy: a real-time tool for identifying microcalcifications during stereotactic breast core needle biopsies. *Biomedical Optics Express*, 2:2792–2803, 2011.
- [143] S. Rehman, Z. Movasaghi, A. T. Tucker, S. P. Joel, J. A. Darr, A. V. Ruban, and I. U. Rehman. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38:1345–1351, 2007.
- [144] C. Matthäus and M. Diem. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy. *Biophysical Journal*, 93:668–673, 2007.
- [145] C. Matthäus, T. Chernenko, L. Quintero, L. Milan, A. Kale, M. Amiji, V. Torchilin, and M. Diem. Raman microscopic imaging of cells and applications monitoring the uptake of drug delivery systems. *Proceedings of SPIE: Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care*, 6991:699106–1–699106–8, 2008.

- [146] Y. Harada, P. Dai, Y. Yamaoka, M. Ogawa, H. Tanaka, K. Nosaka, K. Akaji, and T. Takamatsu. Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, 132:39–46, 2009.
- [147] U. Neugebauer, T. Bocklitz, J. H. Clement, C. Krafft, and J. Popp. Towards detection and identification of circulating tumour cells using Raman spectroscopy. *Analyst*, 135:3178–3182, 2010.
- [148] J. Horsnell, P. Stonelake, J. Christie-Brown, G. Shetty, J. Hutchings, C. Kendall, and N. Stone. Raman spectroscopy—a new method for the intra-operative assessment of axillary lymph nodes. *The Analyst*, 135:3042–3047, 2010.
- [149] M. Sattlecker, C. Bessant, J. Smith, and N. Stone. Investigation of support vector machines and Raman spectroscopy for lymph node diagnostics. *The Analyst*, 135:895–901, 2010.
- [150] L. Hartsuiker, N. J. L. Zeijen, L. W. M. M. Terstappen, and C. Otto. A comparison of breast cancer tumor cells with varying expression of the HER2/neu receptor by Raman microspectroscopic imaging. *The Analyst*, 135:3220–3226, 2010.
- [151] M. Hedegaard, C. Krafft, H. J. Ditzel, L. E. Johansen, S. Hassing, and J. Popp. 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. *Journal of Analytical Chemistry*, 82:2797–2802, 2010.
- [152] M. M. Mariani, L. J. Maccoux, C. Matthäus, M. Diem, J. G. Hengstler, and V. Deckert. Micro-Raman detection of nuclear membrane lipid fluctuations in senescent epithelial breast cancer cells. *Analytical Chemistry*, 82:4259–4263, 2010.
- [153] Q. Matthews, A. Jirasek, J. J. Lum, and A. G. Brolo. Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 56:6839–6855, 2011.
- [154] C. Nieva, M. Marro, N. Santana-Codina, S. Rao, D. Petrov, and A. Sierra. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: Towards a stratification of malignancy. *PLOS One*, 7:e46456, 2012.
- [155] H. Salehi, L. Derely, A.-G. Vegh, J.-C. Durand, C. Gergely, C. Larroque, M.-A. Fauroux, and F. J. G. Cuisinier. Label-free detection of anticancer drug Paclitaxel in living cells by confocal Raman microscopy. *Applied Physics Letters*, 102:113701–1–113701–5, 2013.
- [156] H. G. Schulze, S. O. Konorov, J. M. Piret, M. W. Blades, and R. F. B. Turner. Label-free imaging of mammalian cell nucleoli by Raman microspectroscopy. *The Analyst*, 138:3416–3423, 2013.

- [157] S. Dochow, C. Beleites, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert, J. Clement, C. Krafft, and J. Popp. Quartz microfluidic chip for tumour cell identification by Raman spectroscopy in combination with optical traps. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405:2743–2746, 2013.
- [158] C. Krafft. Bioanalytical applications of raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378:60–62, 2004.
- [159] R. R. Anderson and J. A. Parrish. The optics of human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 77:13–19, 1981.
- [160] M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz, R. H. Webb, and R. R. Anderson. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: Melanin provides strong contrast. *The Journal of Investigative Dermatology*, 104:946–952, 1995.
- [161] M. Rajadhyaksha, S. González, R. R. Zavislan, J. M. and Anderson, and R. H. Webb. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: Advances in instrumentation and comparison with histology. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113:293–303, 1999.
- [162] P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, and J. Popp. Raman spectroscopic identification of single yeast cells. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36:377–379, 2005.
- [163] M. Rosa. Fine-needle aspiration biopsy: A historical overview. *Diagnostic Cytopathology*, 36:773–775, 2008.
- [164] P. D. Britton. Fine needle aspiration or core biopsy. *The Breast*, 8:1–4, 1999.
- [165] S. Nagar, A. Iacco, T. Riggs, W. Kestenberg, and R. Keidan. An analysis of fine needle aspiration versus core needle biopsy in clinically palpable breast lesions: a report on the predictive values and a cost comparison. *American Journal of Surgery*, 204:193–198, 2012.
- [166] J. G. Elmore, M. B. Barton, V. M. Mocerri, S. Polk, P. J. Arena, and S. W. Fletcher. Ten-year risk of false positive screening mammograms and clinical breast examinations. *The New England Journal of Medicine*, 338:1089–1096, 1998.
- [167] R. Ariga, K. Bloom, V. B. Reddy, L. Kluskens, D. Francescatti, K. Dowlat, P. Siziopikou, and P. Gattuso. Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation. *American Journal of Surgery*, 184:410–413, 2002.
- [168] E. Alkuwari and M. Auger. Accuracy of fine-needle aspiration cytology of axillary lymph nodes in breast cancer patients. *Cancer Pathology*, 114:89–93, 2008.
- [169] I. Mansoor and A. A. Jamal. Role of fine needle aspiration in diagnosing breast lesions. *Saudi Medical Journal*, 23:915–920, 2002.
- [170] H. D. Soule, T. M. Maloney, S. R. Wolman, Jr. Peterson, W. D., R. Brenz, C. M. McGrath, J. Russo, R. J. Pauley, R. F. Jones, and S. C. Brooks. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*, 50:6075–6086, 1990.

- [171] K. Rennstam, N. McMichael, P. Berglund, G. Honeth, C. Hegardt, L. Rydén, L. Luts, P.-O. Bendahl, and I. Hedenfalk. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122:315–324, 2010.
- [172] M. Lacroix and G. Leclercq. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83:249–289, 2004.
- [173] N. Prang, S. Preithner, K. Brischwein, P. Göster, A. Wöppel, J. Müller, C. Steiger, M. Peters, P. A. Baeuerle, and A. J. da Silva. Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 92:342–349, 2005.
- [174] R. J. Hambly, J. A. Double, M. J. Thompson, and M. C. Bibby. Establishment and characterisation of new cell lines from human breast tumours initially established as tumour xenografts in NMRI nude mice. *Breast Cancer Research and Treatment*, 43:247–258, 1997.
- [175] H. Naundorf, E. C. Rewasowa, I. Fichtner, B. Btittner, M. Becker, and M. Görlich. Characterization of two human mammary carcinomas, MT-1 and MT-3, suitable for in vivo testing of ether lipids and their derivatives. *Breast Cancer Research and Treatment*, 23:87–95, 1992.
- [176] J. Kao, K. Salari, M. Bocanegra, Y.-L. Choi, L. Girard, J. Gandhi, K. A. Kwei, T. Hernandez-Boussard, P. Wang, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. R. Pollack. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS ONE*, 4:e6146, 2009.
- [177] L. W. Engel and N. A. Young. Human breast carcinoma cells in continuous culture: A review. *Cancer Research*, 38:4327–4339, 1978.
- [178] E. Y. Lasfargues and L. Ozello. Cultivation of human breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 21:1131–1147, 1958.
- [179] R. M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.-P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W.-L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, and J. W. Gray. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10:515–527, 2006.
- [180] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51:1409–1416, 1973.
- [181] K. B. Horwitz, M. E. Costlow, and W. L. McGuire. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, 26:785–95, 1975.
- [182] I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitcik, and H. J. Brenner. Establishment and characterization of cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer*, 15:659–670, 1979.

- [183] M. Tanner, A. I. Kapanen, T. Junttila, O. Raheem, S. Grenman, J. Elo, K. Elenius, and J. Isola. Characterization of a novel cell line established from a patient with herceptin-resistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3:1585–1592, 2004.
- [184] B. B. Spear, M. Heath-Chiozzi, and J. Huff. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends in Molecular Medicine*, 7:201–204, 2001.
- [185] I. Notingher and L. L. Hench. Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro. *Expert Review of Medical Devices*, 3:215–234, 2006.
- [186] C. Krafft, T. Knetschke, A. Siegner, R. H. W. Funk, and R. Salzer. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 32:75–83, 2003.
- [187] D. I. Jodrell, M. J. Egorin, R. M. Canetta, P. Langenberg, E. P. Goldbloom, J. N. Burroughs, J. L. Goodlow, S. Tan, and E. Wiltshaw. Relationships between carboplatin exposure and tumor response and toxicity in patients with ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 10:520–528, 1992.
- [188] A. Jakobsen and L. S. Mortensen. On the importance of sensitivity to the dose-effect relationship in chemotherapy. *Acta Oncologica*, 36:375–381, 1997.
- [189] R. K. Dukor. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, UK, 2002.

Kapitel 2

Veröffentlichungen

Im Folgenden sind die Nachdrucke der im Rahmen der Dissertation erschienenen Publikationen aufgeführt. Die Autorschaft der Publikationen und Urheberrechte sind jeweils auf dem Deckblatt angegeben.

Eigenanteile der Autoren

- [MBP1] Thomas Bocklitz, Melanie Putsche, Carsten Stüber, Josef Käs, Axel Niendorf, Petra Rösch, Jürgen Popp, **A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis**, *Journal of Raman Spectroscopy* 2009, 40, 1759-1765.

Thomas Bocklitz	Auswertung der Datensätze, Manuskripterstellung
Melanie Putsche	Raman-Messungen, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Carsten Stüber	Anziehen und Preparation der Zellen
Josef Käs	Projektpartner
Axel Niendorf	Projektpartner, Konzept- und Ergebnisdiskussion
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Jürgen Popp	Projektleitung, Konzept- und Ergebnisdiskussion, Korrektur des Manuskript

- [MBP2] Katharina Hartmann*, Melanie Becker-Putsche*, Thomas Bocklitz, Katharina Pachmann, Axel Niendorf, Petra Rösch, Jürgen Popp, **A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 403, 745-753.

Katharina Hartmann*	Präparation der Zellen, Raman-Messungen, Auswertung und Manuskripterstellung
Melanie Becker-Putsche*	Raman-Messungen, Auswertung, Ergebnisdiskussion und Manuskripterstellung
Thomas Bocklitz	Auswertung der Datensätze, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Katharina Pachmann	Anziehen der Zellen
Axel Niendorf	Projektpartner, Konzept- und Ergebnisdiskussion
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Jürgen Popp	Projektleitung, Konzept- und Ergebnisdiskussion, Korrektur des Manuskript

* Koautoren

[MBP3] Melanie Becker-Putsche, Thomas Bocklitz, Joachim Clement, Petra Rösch, Jürgen Popp, **Toward improving fine needle aspiration cytology applying Raman microspectroscopy**, *Journal of Biomedical Optics* 2013, 18, 047001-1 - 047001-7.

Melanie Becker-Putsche	Raman-Messungen, Auswertung und Interpretation, Manuskripterstellung
Thomas Bocklitz	Auswertung der Datensätze, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Joachim Clement	Anziehen und Preparation der Zellen
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Jürgen Popp	Projektleitung, Konzept- und Ergebnisdiskussion, Korrektur des Manuskript

Hiermit bescheinige ich die Richtigkeit der Angaben über die Eigenanteile.

Unterschrift

2.1 A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis. [MBP1]

T. Bocklitz, M. Putsche, C. Stüber, J. Käs, A. Niendorf, P. Rösch, J. Popp

Journal of Raman Spectroscopy 2009, 40, 1759-1765.

Autorenschaft der Publikation

Thomas Bocklitz	Auswertung der Datensätze, Manuskripterstellung
Melanie Putsche	Raman-Messungen, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Carsten Stüber	Anziehen und Preparation der Zellen
Josef Käs	Projektpartner
Axel Niendorf	Projektpartner, Konzept- und Ergebnisdiskussion
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Jürgen Popp	Projektleitung, Konzept- und Ergebnisdiskussion, Korrektur des Manuskript

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von *John Wiley and Sons, Inc.*. Reprinted with kind permission from *John Wiley and Sons, Inc.*.

A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis

Thomas Bocklitz,^a Melanie Putsche,^a Carsten Stüber,^b Josef Käs,^b
Axel Niendorf,^c Petra Rösch^a and Jürgen Popp^{a,d*}

In this model study, we developed a method to distinguish between breast cancer cells and normal epithelial cells, which is in principal suitable for online diagnosis by Raman spectroscopy. Two cell lines were chosen as model systems for cancer and normal tissue. Both cell lines consist of epithelial cells, but the cells of the MCF-7 series are carcinogenic, where the MCF-10A cells are normal growing. An algorithm is presented for distinguishing cells of the MCF-7 and MCF-10A cell lines, which has an accuracy rate of above 99%. For this purpose, two classification steps are utilized. The first step, the so-called top-level classifier searches for Raman spectra, which are measured in the nuclei region. In the second step, a wide range of discriminant models are possible and these models are compared. The classification rates are always estimated using a cross-validation and a holdout-validation procedure to ensure the ability of the routine diagnosis to work in clinical environments. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: breast cancer; chemometric analysis; pattern recognition; Raman spectroscopy

Introduction

Cancer aggregates in dynamic changes in the genome. Mutations that produce oncogenes with an increase of function and tumor suppressor genes with a decrease of function are the bases of this disease. Tumorigenesis in human is a multistep process. These steps display genetic modifications that induce the transformation of normal human cells into malignant derivatives. Cancer cells are characterized by the defects of regulatory circuits, which control normal cell proliferation and homeostasis. Hanahan *et al.*^[1] describe six alterations in the cell physiology that regulate malignant growth. Cancer cells are distinguished by the insensitivity to antigrowth signals and the self-sufficiency of growth signals, they evade the programmed cell death, have an unlimited replicative potential, gain angiogenesis, invade the tissue and generate metastases.

More than 100 various cancer types can be found within specific organs.^[1] This paper addressed breast cancer which is one of the most malignant tumors and the main cause of cancer-dependent death in women. The largest gland in the skin consists of lactiferous ducts (*Ductus lactifer*) and mammary glands (*Lobulus glandulae mammariae*) which are covered by fat cells and connective tissue. Mutations in epithelial cells lining structures of the lobules and ducts are responsible for malignant modifications.

For the diagnosis of breast cancer, e.g. mammography, breast biopsy and surgical sampling can be utilized. These techniques are important for early detection of tissue material by the experienced pathologist. Mammography is used to illustrate the internal structure of the breast. Architectural distortions, asymmetry and calcifications were utilized as signs of malignancy. However, mammography can only find 20% of all carcinomas in breast.^[2] Other techniques such as digital mammography, magnetic resonance imaging, T-Scan 2000 and ultrasound to find lesions were also practiced.^[2] If a lesion is found, the pathologist needs a biopsy either by fine needle aspiration or by surgical removal of a fragment of the tissue. The stained histological

examination is classified by the experienced pathologist. The morphological features of the nucleus and the cells within the total tissue were described by the pathologist. On the basis of this structure, they classify the lesion. It is a complex task creating an accurate diagnosis if there are only a few cells like in some single-cell biopsies. For precise analysis, an image-guided needle biopsy including a fiber-optical Raman-probe is necessary. Further advantages are minimal tissue damage, reduced waiting time for diagnosis and no redundant surgical extractions of breast tissue.^[2]

Because Raman spectroscopy monitors the chemical composition of a sample, it can be used to investigate the chemical changes introduced by a disease. The white blood cells in the cerebrospinal fluid (CSF) were investigated for the diagnosis of diseases in the central nervous system (e.g. for the identification of bacterial meningitis).^[3,4] Another study addressed the behavior of proteins in the plasma of thrombotic microangiopathy patients.^[5] UV-resonance Raman spectroscopy (UVR) and hierarchical cluster analysis were used to differentiate patients from healthy control persons.

Although micro-Raman spectroscopy combines the advantages of a confocal microscope and Raman spectroscopy, it is possible to

* Correspondence to: Jürgen Popp, Institute of Physical Chemistry, University of Jena, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Germany.
E-mail: juergen.popp@uni-jena.de

a Institute of Physical Chemistry, University of Jena, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Germany

b Institute of Soft Matter Physics, University of Leipzig, Linnéstrasse 5, D-04103 Leipzig, Germany

c Clinical Center of University Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany

d Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Strasse 9, D-07745 Jena, Germany

map the spatial distribution of a substance with a spatial resolution of $< 1 \mu\text{m}$. Raman maps of yeast cells were recorded, and means of compartments were used to differentiate various strains.^[6,7] The mapping approach is essential for eukaryotic cells because the cells owing molecular compartmentalization. Although bacteria are more homogenous, it is possible to build up a database in order to classify single bacterial cells. This approach is described in Refs. [8 and 9]

The advantages of the confocal micro-Raman setup are also used in cancer research since the early 1990s. A number of studies dealing with the Raman spectroscopic characterization of different types of cancer, e.g. colon cancer,^[10] skin tumors,^[11] oral cancer^[12] and breast cancer,^[13,14] have been carried out. All of these studies are promising for Raman spectroscopy as a useful tool for cancer diagnosis.

Due to the fact that Raman spectra are superpositions of the molecular information from all components within the laser focus statistical approaches are necessary in order to get a deeper understanding of the chemical composition of the sample. A statistical technique to model the differences between two groups is supervised classification models. The difficult task with these models is to ensure that they are classifying malignant against healthy cells. To highlight the differences between cancerous and healthy cell lines rather than individual cells, Raman spectroscopy is utilized in combination with chemometric analysis. In this first model study, the differences between two epithelial cell lines MCF-7 and MCF-10A are investigated. These both cell lines were selected as a simple model system for cancer detection on single-cell level. If it is possible to distinguish MCF-7 and MCF-10A cells with only a few cells, a diagnosis method based on Raman spectroscopy can be established. It is known that major differences between cancerous cells like MCF-7 and benign cells (MCF-10A) arise from variations in the nuclei. The nucleus of MCF-7 cells is enlarged and exhibits a vesicular structure, whereas the nucleus of MCF-10A cells is not. Cancerous cells and normal growing cells also differ in the DNA to cytoplasm ratio which is an effect of the former. This property is used for increasing the classification/identification rate.

The present study takes the fact into consideration that under clinical environment the identification property of a model is important but not the classification property. This fact results from the individuality of eukaryotic cells which is only treatable with statistical analysis. Therefore, the identification property of the classification model is evaluated with a huge part of data that are not used for building the model but only for testing purposes.^[15] This ensures that the classification rate is calculated for the separation of MCF-7 and MCF-10A cells rather than individual cells.

Materials and Methods

Cell cultivation

The MCF-7 and MCF-10A cells were cultivated with a standard protocol in Petri dishes. The breast cancer cell lines MCF-7 and MCF-10A were grown at 37°C with a constant humidified atmosphere of 5% CO_2 in air. MCF-7 cells were cultured in DMEM/F12 with 15 mM HEPES buffer and supplemented with 5% horse serum, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml cholera toxin and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone. MCF-10A cells were cultivated in Minimal Essential Medium Eagle supplemented with L-glutamine 100 mg/ml sodium pyruvate, bovine insulin stock solution, nonessential amino acids (NEAA), fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin.

Cell preparation

After the expanding time, the cells were resolved from the Petri dish surface by the enzyme trypsin. This enzyme is protein-disruptive and disconnects the adherence of the cultivated cells from the surface of the Petri dishes. Then the cells are mounted on cover slips. This is achieved by dropping the cells in solution on the cover slip surface. Is a defined cell concentration obtained, the cells were washed and fixated. By the use of a mounting medium, the cover slips were bonded on the surface of fused silica slides. After the mounting medium dried, the cover slips were removed from the quartz slides.

Reference substances

The reference products, namely, collagen typ I from rat tail and female DNA were stored at $4\text{--}8^\circ\text{C}$. Histon H1 from calf thymus and lipoprotein from human plasma were stored at -20°C . All reference substances were purchased from common supplier. Before measuring, the liquid reference substances were mounted on a quartz-slide and dried.

Raman spectroscopy

The Raman spectra are measured at a commercial confocal Raman microscope CRM 300 (WITec, Germany). The radiation of a 785 nm diode laser was focused with an $50\times/\text{NA } 0.95$ objective (Zeiss, Germany) on the sample. The back scattered light was spectral separated with a 600 lines/mm grating and detected with an electron-multiplying charge-coupled device (EM-CCD) camera with 1024×128 pixel. In order to suppress noise, the CCD was cooled down to -75°C . The cell measurements were done in 'scan' mode, where a given number of line scans with a given number of points are performed. The number of lines and points was chosen that a step size of $0.5 \mu\text{m}$ was achieved. The acquisition time for one spectra was 10 s, and the laser power on the sample was about 50 mW. The cells were mounted on fused silica slides, because the fused silica signal is negligible in the region of interest $600\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$. The reference products were mounted on fused silica slides in order to compare both measurements. Here, the integration time was 10 s with 120 acquisitions.

Computation

Calculations were performed on a commercial available PC system (Intel(R) Core(TM) 2 Duo CPU, E6750 at 2.66 GHz, 1.97 GB RAM). The computations were done in R ,^[16] a statistical language similar to Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA).

Data pretreatment

No quality test^[17] was carried out, and all spectra independent of their signal-to-noise ratio (SNR) were used. This was done because this pilot study was carried out to prove the ability of Raman spectroscopy as a clinical tool for cancer diagnosis. Therefore, the analysis should work with all measurements. As a first preprocessing step, cosmic noise is removed with an in-house written procedure based on the upper bound algorithm.^[18,19] Thereafter, the spectra were calibrated with a commonly used wavenumber standard *4-acetamidophenol*, and the wavenumber region is truncated to $600\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$. This was done because the signal from the quartz slides is negligible in that region. Then the correction for the fluorescence background was done with a

fifth-order polynomial,^[20] and the spectra were vector normalized. In literatures,^[17,21] the dimension reduction is done by selecting different wavenumber regions. Instead of this highly subjective method, a principal component analysis (PCA) was performed, and the first 60 principal components were retained to reduce the dimension of the data matrix without losing much information. The cumulative variance for the 60th component was 97.80%. Another positive effect of this procedure is the suppressing of white noise in the Raman spectra.

Data analysis by artificial neural network (ANN), support vector machine (SVM) and linear discriminant analysis (LDA)

The packages utilized in R are *nnet* and *e1071*.^[22,23] The supervised methods used for the classification problem are the commonly used methods in chemometric analysis and they are described elsewhere.^[3,24–27] Briefly, LDA searches for a linear combination of the wavenumber to describe the classes. A new spectra are projected on the linear discriminant scaling vector, and the sign of the result is equivalent to the class assignment

$$\text{class}(\vec{x}) = \text{sgn}(\vec{x} \cdot \vec{L}) \quad (1)$$

A SVM belongs to the large margin classifiers and constructs a separating plane in the wavenumber space. In order to deal with nonlinear separable data, the kernel trick is used. The decision function is then expressed with the support vectors $\vec{x}^{(i)}$, a weight vector $\vec{\alpha}$ and the offset b as:

$$\text{class}(\vec{x}) = \text{sgn} \left(\sum_{i=1}^N y_i \alpha_i K(\vec{x}^{(i)}, \vec{x}) + b \right). \quad (2)$$

A three-layer ANN is trained by a back propagating algorithm, which determines the weights of the neuron connections in such a way that the calculated output and the known output (belonging to the classes) are minimal. Once the weight matrix is determined, new samples are classified through

$$\text{class}(\vec{x}) = \text{sgn} \left(f \left[\theta'_k + \sum_{j=1}^M w'_{kj} f' \left(\sum_{i=1}^n w_{ji} x_i + \theta_j \right) + \sum_{i=1}^n w''_{ki} x_i \right] \right). \quad (3)$$

where f, f' are the activating functions and θ, θ' the bias of the hidden layer and the output layer, respectively. \mathbf{w}, \mathbf{w}' , and \mathbf{w}'' are the weight matrices for the input-hidden connection, the hidden-output connection and the shortcut connection.

Validation and visualization

The result of a supervised method is only meaningful if it is validated. Here, two algorithms for the evaluation of a binary classification task are utilized, a 25th cross-validation (CV) and a holdout-validation (HV). The first algorithm splits the data into n folds, builds the classification model with $n - 1$, predicts the accuracy and calculates the mean of all n accuracies. The holdout method uses an independent data set to evaluate the performance of the model. This is an accuracy estimate, which takes unknown

samples into account. The standard method leave one out cross-validation (LOOCV) is not used because of computational costs and over optimistic estimates of the accuracy.^[15]

These both methods are used to estimate the accuracy, the true positive (TP) rate and the false positive (FP) rate. To visualize the differences between the classifiers, a common possibility is to use receiver operating characteristics (ROC) graphs, where the TP rate is plotted against the FP rate. For a binary classification task, the optimal classifier is represented as the point (0,1) or (1,0). The diagonal indicates guessing and classifiers which belong to points (a, b) and (b, a) are the same only if the names of the predicted classes are twisted. It should be emphasized that the TP rate is called sensitivity and 1-FP rate is equivalent to the specificity.

These both algorithms can only be applied if the class labels are names. If the output is gradual, a reversed calibration can be used. This is the case for an ANN if it is not used as a binary classifier. This procedure consists of a building model for the input spectra of the statistical method. This can be done by a linear combination of measured reference spectra. In this model, noise can be introduced by adding a Gaussian vector. Thereafter, the output of the method and the coefficients of the linear combination are compared. Often the relation of both is evaluated with Pearson's correlation coefficient. This correlation measure is defined by the scalar product and a normalization

$$\rho(\vec{x}_1, \vec{x}_2) = \frac{\vec{x}_1 \cdot \vec{x}_2}{|\vec{x}_1| |\vec{x}_2|} \quad (4)$$

A value around 1 indicates a strong linear correlation, whereas -1 stands for an antiproportionality. If this value is above 0.95, a linear correlation can be expected and a fit is appropriate to investigate this relation.

Results and Discussion

Data analysis strategy

In this study, a hierarchical organization was used to develop a MCF-7/MCF-10A classifier by means of Raman spectroscopy. This was done because the hierarchical approach offers a wide range of advantages, which are described in Ref. [17]. First, a complex classification task is split into easier tasks. Another benefit is that different classification models can be used for different parts of the problem. For this reason, the error rate is minimized because the best matching statistical method is used. Beside these computational considerations, another advantage is arising from the MCF-7/MCF-10A classification task itself. It is possible with the hierarchical alignment to imitate the work of a pathologist. Second, the shape and the size of the nuclei are used as an indicator for the diagnosis. ANN was chosen as a top-level classifier. This ANN classifies the spectra as 'nuclei' and 'rest', which is an imitation of a pathologist work. The 'nuclei' are then presented to the sublevel classifier, which decides the belonging to MCF-10A and MCF-7 cell lines (Fig. 1).

Design of the classifier

In this work, the top-level classifier searches the region with a sufficient high DNA/RNA contribution. Because no class assignments were known about the spectra, an experienced spectroscopist determined the contributions of nucleic acids. With the 328

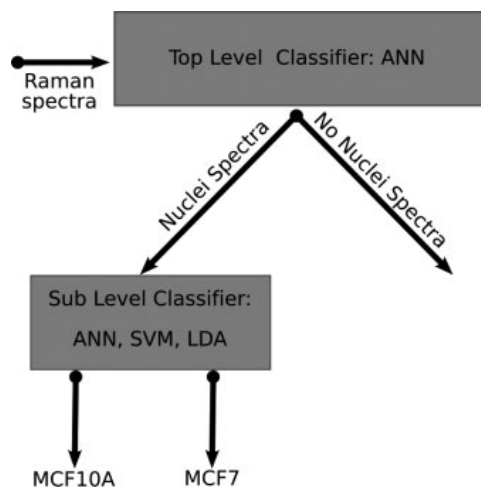


Figure 1. Principle of classification. The measured Raman spectra are presented to the top-level classifier which presorts the spectra. Spectra with a high DNA/RNA contribution are then classified as MCF-7 and MCF-10A cells.

Raman spectra showing the highest DNA/RNA signals, the top-level classifier was trained. Only the ANN is capable of learning a classification problem with only one precise known class and was therefore selected as a top-level classifier. Because the class assignments are not precisely known, this first classifier is not evaluated using CV or HV methods rather than a reversed calibration which is called pseudo calibration.

After this presorting, the Raman spectra which showed enough DNA/RNA content were lead to the sublevel classifier. For this second classifier, the assignment is known and every statistical method can be used. The methods which were tested are LDA, ANN, linear SVM and nonlinear SVM. The resulting models are internally and externally evaluated. The external validation was done with over 30 000 spectra to prevent over fitting. Latter is the learning of the individual noise of one spectrum and the classifying on basis of this randomness.

Top-level classification

It was mentioned that an ANN was used for the top-level classification step. The topology of the ANN was 60 : 15:1 (60 input neurons, 15 hidden neurons and 1 output neuron). The number of input neurons was fixed because the number of principal components was chosen before. The decision nuclei–rest is a binary task, so there is only one output neuron. The number of hidden units is a trade-off between flexibility of the network and the complexity of the training. Higher numbers of hidden neurons result in a high adaptive network, whereas the learning procedure takes a long time. The outcome of a lower number of input neurons is a less flexible network but the training is fast.

In order to investigate the contribution of nucleic acids in the spectra, the Raman signals at 785, 811 and 1575 cm^{-1} were used as marker bands. The corresponding vibrations are the O–P–O-stretching vibration ($\nu(\text{O-P-O})$) of the DNA backbone, the O–P–O-stretching vibration of the RNA backbone and the $\nu(\text{C=O})$ of adenine and guanine, respectively.^[28] The top-level classifier was trained using 328 spectra which showed strong contribution of DNA/RNA. These spectra were coded with '1'.

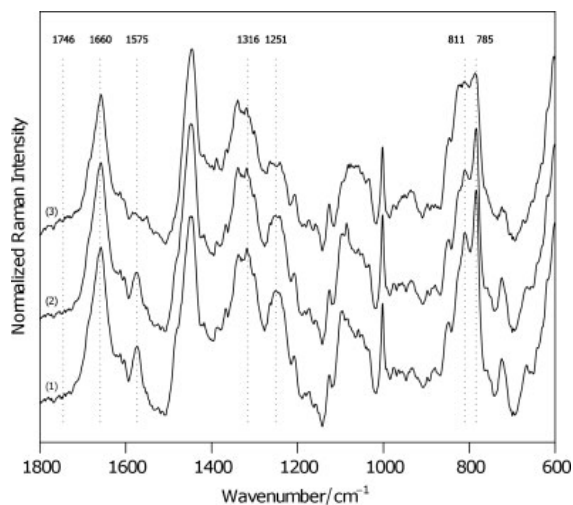


Figure 2. Comparison of the classification means. The mean of the selected nuclei Raman spectra (1) exhibits almost the same spectral features like the mean of the calculated nuclei Raman spectra (2). The mean spectra of the nonnuclei region are plotted as spectrum 3. Major differences between the calculated means arise from the DNA/RNA bands.

Then 328 spectra were sampled from all the rest spectra and coded with '0'. This selection of the labels was done because the ANN output is used afterwards as a concentration measure. Therefore, the decision function of the ANN has to be shifted by a constant factor. The threshold is then 0.5 rather than 0. With both sets, a 60 : 15:1 net was trained and all the spectra of this net grouped as nuclei Raman spectra (the ANN response was above 0.5) were used for the sublevel classification. In Fig. 2, the mean Raman spectra of the selected nuclei spectra (1) and both the means of the resulting classification (2,3) are plotted. It is clear that the selected nuclei mean (1) and the calculated (2) exhibit the contribution of the same substances, e.g. the used marker bands are also present in the mean of the calculated Raman spectra (2). Instead, the mean of the rest group (3) is distinct.

These both calculated means (2,3) not only differ in the above-mentioned DNA/RNA bands (785, 811 and 1575 cm^{-1}) but major differences are also present in the region centered at 1660, 1316 and at 1251 cm^{-1} which are assigned to amide I, CH_2-CH_3 twisting mode of protein and amide III, respectively.^[29] It is obvious that much more differences are visible. All of these findings suggest that the contribution of protein in the nuclei spectra is high as in the rest spectra where a proportion of lipids in the spectra is visible. This is reasonable because the nuclei spectra are measured in a region of the cell where the height is enlarged compared with the edge of the cell. The lipid contribution arise from double layer which forms the cell membrane, vesicles and mitochondria which exhibits separated compartments in the cell.

After applying the top-level classifier, a small fraction of the spectra is assigned as nuclei spectra. A total of 2588 samples of the training set and 4266 of the test set were classified as nuclei Raman spectra (Table 1). 596 out of 9273 of the MCF-10A spectra and 1992 out of 16 431 of the MCF-7 spectra in the training data were classified as nuclei spectra. This unbalance is a result of the higher DNA/RNA content in malign cells. The same observation is done in the test set. A total of 828 MCF-10A spectra and 3438 MCF-7 spectra were sorted as nuclei spectra out of 16 896 and

Classification methods for medical diagnosis

Table 1. Number of spectra. The size of the part of the dataset used for building up the model and the part which is exclusively used for validation purposes

	Training set	Test set
MCF-10A	9 273	16 896
MCF-7	16 431	17 388
Total	25 704	34 284

17 388, respectively. The difference is increased because there were more cells in the MCF-10A test data set than in the MCF-7 test set.

In order to investigate the properties of the top-level classifier, artificial spectra were created. Reference spectra of female DNA, collagen I, histon and lipoprotein were mixed, and a Gaussian distributed vector of standard deviation 0.005 is added to simulate the white noise in the spectra. The resulting SNR is approximately 14 relative to an average peak height of 0.05.

The response of the ANN is plotted against the mixture coefficient. It is obvious that the DNA content of the spectra and the ANN response are correlating. In fact Pearson's correlation coefficient is 0.98, which indicates a strong dependency. The correlation coefficients from the other reference substances were -0.55 (histon), -0.53 (collagen I) and -0.88 (lipoprotein). From this superposition model for a cell, someone can conclude that the top-level classifier searches for DNA contribution, which also the means suggest. The correlation value for lipoprotein indicates that no signature of fatty acids is present in the nuclei.

At the end, it is possible to calculate the DNA distribution in absolute values via a least square fit. The fit coefficients for slope and intercept were -0.28 and 1.72 , whereas the residual was 1.53×10^{-19} . Now the top-level ANN can be used in two ways. First the DNA/RNA contribution can be studied to extract structural information of the nuclei. This can be useful to correlate morphological changes with the stage of cancer. In Fig. 3, the shifted and scaled ANN response is plotted for three MCF-7 cells. It is obvious that the DNA/RNA is not equally distributed and the topology of the nuclei is visible. This is achieved without staining; therefore, it is in principal suitable for online analysis of changes in the nuclei of cells living *in situ*.

Sublevel classification

The cutoff value for assigning spectra as nuclei spectra was set to 0.5. The pseudo concentration is calculated with the pseudo calibration set to 0.45. First was tested with a Student's *t*-test if both groups have the same mean score. This was done with a confidence level of 95% and the negative decadic logarithm of the probability belong to the same entity was plotted (Fig. 4). High values belong to principal components where the differences are significant. These PCs are good for separating both groups, nevertheless all scores of the first 60 components were used for classification.

To investigate the prediction ability for separating healthy from malign cells, two methods are utilized. First a 25-fold CV was done to calculate the classification properties of the model. For this purpose, six supervised methods, namely, LDA, linear SVM, radial base SVM, polynomial SVM and two ANNs, were tested. The results are shown in Fig. 5. All the methods do quite well. Even so both the nonlinear SVMs are not functioning as well. The accuracies ranging from 99.45% (60 : 15:1 ANN), 99.59% (60 : 10:1

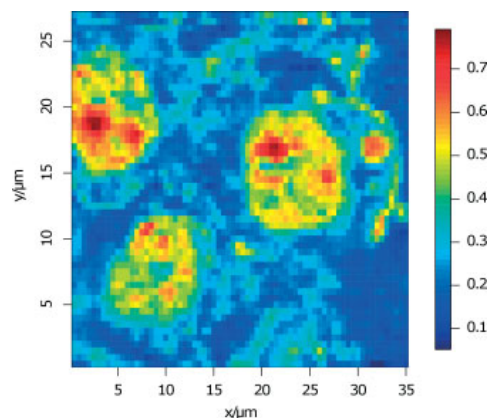


Figure 3. DNA distribution. The output of the top-layer ANN is shifted and rescaled according to the pseudo calibration. Therefore, it is possible to map the DNA distribution as a consequence of the nuclei morphology.

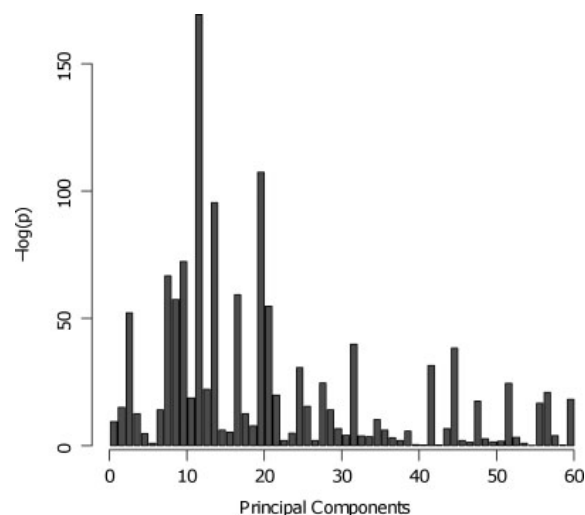


Figure 4. Student's *t*-test results of the sublevel classifier. $-\log(p)$ is plotted against the retained principal components. High values indicate components which are suitable for separation of MCF-7/MCF-10A cells.

ANN), 99.42% (LDA), 99.07% (linSVM), 98.29% (polSVM) to 97.75% (rbSVM). The sensitivity of all methods was better than 98.5%, but the selectivity was better than 95% only for four algorithms.

Three of these supervised methods were then tested for their identification rates with a holdout method. 34 284 spectra were not used to build the model, and the prediction of these spectra were compared with their true classes. Then the TP rate, the FP rate and the accuracies are calculated and are listed in Table 2. This time, the 60 : 15:1 ANN was superior. The accuracy is 99.11%, the sensitivity 99.71% and the selectivity 96.62%.

To understand a classifier often the comparison of the means of classification is utilized. This is a linear procedure, which is only valuable if the data set can be separated in a linear manner. In the case of the sublevel classifier, a linear separation is poorly possible which is evident in the classification rates of the LDA and the linear

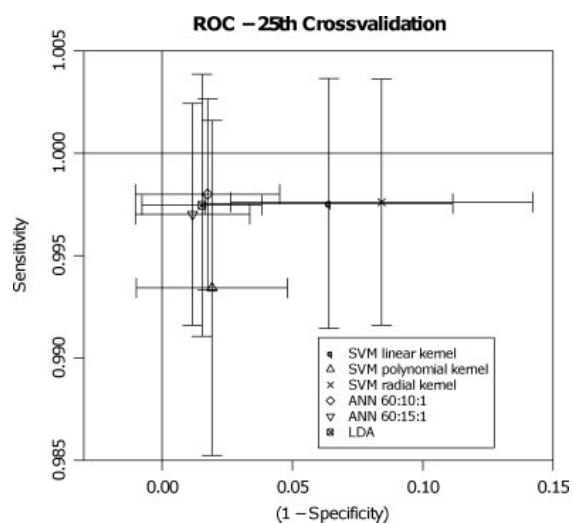


Figure 5. Receiver operating characteristics graph of the sublevel classification. The true positive rate and the false positive rate are plotted against each other for the six methods under investigation. The values and the standard deviation are calculated with a 25-fold cross-validation.

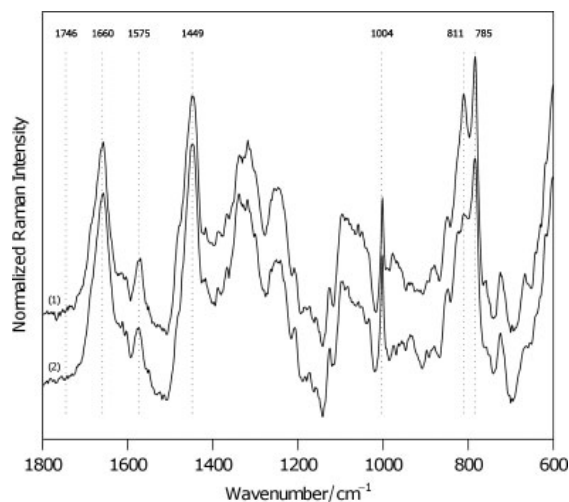


Figure 6. The sublevel classification means. The mean of all Raman spectra which are assigned to the MCF-10A group is plotted as spectrum 1, whereas the mean of the MCF-7 cells is spectrum 2. Because the top-level classifier searches nuclei spectra this is a comparison of cell nuclei from these both cell lines.

Table 2. Holdout estimates of the accuracy, true positive rate and the false negative rate. The resulting hierarchical classifier is evaluated with independent data which ensure the ability of the diagnosis procedure to work in a clinical environment

Method	Accuracy (%)	TP rate (%)	FP rate (%)
60 : 15 : 1 ANN	99.11	99.71	3.38
Linear SVM	96.51	99.65	16.55
LDA	97.96	99.79	9.66

SVM (Table 2). In order to ensure the comparability with literature, the comparison is done nevertheless.

The mean of the both predicted groups is plotted in Fig. 6. The differences which are visible not only arise from both cell lines but also the top-level classifier could work slightly different on both cell lines, because of their different chemical composition. Both cell line means feature the same signature. Only relative intensity changes occur in the region 1080–1095 cm^{-1} . The reason for this cannot be identified because the region between 1080 and 1095 cm^{-1} exhibits the $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-N})$ and $\nu(\text{O-P-O})$ modes. Therefore, almost all biomolecules have contribution in that region. All important bands can be arranged in three groups: proteins, nucleic acids and lipids. Because the top-layer worked on the data set, the nucleic acid bands located at 1575, 811 and 785 cm^{-1} are obvious. Protein signatures are found at 1660, 1449 and 1004 cm^{-1} . According to Krafft *et al.*,^[30] these bands are assigned to the amide I, the CH_2 deformation and the symmetric ring breathing mode of phenylalanine, respectively. No lipid bands are visible in both means.

Conclusion and Outlook

In this contribution, we presented a Raman spectroscopic study of two cell lines which were chosen as a model system for breast cancer. The aim of this study was to show the ability of Raman

spectroscopy for cancer diagnosis on single-cell level. Therefore, it was necessary to show that MCF-10A and MCF-7 cells could be classified through their Raman spectra with classification rates and identification rates above 95%. It should be emphasized that for clinical purposes the classification rate is of smaller importance than the identification rate.

In order to test the resulting diagnosis, algorithm under clinical conditions over 30 000 spectra (roughly a half of the data set) was used as independent test set, which was never used for building the model. The identification rate which was estimated using this holdout method was 99.11% while the sensitivity and the specificity were 99.71 and 96.62%, respectively. These properties were achieved with a hierarchical design of the classifier, where the classification/identification of MCF-10A and MCF-7 was based on the spectra which exhibit strong contributions of DNA/RNA. This procedure is an adoption of pathologist's work, which also uses the size and shape of the nuclei as an indicator for their diagnosis.

Because it was shown that a cancer decision is possible based on Raman spectroscopy, in further investigations the potential of Raman spectroscopy in differentiating stages and grades of cancer should be a focus of research. Therefore, a database with cell lines belonging to various types of breast cancer and surrounding areas is under construction. This will result in an accurate diagnosis and an individual therapy. The preliminary results are encouraging, so a Raman cancer diagnosis tool is not remote future.

Acknowledgements

The funding of the research project Exprimage (FKZ13N9364) within the framework Biophotonik from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) is gratefully acknowledged.

References

- [1] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, 100(1), 57.

Classification methods for medical diagnosis

- [2] R. K. Dukor, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Wiley & Sons: **2002**.
- [3] M. Harz, M. Kiehntopf, S. Stöckel, P. Rösch, T. Deufel, J. Popp, *Analyst* **2008**, 133, 1416.
- [4] M. Harz, M. Kiehntopf, S. Stöckel, P. Rösch, E. Straube, T. Deufel, J. Popp, *J. Biophoton.* **2009**, 2, 70.
- [5] M. Harz, R. A. Claus, C. L. Bockmeyer, M. Baum, P. Rösch, K. Kentouche, H.-P. Deigner, J. Popp, *Biopolymers* **2006**, 82, 317.
- [6] P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, J. Popp, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 377.
- [7] P. Rösch, M. Harz, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, J. Popp, *Biopolymers* **2006**, 82, 312.
- [8] P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, H.-W. Motzkus, M. Lankers, S. Hofer, H. Thiele, J. Popp, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 1626.
- [9] U. Schmid, P. Rösch, M. Krause, M. Harz, J. Popp, K. Baumann, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2009**, 96, 159.
- [10] C. Krafft, A. A. Ramoji, C. Bielecki, N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, P. Rösch, M. Schmitt, B. Dietzek, I. Petersen, A. Stallmach, J. Popp, *J. Biophoton.* **2009**, 2, 303.
- [11] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites, R. Salzer, *J. Biophoton.* **2008**, 3, 1.
- [12] R. Malini, K. Venkatakrishna, K. M. Pai, L. Rao, V. B. Kartha, C. M. Krishna, *Biopolymers* **2005**, 81, 179.
- [13] D. C. Redd, Z. C. Feng, K. T. Yue, T. S. Gansler, *Appl. Spectrosc.* **1993**, 47, 787.
- [14] K. E. Shafer-Peltier, A. S. Haka, M. Fitzmaurice, J. Crowe, J. Myles, R. R. Dasari, M. S. Feld, *J. Raman Spectrosc.* **2002**, 33, 552.
- [15] R. Kohavi, *International Joint Conference on Artificial Intelligence*, American Association for Artificial Intelligence: **1995**.
- [16] R Development Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, **2007**.
- [17] P. Lasch, M. Beeke, J. Schmitt, D. Naumann, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 1791.
- [18] D. Zhang, J. D. Hanna, D. Ben-Amotz, *Appl. Spectrosc.* **2003**, 57, 1303.
- [19] Y. Katsumoto, Y. Ozaki, *Appl. Spectrosc.* **2003**, 57, 317.
- [20] C. A. Lieber, A. Mahadevan-Jansen, *Appl. Spectrosc.* **2003**, 57, 1363.
- [21] T. Udelhoven, D. Naumann, J. Schmitt, *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 1471.
- [22] W. N. Venables, B. D. Ripley, *Modern Applied Statistics with S* (4th edn), Springer: New York, **2002**.
- [23] E. Dimitriadou, K. Hornik, F. Leisch, D. Meyer, A. Weingessel, e1071: Misc Functions of the Department of Statistics (e1071), TU Wien, **2007**, R package version 1.5-17.
- [24] C. J. Burges, *Data Min. Knowl. Discov.* **1998**, 2, 121.
- [25] P. Lasch, M. Diem, W. Hänsch, D. Naumann, *J. Chemom.* **2006**, 20, 209.
- [26] H. Yang, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd: **2002**.
- [27] C. M. Bishop, *Neural Network for Pattern Recognition*, Clarendon Press: **1995**.
- [28] J. de Gelder, K. de Gussem, P. Vandenaabeele, L. Moens, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 38, 1133.
- [29] N. Stone, C. Kendall, N. Shepherd, P. Crow, H. Barr, *J. Raman Spectrosc.* **2002**, 33, 564.
- [30] C. Krafft, T. Knetschke, A. Siegner, R. H. W. Funk, R. Salzer, *Vib. Spectrosc.* **2003**, 32(1), 75.

2.2 A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy. [MBP2]

K. Hartmann*, M. Becker-Putsche*, T. Bocklitz, K. Pachmann, A. Niendorf, P. Rösch, J. Popp

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012, 403, 745-753.

Autorenschaft der Publikation

Katharina Hartmann*	Präparation der Zellen, Raman-Messungen, Auswertung und Manuskripterstellung
Melanie Becker-Putsche*	Raman-Messungen, Auswertung, Ergebnisdiskussion und Manuskripterstellung
Thomas Bocklitz	Auswertung der Datensätze, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Katharina Pachmann	Anziehen der Zellen
Axel Niendorf	Projektpartner, Konzept- und Ergebnisdiskussion
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Jürgen Popp	Projektleitung, Konzept- und Ergebnisdiskussion, Korrektur des Manuskript

* Koautoren

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von *Springer*. Reprinted with kind permission from *Springer*.

Anal Bioanal Chem (2012) 403:745–753
DOI 10.1007/s00216-012-5887-9

ORIGINAL PAPER

A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy

Katharina Hartmann · Melanie Becker-Putsche ·
Thomas Bocklitz · Katharina Pachmann ·
Axel Niendorf · Petra Rösch · Jürgen Popp

Received: 9 December 2011 / Revised: 15 February 2012 / Accepted: 17 February 2012 / Published online: 8 March 2012
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Chemotherapies feature a low success rate of about 25%, and therefore, the choice of the most effective cytostatic drug for the individual patient and monitoring the efficiency of an ongoing chemotherapy are important steps towards personalized therapy. Thereby, an objective method able to differentiate between treated and untreated cancer cells would be essential. In this study, we provide molecular insights into Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells, as a model system for adenocarcinoma, by means of Raman

microspectroscopy combined with powerful chemometric methods. The analysis of the Raman data is divided into two steps. In the first part, the morphology of cell organelles, e.g. the cell nucleus has been visualized by analysing the Raman spectra with *k*-means cluster analysis and artificial neural networks and compared to the histopathologic gold standard method hematoxylin and eosin staining. This comparison showed that Raman microscopy is capable of displaying the cell morphology; however, this is in contrast to hematoxylin and eosin staining label free and can therefore be applied potentially in vivo. Because Docetaxel is a drug acting within the cell nucleus, Raman spectra originating from the cell nucleus region were further investigated in a next step. Thereby we were able to differentiate treated from untreated MCF-7 cells and to quantify the cell–drug response by utilizing linear discriminant analysis models.

This document is a collaborative effort of Melanie Becker-Putsche and Katharina Hartmann and they contributed equally to the presented work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-012-5887-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Hartmann · M. Becker-Putsche · T. Bocklitz · P. Rösch ·
J. Popp (✉)
Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics,
University of Jena,
Helmholtzweg 4,
07743 Jena, Germany
e-mail: juergen.popp@uni-jena.de

K. Hartmann · M. Becker-Putsche · T. Bocklitz · J. Popp
Institute of Photonic Technology,
Albert-Einstein-Straße 9,
07745 Jena, Germany

K. Pachmann
Department of Hematology and Oncology,
Clinic for Internal Medicine II, University Hospital Jena,
07740 Jena, Germany

A. Niendorf
Pathologie Hamburg-West,
Institut für diagnostische Histopathologie und Zytologie,
Lomsenstraße 4,
22767 Hamburg, Germany

Keywords Raman microspectroscopy · Docetaxel · Breast cancer · MCF-7

Introduction

Breast cancer is the most common cause of death of women worldwide [1]. Due to the low effectiveness of chemotherapeutic agents of about 25% as one possible origin of the high mortality rates [2], it is of utmost importance to achieve a comprehensive understanding about the therapeutic mechanism of cytostatics in order to improve chemotherapy. In addition, monitoring the efficiency of an ongoing chemotherapy and supporting the choice of the most effective cytostatic drug would be an important step towards personalized therapy.

In the current clinical practice, the choice of chemotherapeutic drugs for patients is based on clinical trials and observations made on the courses of a disease for other patients. This practice harbours the risk that the individuality of patients is disregarded. Also the selection of drug combinations is widely empirical and often done by trial and error. However, since the introduction of chemotherapeutic agents investigations deal with an optimization of the drug selection for the individual patient. Especially in vitro chemosensitivity tests to predict a chemotherapy response gain impact, e.g. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), membrane and ATP assays and genomic analyses [3–5]. Nevertheless, some assays turned out to be insufficient of directing therapy [5] and the above mentioned techniques are not widely used in clinical practice.

During the last decades Docetaxel (DCT, Taxotere®) became a widely used chemotherapeutic agent [6] against prostate, lung, stomach and ovarian cancer. It is known as highly active anticancer drug and one of the most effective medication against breast carcinoma [7]. DCT is a semi-synthetic taxane, which is produced by the esterification of 10-deacetyl baccatin III, an extract from needles of the European yew (*Taxus baccata* L.) [8].

DCT has an enoumerous affinity to the β -tubulin of the microtubules of the cytoskeleton. Commonly there is an equilibrium between polymerisation and depolymerisation of the microtubules. This dynamic reorganisation is import for several cellular processes, e.g. the uptake, transport and secretion of vesicles, cell movements, formation of the cell shape and segregation of the chromosomes during mitosis [9]. A DCT treatment disturbs the depolymerisation of the microtubules causing a cell-cycle arrest [9–11]. Thereby, an ongoing controversy about the exact mode of action and the death mechanism exists: Morse et al. determined the non-apoptotic mitotic catastrophe with its missegregation of the chromosomes during mitosis and resulting micronuclei as the primary death mechanism of DCT treated human breast cancer cells, e.g. MCF-7 [9]. In contrast several other contributions report about apoptosis as the main mechanism of cell death after a DCT treatment induced mitotic catastrophe [12–15]. In this controversy, it should be also considered, that the response of antimicrotubule drugs might cause a dose- and cell line-specific mixtures between apoptotic and mitotic cell death, depending on the genetic background [9, 10, 16].

Raman spectroscopy in combination with optical microscopy has established itself because of its non-invasive character, high molecular specificity, minimal sample preparation and high spatial resolution in the micrometer range to an extremely powerful analytical method. Thereby Raman microscopy has been recognized within the last years to be a very capable method to analyse biological

samples like, e.g. eukaryotes [17–21] as well as prokaryotes [22–28] and even viruses [29]. By doing so, it allows answering a broad range of biomedical questions like, e.g. early diagnosis of cancer [30–36]. Because of the subtle biological differences involved, this requires a multivariate treatment of Raman spectra in order to extract all necessary bio-chemical information [37].

In comparison to Fourier transform infrared spectroscopy, which is also capable to acquire structural information of cell organelles [38], Raman microspectroscopy provides the unique capability to observe biochemical information from living cells [39–41]. Thereby, the non-disturbing low Raman-scattering cross section of water is of crucial importance. It allows the investigation of living cells in buffer solution or in their culture media.

Furthermore, several publications deal with the effects of chemotherapeutic agents on cells: In 1982, Manfait et al. already investigated the interaction of the anthracycline Adriamycin with human DNA via Raman and resonance Raman spectroscopy and found that the chromophores of Adriamycin intercalate into the GC sequences of the DNA and that hydrogen bonds are formed [42]. In recent years, many experiments cover the biochemical and spectral changes in Raman spectra of cells undergoing apoptosis due to a treatment with chemotherapeutic drugs. Especially the investigation of living cells gains impact [39–41]. Thereby, Raman spectra from the same living cells at different intervals were detected. Zoladek et al. even presented an experimental setup, which allows the maintenance of the cells under sterile physiological conditions during Raman measurements [40]. Currently, the optimization of the experimental design is of interest. Laser tweezers were applied to both optical trapping of single suspensions cells and simultaneous Raman spectroscopy [43] as well as single-cell patterned microarrays [39]. In addition, modern techniques like resonance Raman and surface enhanced resonance Raman scattering [44] and surface enhanced Raman scattering (SERS) [45] were utilized to monitor the effects introduced by chemotherapeutic agents on cancer cells. Hence, SERS has shown its potential as a simple and sensitive drug screening tool potentially even in vivo.

The aim of the current study is to investigate the interaction between DCT and the cultivated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 by Raman microspectroscopy in combination with special statistical/chemometrical methods. The resulting Raman images will be validated by the histopathological gold standard hematoxylin and eosin staining. Furthermore the additionally information in the Raman scans should be used for determining the function of DCT on MCF-7 cells in a quantitative and objective manner. The successful realization of these goals would be a significant step towards a personalized medicine applying Raman microspectroscopy as control tool.

Materials and methods

Cell line selection and cell cultivation

The breast cancer cell line MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), established by Soule et al. in 1973, contains isolated epithelial cells from a pleural effusion from a 69 years old caucasian female patient with metastatic mammary carcinoma [46]. Cells were cultivated in cell culture flasks with Roswell Park Memorial Institute 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. For the experiments, cells were harvested by trypsinization, centrifugation and finally re-cultured on fused silica slides (Frank Optic Products GmbH, Germany) in petri dishes with the same cultivation conditions for further 24 h.

Cell treatment with DCT

DCT powder was resolved in ethanol and diluted by the growth media. Thereby, the used DCT solution contains an ethanol content of only 0.1% to prevent chemical alterations in MCF-7 cells.

MCF-7 cells were exposed to the growth medium supplemented with various DCT concentrations. Table 1 gives an overview of the applied concentrations and exposure times. In the first test series, slides with grown cells were treated with 10 and 100 nM DCT concentration for 24 h (Batch 1) and 48 h (Batch 2), respectively. The cells of Batch 3 were incubated

Table 1 Overview of applied DCT treatments

Batch	Slide number	Exposure time (h)	DCT concentration (nmol/l)
First test series			
1	T01	24	0
	T02		10
	T03		100
2	T04	48	0
	T05		10
	T06		100
3	T07	24+24	0
	T08		10
	T09		100
Second test series			
4	T10	48	0
	T11		2.5
	T11		5
	T11		7.5
	T12		10
	T13		100

for 24 h with DCT. Subsequently the DCT containing medium was replaced with a normal medium (without DCT). A cell cultivation step of further 24 h followed. The second test series (Batch 4) contained MCF-7 cells treated for 48 h with DCT concentrations of 2.5, 5 and 7.5 nmol/l. Cultures of untreated cells were used as references. Each test series (batch) was prepared twice. For Raman data acquisition, the cells were air dried and stored at room temperature. For each batch, 2 to 6 cells were measured, while approximately 20,000 Raman spectra were recorded.

Hematoxylin and eosin staining

Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used as common histopathological analysis for comparison with the Raman data. H&E staining allows the assignment of various structures in tissues and single cells [47]. Hematoxylin stains all basophilic components blue, especially the nucleus containing DNA and RNA, and the rough endoplasmatic reticulum with an accumulation of ribosomes as a result of a coordination bond between aluminum and phosphor atoms of the DNA and RNA [48]. Eosin stains the cytoplasm, connective tissue and collagen fibers (eosinophilic substances) red due to ionic bonds between the anionic dye and cationic plasma proteins. The samples were stained according to a well established standard protocol [49].

Raman microspectroscopy

Raman measurements were performed with the confocal Raman microscope [50] CRM 300 (WITec, Germany) equipped with a 50×/NA 0.95 objective (Zeiss, Germany). As excitation light, the 785 nm output of a diode laser was used with a power of 50 mW at the sample. For each spectrum, an acquisition time of 10 s was applied. The back scattered light was spectrally dispersed with a monochromator of 300 nm focus length equipped with a 600 lines/mm grating and detected by an EM-CCD camera with pixels operated at -75 °C. The cell Raman maps were recorded with a step size of 0.5 μm.

Chemometric evaluation

The large amount of Raman data was evaluated applying chemometric methods. The calculations were performed on a commercially available PC system (Intel(R) Core(TM) 2Duo CPU, E67502.66 GHz, 1.97 GB RAM). The computations were done in R [51], a statistical language. All Raman spectra were preprocessed as described in a previous publication [32], while here only a brief overview is given.

First a wavenumber calibration employing the commonly used wavenumber standard 4-acetamidophenol was performed. For the chemometric analysis, the Raman spectra were truncated to the wavenumber region between 600 and 1,800 cm⁻¹ (part of the fingerprint region). Afterwards, a background

subtraction was performed applying a 5th order polynomial [52] to correct for the fluorescence background followed by a vector normalization. Prior to the analysis, a dimension reduction to 50 PCA scores was carried out to reduce the dimension of the data matrix without losing too much information. The chemometric analysis includes *k*-means cluster analysis [53], artificial neural networks (ANN) [32] and linear discriminant analysis (LDA) models [54]. While the *k*-means cluster analysis and the ANN were used for visualization, the LDA model was applied as a classification technique. The LDA was cross-validated by a leave-one-out-cross-validation (LOO-CV) [55].

Results and discussion

Visualization of the cell morphology—qualitative analysis

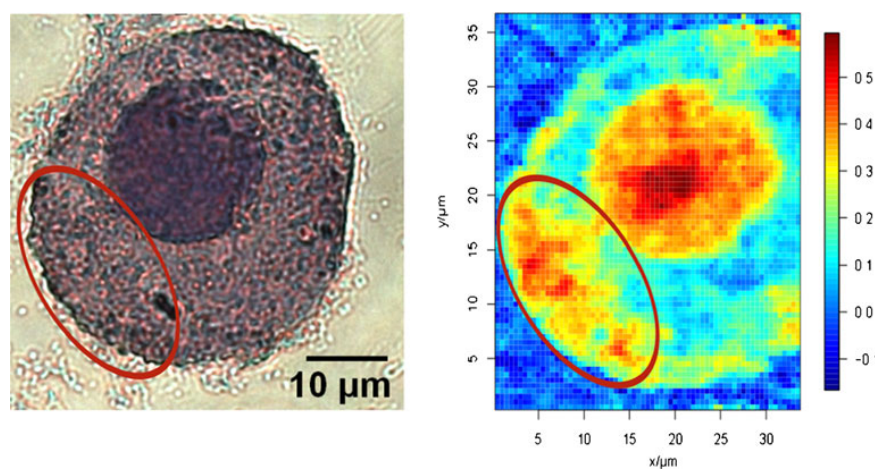
DCT induces nucleus fragmentation due to apoptosis or mitotic catastrophe at the beginning of the effect chain [9–11, 16]. For that reason, the first aim was the visualization of the morphology of MCF-7 cells. This will be an important step for further analyses, e.g. for the realization of a quantitative analysis presented in the “Determining the cell–drug response—quantitative analysis” section. In order to visualize the cell morphology, we applied an ANN to analyse the Raman *xy*-scans of whole single cells. The ANN analysis yields the DNA/RNA distribution for each measured Raman spectrum allowing the creation of a Raman image displaying the DNA/RNA content of the whole cell. These DNA/RNA Raman maps can be validated by comparing them with the histopathologic gold standard H&E staining. This validation of the applied ANN algorithm showed that DNA/RNA Raman maps display the position and shape of the cell nucleus.

Figure 1 compares the DNA/RNA distribution generated by an ANN with a subsequently stained H&E image of the

same non DCT treated cell. In the Raman image, high DNA/RNA concentrations are displayed in red, while low concentrations appear blue. It can be clearly seen that the position, shape and size of the nucleus are comparable in both images. Furthermore, the lower left region of the cell (see encircled region in Fig. 1) shows one further structure both visible in the H&E as well as in the image generated by an ANN. The origin of this cannot be definitely clarified, but one possibility could be the presence of extra nuclear RNA, e.g. rough endoplasmatic reticulum or messenger, transfer or ribosomal RNA. This assumption was confirmed by Figure S1 in the Electronic Supplementary Material displaying Raman spectra from the nucleus and cytoplasm. The Raman spectra of cytoplasm and the nucleus show a significant Raman band at 811 cm^{-1} assigned to the vibration of the sugar-phosphate backbone of the RNA [56]. Therefore, the presence of extra nuclear RNA is probable in the nucleus as well as in the cytoplasm. Overall, Raman microspectroscopy provides similar information as the histological gold standard H&E staining. The great advantage is that Raman microspectroscopy is label free and therefore potentially capable for *in vivo* applications in comparison with the H&E stain. This proof-of-principle is necessary for further experiments dealing with the effect of docetaxel on living cancer cells over a longer period of time. To investigate such dynamic cellular events, a measurement technique requiring a label is not suitable. Raman microspectroscopy is label free and non-invasive and thus, cellular functions remain untouched in living cells during the measurement. Overall, the used ANN algorithm is ideally suited to identify Raman nuclei spectra, which can be further analysed (see the “Determining the cell–drug response—quantitative analysis” section).

In the following the ANN Raman images will be analysed with respect to identify structural differences in treated and untreated MCF-7 cells. Figure 2 (first row) depicts the Raman images of the DNA/RNA content of MCF-7 cells treated with 0, 10 and 100 nmol/l DCT for 48 h. In addition,

Fig. 1 Comparison of a MCF-7 cell stained with H&E (*left*) and the chemical map of the DNA/RNA distribution based on Raman spectroscopic data (*right*). The circle marks a structure in the cell with further DNA or RNA content outside the nucleus



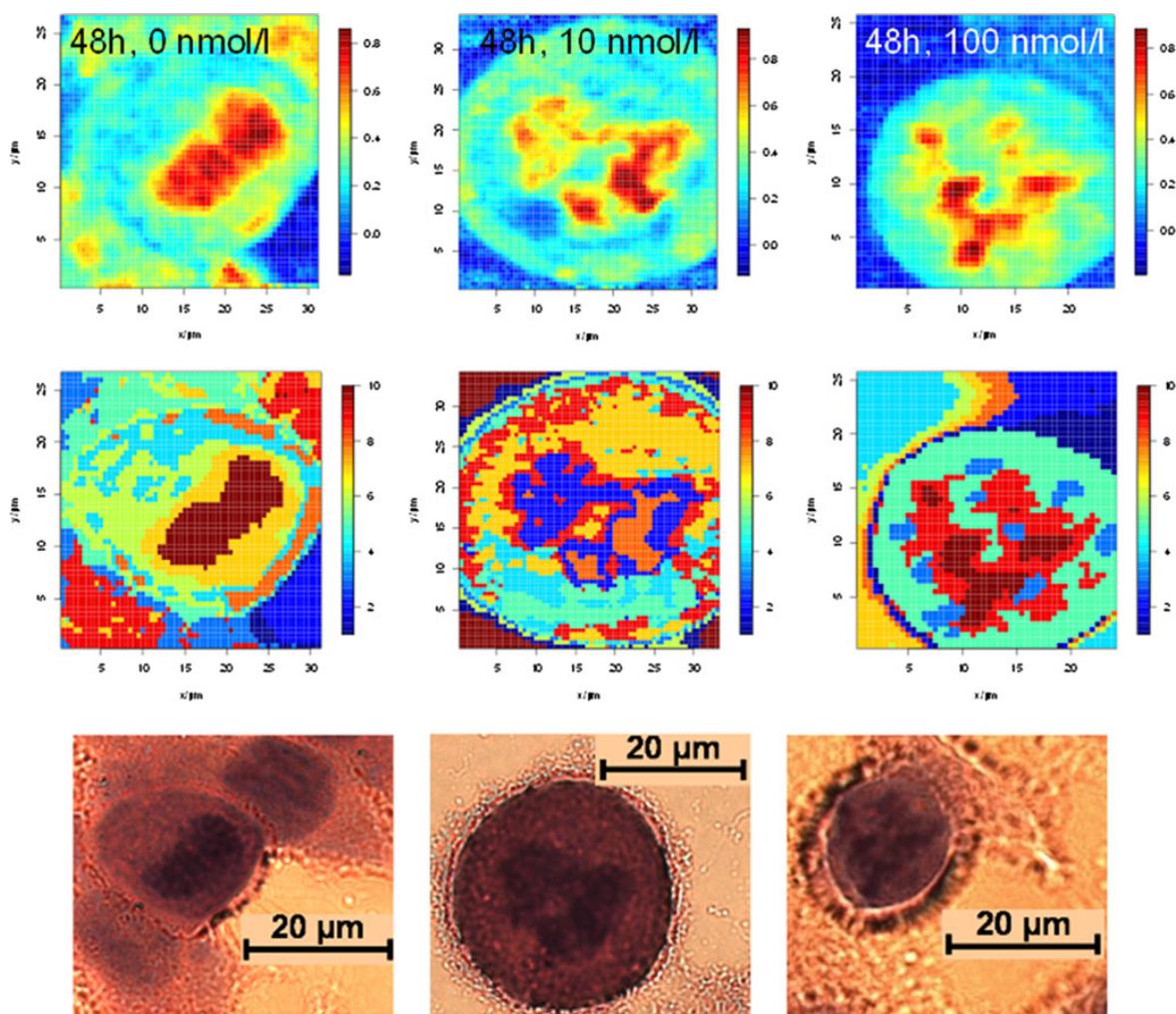


Fig. 2 Raman images of whole single cells generated by ANN analysis showing the DNA/RNA distribution of untreated (0 nmol/l) and DCT treated (10 nmol/l, 48 h and 100 nmol/l, 48 h) MCF-7 cells. *Dark red*

regions mark high DNA/RNA concentrations and thereby the nucleus position (*1st row*); results of the *k*-means cluster analysis (*2nd row*) and corresponding H&E images of the same cells (*3rd row*)

k-means cluster analyses were carried out to visualize cell compartments, mainly the nucleus region (Fig. 2, second row). Both chemometrical methods (ANN and *k*-means cluster analysis) generated the same result: untreated (0 nmol/l) MCF-7 cells show compact cell nuclei, while the cells treated with 10 nmol/l as well as with 100 nmol/l DCT for 48 h exhibit fragmented nuclei. These pronounced differences between treated and untreated cells were confirmed by subsequent H&E staining of the same samples (Fig. 2, third row).

Moreover, DCT induced effects on the cell morphology become visible in almost all measured MCF-7 cells. Some examples are shown in Figure S2 in the Electronic Supplementary Material. The Raman images illustrate once more

an ANN calculation displaying the DNA/RNA content. These cells were treated with 100 nmol/l DCT for the three different exposure times of 24 h, 48 h and 24+24 h (see Table 1). It can be clearly seen that almost all MCF-7 Raman images are characterized by fragmented nuclei. An exception from this behavior can be found for cell 2C showing a homogeneous cell nucleus, which might be attributed to the fact that DCT is only effecting cells during mitosis. Since the cell cycle was not synchronized, it is possible that the cell 2C was not in a mitotic stage. Furthermore, the individual behavior of a cell should be also considered.

However, these results point out that Raman microscopy combined with chemometrical analysis has a great potential to image chemical changes in cells. The used ANN

Table 2 Confidence table of the LDA model for separation of control data vs. Raman data containing cell–drug interactions

Predicted labels	True labels	
	Raman spectra of treated cells	Raman spectra of untreated cells
Raman spectra of treated cells	10176	62
Raman spectra of untreated cells	77	8294

algorithm is an optimal method to visualize the cell nuclei and thereby identify Raman nuclei spectra. The identification of nuclei spectra is an important step result for the subsequent quantitative analysis of the cell–drug response for DCT treated and untreated MCF-7 cells.

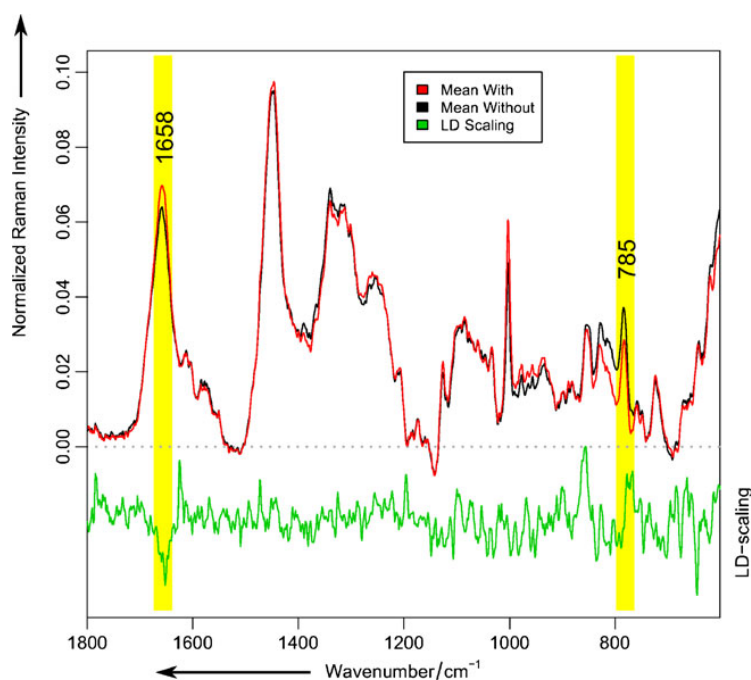
Determining the cell–drug response—quantitative analysis

It is of utmost importance to improve and personalize chemotherapy. Thereby the appropriate choice of the most effective chemotherapeutic drug for the individual patient and the possibility of an online monitoring of the progress of the chemotherapy are two of the major challenges towards increasing the effectiveness of cytostatic drugs and towards a personalized treatment. Raman microspectroscopy in combination with chemometrical methods has the potential to significantly contribute to tackle these challenges. Raman images in contrast to H&E images are of multivariate nature

that is they contain additional spectral information which can be used to differentiate between untreated and treated MCF-7 cells or to unravel the (spectral) cell–drug response.

In order to differentiate between untreated and DCT treated MCF-7 cells, a LDA was utilized to classify the nucleus Raman spectra of treated and untreated cells. The resulting classification model was evaluated by a LOO-CV and the confusion matrix is given in Table 2. The LDA model classified 10,176 out of 10,253 cell nucleus Raman spectra of treated cells and 8,294 out of 8,356 cell nucleus Raman spectra from untreated cells correctly, which corresponds to an accuracy of 99.2%. This accuracy rate together with the achieved sensitivity and specificity of also 99.2% shows that Raman microspectroscopy is perfectly suited to differentiate between treated and untreated MCF-7 cells. Figure 3 displays the mean Raman spectra of the two classes of the LDA model that is DCT treated (red) and untreated (black) MCF-7 cells together with the corresponding LD scaling vector (green). The LD scaling vector (green) indicates the spectral differences within the Raman spectra allowing for the clear separation between treated and untreated cells. A comparison between the mean Raman spectra of treated and untreated MCF-7 cells show that the intensity of the band at 785 cm^{-1} which can be assigned to a DNA/RNA vibration (OPO stretch DNA/RNA) [56, 57] is increased in the mean Raman spectrum of DCT treated cells as compared to untreated cells. The reason for this increasing 785 cm^{-1} band intensity could be a local DNA concentration enhancement due to the nucleus fragmentation and the corresponding

Fig. 3 Raman mean spectra of DCT treated (red spectrum) and untreated (black spectrum) MCF-7 cells. Significant differences are visible, e.g. the DNA/RNA peak at 785 cm^{-1} and amide I peak at $1,658\text{ cm}^{-1}$. These regions are confirmed by the LD scaling vector (green spectrum)



increased DNA condensation. Furthermore the amide I vibration at $1,658\text{ cm}^{-1}$ [56, 57] is decreased in intensity in the mean Raman spectrum of treated MCF-7 cells as compared to the spectrum of untreated cells, which might be also a consequence of the nucleus fragmentation and the corresponding degradation of the protein structures in the nucleus.

In order to investigate DCT concentration dependent cell-response Raman spectra recorded for cells treated with 2.5, 5, 7.5, 10, and 100 nmol/l DCT for 48 h were analysed (see Table 1). It should be noted that only the Raman spectra originating from the cell nucleus were considered. A LDA model was used to calculate the spectral differences between the five different concentrations. The LDA model was trained with two training sets including Raman spectra of cells exposed to DCT concentrations of 2.5 and 100 nmol/l for 48 h to achieve the corresponding LD scaling vector. As test sets, Raman spectra of cells treated with 5, 7.5, and 10 nmol/l DCT were projected on this LD scaling vector. Figure 4A

gives an overview of the drug concentration dependent class affinities. Here, the distribution of the scalar product of each Raman spectrum with the calculated LD vector is shown (LD value). Overall, the LDA analysis reveals that the highest cell response occurs after a treatment with DCT concentrations between 7.5 and 10 nmol/l showing that the lowest concentration that is detection limit where the influence of DCT on the MCF-7 Raman spectra is still visible lies at a DCT concentration of 7.5 nmol/l. In Fig. 4B, the LD value (e.g. the inner product of every spectrum with the LDA value) is plotted against the drug concentration on a logarithmic scale. This LD value can be interpreted as the cell response. The points in Fig. 4B result from the maxima of the histogram in Fig. 4A for every DCT concentration. The arrangement of the values suggests a sigmoidal trend, which confirms studies about the dose-effect relationship by Jodrell et al. [58] and Jakobsen et al. [59]. These findings indicate, that even low DCT concentrations of 7.5 nmol/l induce chemical alterations in MCF-7 cells.

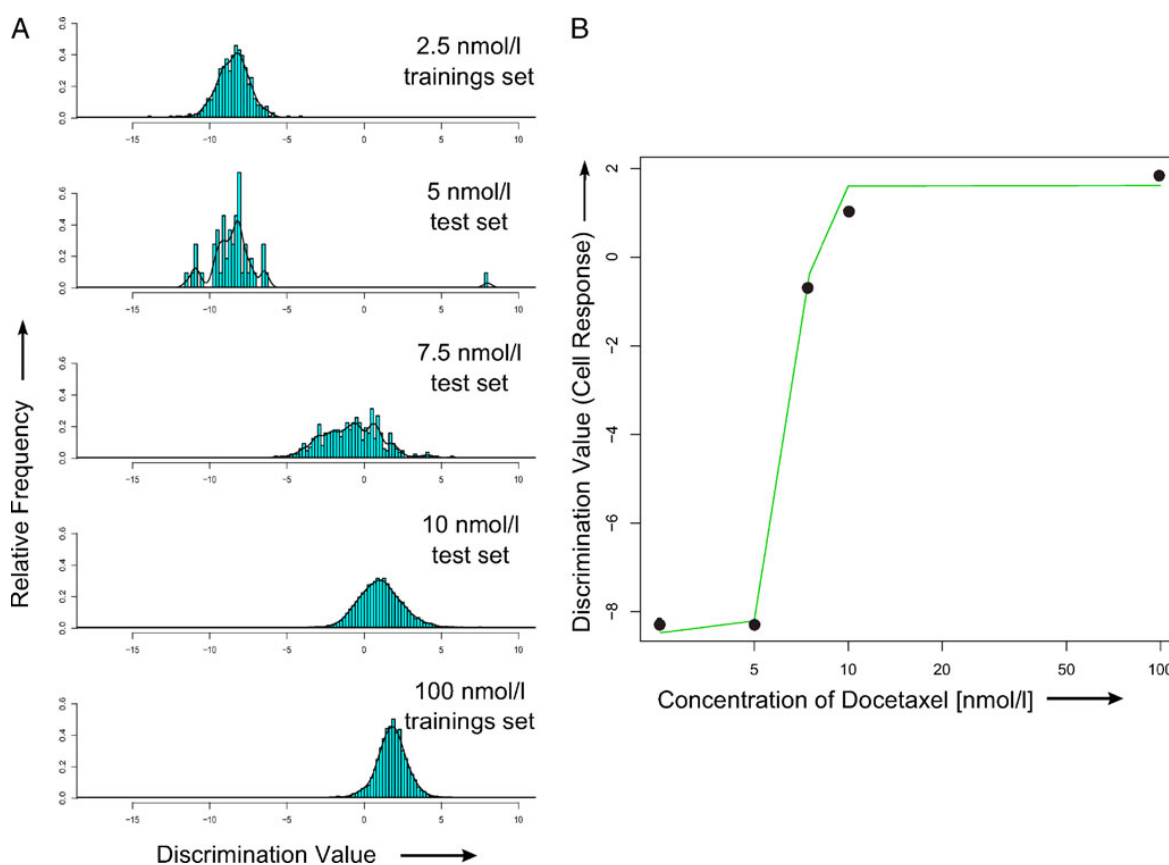


Fig. 4 (A) LDA classification of Raman data of various DCT treatments. The histogram of the LD value (scalar product) of all five DCT concentrations is given. With the lowest and highest concentration, the LDA model was trained and all spectra were projected on the LDA model. (B)

The dose-effect relationship, as a function of the logarithmically DCT concentration, is visualized. The LD-value can be interpreted as cell response for DCT treatment and shows a sigmoidal trend, which can be utilized for determining the spectral detection limit

Conclusion

We investigated DCT induced effects on a breast cancer model system (MCF-7) by means of Raman microspectroscopy in combination with powerful chemometrical methods. DCT induces nucleus fragmentation at the beginning of the effect chain. Therefore, we visualized the morphology of cell organelles, e.g. the cell nucleus by applying *k*-means cluster analysis and an ANN. The ANN generated images are highly correlating with the DNA/RNA content. The in that way generated Raman images highlighted DCT induced morphological alterations in the nuclei structure, caused by the drug induced depolymerisation of microtubules during mitosis. These images based on Raman spectra were validated with the histopathologic gold standard method, the H&E staining. Overall, both Raman imaging analysing methods (*k*-means clustering and ANN) were capable of visualization the cell morphology.

By using a LDA with the preselected nuclei spectra, it was possible to differentiate between treated and untreated MCF-7 cells with an accuracy of 99.2%. Thereby, Raman mean spectra of DCT treated and untreated cells show significant differences at 785 cm^{-1} , which can be assigned to a DNA/RNA vibration, and the amide I peak at $1,658\text{ cm}^{-1}$ due to the DCT induced fragmentation of the nuclei. DCT treatments with concentrations lower than 10 nmol/l (2.5, 5 and 7.5 nmol/l) were implemented additionally to achieve quantitative results about the efficiency of DCT by applying a LDA analysis. A drug concentration of 7.5 nM was indicated as the detection limit of monitoring spectral changes in Raman spectra of treated MCF-7 cells.

In the present contribution, it was shown that the analysis of cellular Raman spectra by means of modern chemometric approaches is capable of monitoring the impact of cytostatic agents. The effect of a drug on the cell morphology can be visualized and the spectral differences between treated and untreated cells can be calculated. With the help of the visualization and detection of the effect of chemotherapeutic drugs it could be possible to monitor the ongoing chemotherapy. This could be achieved by applying the presented methodology on real patient cell samples. In that way, the process and the benefit of an ongoing chemotherapy would be determined in an objective manner. Therefore an individualized medicine with Raman spectroscopy as control tool seems reasonable. The above presented results can be used in another way. If quantum mechanical calculations (based on DFT calculations or in the Hartree–Fock regime) [60, 61] of DCT, microtubules and the respective motor proteins are carried out, a deeper understanding of the work mechanism of DCT can be obtained. This workflow is outlined in [62, 63]. Nevertheless, the quantum mechanical calculations have to be optimized for the application to huge proteins and cell structures. This is an emerging field, which in

combination with experimental data, like presented above, would enhance our understanding of the bio-chemical processes inside of cells and the their interaction with drugs.

Acknowledgements The authors gratefully thank Ms. Cornelia Jörke from the Department of Hematology and Oncology in Jena for the preparation of the cell samples and Michael Schmitt from the Institute of Physical Chemistry, University of Jena, for useful comments and suggestions for improving the manuscript. The funding of the research project “Exprimage” (FKZ 13N9364) within the framework “Biophotonik” and “Markerfreie Zelldiagnostik mit Nanometerauflösung” (0312032B) from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) is gratefully acknowledged.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D (2008) GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase no. 10 <http://globocan.iarc.fr>
2. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J (2001) Trends Mol Med 7:201–204
3. Sargent J, Taylor C (1989) Br J Cancer 60:206–210
4. Nagourney RA (2006) Curr Treat Options Oncol 7:103–110
5. Møllgaard L, Tidéfelt U, Sundman-Engberg B, Lofgren C, Paul C (2000) Leuk Res 24:445–452
6. Miller ML, Ojima I (2001) Chem Rec 1:195–211
7. Radaideh SM, Sledge GW (2008) Breast Cancer Res Treat 111:203–208
8. Bissery MC, Guenard D, Gueritte-Voegelien F, Lavelle F (1991) Cancer Res 51:4845–4852
9. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ (2005) Mol Cancer Ther 10:1495–1504
10. Hernández-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G (2007) Cell Cycle 6:780–783
11. Creane M, Seymour CB, Colucci S, Mothersill C (1999) Int J Radiat Biol 75:731–737
12. Blajeski AL, Kottke TJ, Kaufmann SH (2001) Exp Cell Res 270:277–288
13. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L (1996) Cancer Res 56:816–825
14. Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman A (1994) Cell Growth Differ 5:983–993
15. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Nature 381:713–716
16. Hernández-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G (2007) Oncogene 26:2902–2913
17. Rösch P, Harz M, Schmitt M, Popp J (2005) J Raman Spectrosc 36:377–379
18. Neugebauer U, Bocklitz T, Clement JH, Krafft C, Popp J (2010) Analyst 135:3178–3182
19. Harz M, Kiehntopf M, Stoeckel S, Roesch P, Deufel T, Popp J (2008) Analyst (Cambridge, UK) 133:1416–1423
20. Nottingher I, Verrier S, Haque S, Polak JM, Hench LL (2003) Biopolymers 72:230–240
21. Krishna CM, Sockalingum GD, Kegelaer G, Rubin S, Kartha VB, Manfait M (2005) Vib Spectrosc 38:95–100
22. Krause M, Rösch P, Radt B, Popp J (2008) Anal Chem 80:8568–8575

23. Schmid U, Rösch P, Krause M, Harz M, Popp J, Baumann K (2009) *Chemom Intell Lab Syst* 96:159–171
24. Krause M, Radt B, Rösch P, Popp J (2007) *J Raman Spectrosc* 38:369–372
25. Gaus K, Rösch P, Petry R, Peschke KD, Ronneberger O, Burkhardt H, Baumann K, Popp J (2006) *Biopolymers* 82:286–290
26. Harz M, Kiehntopf M, Stöckel S, Rösch P, Straube E, Deufel T, Popp J (2009) *J Biophoton* 2:70–80
27. Hermelink A, Brauer A, Lasch P, Naumann D (2009) *Analyst* (Cambridge, U K) 134:1149–1153
28. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, Puppels GJ (2002) *J Microbiol Methods* 51:255–271
29. Cialla D, Deckert-Gaudig T, Budich C, Laue M, Möller R, Naumann D, Deckert V, Popp J (2009) *J Raman Spectrosc* 40:240–243
30. Krafft C, Dietzek B, Popp J (2009) *Analyst* 134:1046–1057
31. Vogler N, Meyer T, Akimov D, Latka I, Krafft C, Bendsoe N, Svanberg K, Dietzek B, Popp J (2010) *J Biophoton* 3:728–736
32. Bocklitz T, Putsche M, Stüber C, Käs J, Niendorf A, Rösch P, Popp J (2009) *J Raman Spectrosc* 40:1759–1765
33. Kneipp J, Bakker Schut T, Kliffen M, Menke-Pluijmers M, Puppels G (2003) *Vib Spectrosc* 32:67–74
34. Harz M, Kiehntopf M, Stöckel S, Rösch P, Deufel T, Popp J (2007) *Analyst* 133:1416–1423
35. Notingher I, Jell G, Lohbauer U, Salih V, Hench LL (2004) *J Cell Biochem* 92:1180–1192
36. Taleb A, Diamond J, McGarvey JJ, Beattie JR, Toland C, Hamilton PW (2006) *J Phys Chem B* 110:19625–19631
37. Hedegaard M, Matthäus C, Hassing S, Krafft C, Diem M, Popp J (2011) *Theor Chem Acc* 130:1249–1260
38. Lasch P, Boese M, Pacifico A, Diem M (2002) *Vib Spectrosc* 28:147–157
39. Buckmaster R, Asphahani F, Thein M, Xub J, Zhang M (2009) *Analyst* 134:1440–1446
40. Zoladek A, Pascut FC, Patel P, Notingher I (2011) *J Raman Spectrosc* 42:251–258
41. Okada M, Smith NI, Palonpon AF, Endo H, Kawata S, Sodeoka M, Fujita K (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109:28–32
42. Manfait M, Alix AJ, Jeannesson P, Jardillier JC, Theophanides T (1982) *Nucleic Acids Res* 10:3803–3816
43. Moritz TJ, Taylor DS, Krol DM, Fritch J, Chan JW (2010) *Biomed Opt Express* 1:1138–1147
44. Yan Q, Priebe W, Chaires JB, Czernuszewicz RS (1997) *Biospectroscopy* 3:307–316
45. El-Said WA, Kim TH, Kim H, Choi JW (2011) *Biosens Bioelectron* 26:1486–1492
46. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) *J Natl Cancer Inst* 51:1409–1416
47. Humphreys TR, Nemeth A, McCrevey S, Baer SC, Goldberg LH (1996) *Dermatol Surg* 22:693–697
48. Lüllmann-Rauch R (2006) *Taschenlehrbuch Histologie* Georg Thieme Verlag, Stuttgart
49. Sigma-Aldrich (2003) *Mayers Hämatoxylin-Lösung Verfahrens Nr. MHS AR-MED Ltd.*
50. Baia L, Gigant K, Posset U, Petry R, Schottner G, Kiefer W, Popp J (2002) *Vib Spectrosc* 29:245–249
51. R Development Core Team (2007) *R: a language and environment for statistical computing* R foundation for statistical computing Vienna, Austria
52. Lieber CA, Mahadevan-Jansen A (2003) *Appl Spectrosc* 57:1363–1367
53. Ding C, He X (2004) In: *Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning*
54. Fisher RA (1936) *Annals Eugen* 7:179–188
55. Kohavi R (1995) In: *Proceedings of the International Joint Conference on Artificial Intelligence* Morgan Kaufmann 1137–1143
56. Notingher I, Hench LL (2006) *Expert Rev Med Devices* 3:215–234
57. Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RHW, Salzer R (2003) *Vib Spectrosc* 32:75–83
58. Jodrell DI, Egorin MJ, Canetta RM, Langenberg P, Goldbloom EP, Burroughs JN, Goodlow JL, Tan S, Wiltshaw E (1992) *J Clin Oncol* 10:520–528
59. Jakobsen A, Mortensen LS (1997) *Acta Oncol* 36:375–381
60. Frauenheim T, Seifert G, Elstner M, Niehaus T, Köhler C, Amkreutz M, Sternberg M, Hajnal Z, Carlo A, Suhai S (2002) *J Phys Condens Matter* 14:3015
61. Han W, Jalkanen K, Elstner M, Suhai S (1998) *J Phys Chem B* 102:2587–2602
62. March N, Matthai C (2010) *Theor Chem Acc* 125:193–201
63. Piva J, Silva J, Raniero L, Martin A, Bohr H, Jalkanen K (2011) *Theor Chem Acc* 130:1261–1273

2.3 Electronic Supplementary Material. [MBP2]

**A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman
microspectroscopy.**

K. Hartmann, M. Becker-Putsche, T. Bocklitz, K. Pachmann, A. Niendorf, P. Rösch,
J. Popp

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012, 403, 745-753.

Analytical and Bioanalytical Chemistry**Electronic Supplementary Material****A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy**

Katharina Hartmann, Melanie Becker-Putsche, Thomas Bocklitz, Katharina Pachmann,
Axel Niendorf, Petra Rösch and Jürgen Popp

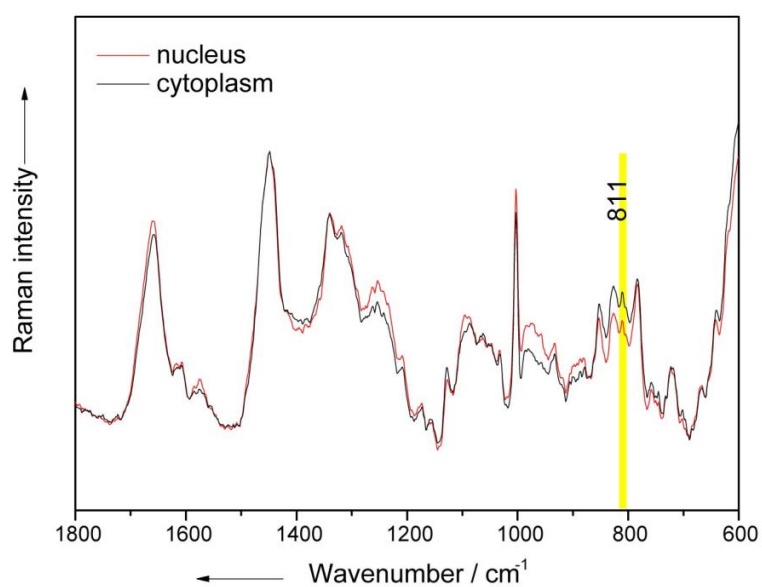


Figure S1: Raman spectra of cytoplasm (black) and nucleus (red). Significant Raman band at 811 cm^{-1} assigned to the vibration of the sugar-phosphate backbone of the RNA [56] is clearly visible in both spectra. Therefore, the presence of extra nuclear RNA is probable in the nucleus as well as in the cytoplasm.

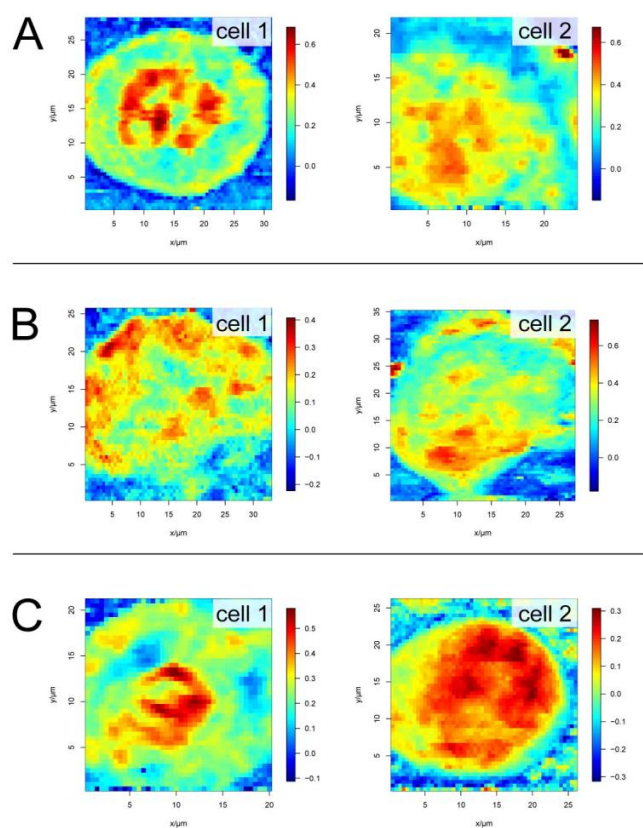


Figure S2: Chemical maps of the DNA/ RNA computation of MCF-7 cells by using ANN analysis are given. The cells were exposed to equal DCT concentration of 100 nmol/l for various exposure times: (A) 24 h, (B) 48 h and (C) 24 + 24 h. While almost all cells treated with 100 nmol/l show a fragmented nucleus, the second cell in C do not. This is probably caused by an individual behavior and the non-synchronized cell cycles of the cells

2.4 Toward improving fine needle aspiration cytology by applying Raman microspectroscopy. [MBP3]

M. Becker-Putsche, T. Bocklitz, J. Clement, P. Rösch, J. Popp

Journal of Biomedical Optics 2013, 18, 047001-1 - 047001-7.

Autorenschaft der Publikation

Melanie Becker-Putsche	Raman-Messungen, Auswertung und Interpretation, Manuskripterstellung
Thomas Bocklitz	Auswertung der Datensätze, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Joachim Clement	Anziehen und Preparation der Zellen
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion, Diskussion und Korrektur des Manuskript
Jürgen Popp	Projektleitung, Konzept- und Ergebnisdiskussion, Korrektur des Manuskript

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von *SPIE*. Reprinted with kind permission from *SPIE*.

Journal of Biomedical Optics

SPIEDigitalLibrary.org/jbo

Toward improving fine needle aspiration cytology by applying Raman microspectroscopy

Melanie Becker-Putsche
Thomas Bocklitz
Joachim Clement
Petra Rösch
Jürgen Popp

Toward improving fine needle aspiration cytology by applying Raman microspectroscopy

Melanie Becker-Putsche,^a Thomas Bocklitz,^a Joachim Clement,^b Petra Rösch,^a and Jürgen Popp^{a,c}

^aUniversity of Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany

^bUniversity Hospital Jena, Department of Hematology and Oncology, Clinic for Internal Medicine II, Erlanger Allee 101, 07740 Jena, Germany

^cInstitute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany

Abstract. Medical diagnosis of biopsies performed by fine needle aspiration has to be very reliable. Therefore, pathologists/cytologists need additional biochemical information on single cancer cells for an accurate diagnosis. Accordingly, we applied three different classification models for discriminating various features of six breast cancer cell lines by analyzing Raman microspectroscopic data. The statistical evaluations are implemented by linear discriminant analysis (LDA) and support vector machines (SVM). For the first model, a total of 61,580 Raman spectra from 110 single cells are discriminated at the cell-line level with an accuracy of 99.52% using an SVM. The LDA classification based on Raman data achieved an accuracy of 94.04% by discriminating cell lines by their origin (solid tumor versus pleural effusion). In the third model, Raman cell spectra are classified by their cancer subtypes. LDA results show an accuracy of 97.45% and specificities of 97.78%, 99.11%, and 98.97% for the subtypes basal-like, HER2 + /ER-, and luminal, respectively. These subtypes are confirmed by gene expression patterns, which are important prognostic features in diagnosis. This work shows the applicability of Raman spectroscopy and statistical data handling in analyzing cancer-relevant biochemical information for advanced medical diagnosis on the single-cell level. © 2013 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) [DOI: 10.1117/1.JBO.18.4.047001]

Keywords: Raman microspectroscopy; breast cancer cell line; classification; fine needle aspiration; breast cancer subtypes.

Paper 12770RR received Dec. 4, 2012; revised manuscript received Mar. 7, 2013; accepted for publication Mar. 7, 2013; published online Apr. 1, 2013.

1 Introduction

With 1.3 million new cases and 458,000 deaths worldwide in 2008, breast cancer is one of the most common cancer in females.¹ Increasing incidences of male breast cancer² should not be underestimated, with about 13,000 new cases worldwide annually.³ Hence, the very early detection and quick sampling of palpable breast masses combined with an unambiguous medical diagnosis is of utmost importance to reduce mortality rates of breast cancer patients. Conventional diagnostic techniques for tissue and cell collection are surgically implemented biopsy, punch biopsy, and fine needle aspiration biopsy (FNAB), followed by extensive cytological evaluation. In comparison to punch biopsies, FNAB is known to be a minimally invasive, very fast,^{4,5} and cost-effective technique,⁴⁻⁶ accompanied by a low traumatization of breast tissue because of the very small needle diameter.

Rosa⁴ has outlined developments in cell collection techniques from 1847 to date. She mentioned that needles with a smaller diameter (improved from 18-gauge to 22-gauge needles) were employed, and the experience of clinicians and pathologists is increased. Further, cytological examinations were advanced by sophisticated staining techniques. Hence, the increasing diagnostic accuracy has a large share in today's popularity of FNAB. At this point it is necessary to mention that the rates of patients with false-positive results who undergo a biopsy after 10 mammograms or 10 clinical breast examinations are enormous, with 18.6% and 6.2%, respectively.⁷

Ariga et al.⁸ illustrated the precision in estimating palpable breast lesions by means of FNAB without image guidance. They accomplished examinations of 1158 fine-needle aspirates over almost 20 years. Here, malignant FNA results have been diagnosed with an accuracy of 99%. The otherwise suspicious FNA results needed to be examined by adjuvant clinical diagnostic techniques because they bear ambiguous features, which complicate an accurate diagnosis by pathologists and cytologists.

Also, Alkuwari et al.⁹ described FNA as a sensitive and specific method for detecting breast cancer metastasis. In all 115 cases of axillary lymph node FNAs, they achieved an overall sensitivity of 65%, and the specificity was 100%.

Further studies by Mansoor and Jamal¹⁰ in 2002 achieved an overall diagnostic accuracy of 93% on 72 FNA cytologies. They compared their results with 27 other studies between 1975 and 2002, and revealed diagnostic results of malignancy for FNAs with sensitivities between 66% and 100%, and specificities between 82% and 99%.

A recent study⁶ worked out that the differences in grading results of palpable breast lesions applying FNAB or core-needle biopsy (CNB) with image guidance are comparably low, with an accuracy of 96% for both cases. They have achieved sensitivities of 89% and 100% for FNAB and CNB, respectively, while the specificity for FNAB and CNB accounted for 98% and 90%, respectively.

All these studies demonstrate that there is a broad range of sensitivities and specificities for diagnostic FNA results. Suspicious FNAs are also commonly occurring because of unavoidable limitations of FNA, like a limited cellular amount of the tumor and problems during histological examination.¹⁰

Address all correspondence to: Jürgen Popp, University of Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany, and Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany. Tel: +49 3641 948320; Fax: +49 3641 948302; E-mail: Juergen.Popp@uni-jena.de

Becker-Putsche et al.: Toward improving fine needle aspiration cytology...

Here, it is complicated to obtain an accurate differentiation between malignant and benign breast lesions. Accordingly, the diagnosis of suspicious FNAs requires additional and cost-intensive surgical biopsies⁵ to clarify the breast lesions. These facts imply that the diagnostic accuracy is extremely dependent on the clinician's experience taking samples and the expert knowledge of pathologists and cytologists. Hence, improving diagnostic techniques associated with higher diagnostic accuracy would make such additional surgical operations dispensable. Biochemical information on the molecular level of protein, lipid, and nucleic acid structures¹¹ would enhance the cytologist's and pathologist's knowledge on breast cancer lesions.

Aside from commonly used staining techniques like hematoxylin and eosin stain, papanicolaou stain, or May-Grunwald Giemsa stain, Raman microspectroscopy is a valuable technique for collecting supplementary biochemical information without staining. Raman microspectroscopy is a noninvasive and label-free technique that enables the investigation of biological systems, e.g., eukaryotic¹² and prokaryotic cells.^{13–15} Hence, Raman spectra can be recorded from single cells just after FNAB because only a minimal sample preparation is needed, and Raman signals are unimpaired by aqueous ingredients. This fact allows a following application of cytological staining techniques on the same sample. The combination of chemometric evaluation methods and Raman spectroscopy has been successfully applied for bacterial identification^{16–18} and differentiation of benign and malignant cells.^{11,19–21} Already, in 1995, Frank et al.²² characterized pathological alterations in breast tissue by applying Raman spectroscopy. They highlighted the diagnostic potential of the biochemical information provided by Raman spectra. Thereupon, Haka et al.²³ studied an algorithm that describes precise chemical alterations that are associated with breast diseases. They emphasized that the biochemical information based on the contribution of lipid and collagen are diagnostically relevant. Accordingly, the results showed an increased amount of collagen in pathological tissues, whereas normal tissue reveals a larger amount of fat. The FT-Raman spectroscopic investigations on normal and tumoral human breast tissue by Bitar et al.²⁴ also demonstrated that Raman spectra provide diagnostically relevant information. They distinguished between normal tissue and six pathological subtypes of breast tissue by utilizing the biochemical Raman information on the lipid content, alterations in the collagen amount, and variations in the DNA content. Further studies by Moreno et al.²⁵ achieved a correct identification of pathologically altered tissues with 98.5% accuracy by using principal component analyses. For instance, they found different amounts of phenylalanine in normal tissue compared to altered tissue. Kelly et al.²⁶ already mentioned the potential of biospectroscopic tools like IR spectroscopy and Raman spectroscopy combined with multivariate analysis for supporting the diagnosis of FNA.

In this contribution, we are aiming to improve cancer diagnosis of FNAB with very poor cellular amounts of breast tumors in order to avoid insufficient diagnostic results. Therefore, Raman microspectroscopy is utilized to study six breast cancer cell lines (MCF-7, JIMT-1, T47-D, MT-3, BT-20, and HCC-1143) on a single-cell level. Here, chemometric evaluation procedures are implemented to establish classification models for the obtained Raman data. We used an SVM to discriminate between the different breast cancer cell lines. To classify

based on the origin of extraction and on the grade of the breast cancer subtypes, we used LDA.

2 Materials and Methods

2.1 Cell Cultures and Preparation

The cell lines MT-3, MCF-7, BT-20, T47-D, JIMT-1, and HCC-1143 were obtained from the Department of Hematology and Oncology at Jena University Hospital, Germany. BT-20, MCF-7, and JIMT-1 were grown in 90% Dulbecco's modified eagle medium (Dulbecco's MEM, cell culture medium) with 10% fetal calf serum (FCS). MT-3 and T47-D were grown in 90% Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 with 10% FCS. HCC-1143 was grown in 80% RPMI 1640 with 20% FCS.

Cells were cultivated in cell culture flasks with an optimal incubation temperature of 37°C and a constant humidified atmosphere (90% humidity) of 5% carbon dioxide (CO₂) in air. After cultivation in cell culture flasks, cells were removed from the flasks surface by applying trypsin. The resuspended cells were then cultivated on fused silica slides (Frank Optic Products GmbH, Germany) in petri dishes. For Raman analysis, fused silica slides were removed from culture media and air-dried.

2.2 Raman Microspectroscopy

Raman measurements were carried out using the confocal Raman microscope (CRM),²⁷ CRM 300 (WITec, Germany). The output of a 785-nm diode laser was focused with a 50× numerical aperture (NA) 0.95 objective (Zeiss, Germany) onto the sample. The back-scattered light was spectrally dispersed with a monochromator of 300-mm focus length and equipped with 600 lines/mm grating. An electron multiplying charge-coupled device (EM-CCD) camera with 1024 × 128 pixels cooled down to –75°C was used for detection.

The scan mode was carried out for single cell measurements, where a given number of line scans with a given number of points was performed. The number of lines and points were chosen to achieve a step size of 0.5 μm. An acquisition time of 10 s and a laser power of about 50 mW on the sample was applied for each spectrum.

Raman data from two independently cultivated batches were recorded at different times. The first data set comprised single cell maps of complete cells including cell-free areas. Here, for each cell map, a rectangular grid with approximately 50 × 70 points was defined covering the spherically formed sample (single cell). For the second data set, one complete cell map and a large amount of small Raman cell maps were recorded. These small Raman cell maps were collected in the middle of the cell with a square base of 10 × 10 points. This measurement method was chosen to keep the measurement time for a single cell sufficiently short. Accordingly, approximately 15 cells were measured in the same amount of time (approximately 12 h), which allowed us a better insight into the cell-line diversity by studying more Raman data.

2.3 Chemometric Evaluation

The spectral analysis of Raman spectra starts with a preprocessing routine, which corrects various corrupting effects, like fluorescence phenomena, CCD baselines, noise, and cosmic spikes. First, all spikes are removed from the scans with the upper bound method,²⁸ and a wavenumber calibration is performed.²⁹ Thereafter, a polynomial of degree five is subtracted³⁰ in order to

reduce the influence of fluorescence from the sample. At the end of the preprocessing procedure, a principal component analysis (PCA)³¹ was implemented by doing singular value decomposition (SVD) on the covariance matrix. The number of principal components (PCs) was determined by prestudies.^{11,32} The optimal number of PCs depends on the classifier and number of classes. Therefore, 20 scores with 99.42% variance were used for analysis by the SVM with six classes (breast cancer cell lines). Thirty scores with 99.57% variance were utilized for evaluation by LDA of the cell line origin with two classes. Fifty scores with 99.72% variance were determined for the LDA of the cancer subtypes (three classes).

Before starting final data analysis techniques, a further preselection of Raman spectra was necessary, since Raman data of single cell measurements (cell scans) contain Raman spectra with substrate as well as Raman spectra with vibrational (i.e., molecular) information of measured cancer cells. To achieve a suitable preselection of Raman data, the cell value was evaluated for each Raman spectrum. The cell value defines the amount of biological information, and thus, the applicability of each Raman cell spectrum for investigation.

$$\frac{\max[I(1426 - 1467 \text{ cm}^{-1})]}{\sum_{737-877 \text{ cm}^{-1}} I} > 0.013 \quad (1)$$

In Eq. (1), the maximum peak intensity of the wavenumber region between 1426 and 1467 cm^{-1} , referring to biological information (CH_2), was divided by the sum of all Raman intensities between approximately 737 and 876 cm^{-1} , including Raman signals from DNA (phosphate backbone) and amino acids, as well as fused silica information in background. All Raman spectra exhibiting a larger cell value than 0.013 were assigned as cell Raman spectra, since they present an optimal amount of biologic information. Verification was done by comparing white light images with visualized cell values over the measured area. Thus, the area above the threshold of 0.013 was accordant with the cell shape in white light images. Figure 1 shows the fingerprint region of such mean Raman spectra of all breast cancer cell lines containing a useful amount of biological information. These Raman spectra were then used for further chemometric evaluations.

LDA³³ was utilized to analyze the Raman spectra. Here, classification models were constructed to differentiate the cancer cell line origin as well as the breast cancer subtypes. This is a supervised classification technique, which creates a linear model for separating the data into given classes. For a binary classification task, only two classes exist (group 1 and group 2), and the model can be written with the LD scaling vector \vec{s} by

$$\vec{s} = \Sigma^{-1} \cdot (\vec{\mu}_1 - \vec{\mu}_2). \quad (2)$$

In this equation, $\vec{\mu}_1$ and $\vec{\mu}_2$ stand for both group means, and Σ^{-1} represents the inverse covariance matrix. The dot product of a Raman spectrum S with \vec{s} is called the LD value, and is converted by a threshold to a classification decision. The LD value can be interpreted as a class membership property. In order to evaluate the prediction properties of such a model a leave-one-out cross-validation (LOOCV) was used, and the result is arranged in a matrix called a confusion table.³⁴

Another supervised classification method is the SVM.³⁵ The SVM seeks to construct a hyper-plane, which separates two groups from each other, and the classification function is then

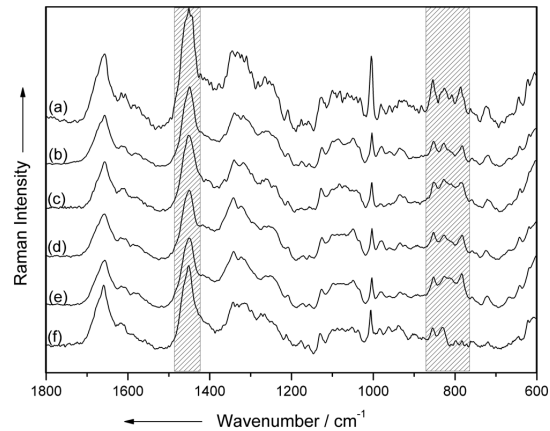


Fig. 1 Selected and preprocessed Raman mean spectra in the fingerprint region of the breast cancer cell lines (a) MCF-7, (b) T47-D, (c) BT-20, (d) HCC-1143, (e) JIMT-1, and (f) MT-3. The light-gray highlighted wavenumber regions were chosen for preselecting cancer cell Raman spectra from the complete cell scan data. Therefore, the maximum Raman intensity of the Raman band at approximately 1449 cm^{-1} was divided by the sum of Raman intensities of the wavenumber region between 737 and 876 cm^{-1} . The Raman spectra exhibiting a cell value larger than 0.013 were assigned as Raman spectra containing significant cell information [see Eq. (1)].

$$\text{sgn}\left(\sum_{i=1}^N y_i \cdot \alpha_i \cdot \vec{s}^{(i)} \cdot \vec{S} - b\right). \quad (3)$$

In this equation, $\vec{s}^{(i)}$ are the N -support vectors, y_i are their class values, and α_i are weights. A new Raman spectrum S is then classified to the group -1 or $+1$ depending of the sign of the equation above. This large margin classifier is implemented using the library, libSVM. The parameters cost = 1 and gamma = 1/number of spectra³⁶ were used. These are the default parameters from the libSVM library and can be further optimized. The SVM builds up a multiclass classifier by the one-against-one scheme. In doing so, a binary SVM was constructed for each breast cancer cell line combination, and voting based on the prediction for each binary SVM provides the results for cell line classification. Accordingly, an SVM based on the one-against-one scheme is more suitable over other schemes for classification tasks on several groups. Therefore, SVM was utilized for the classification of the cell lines itself. For the evaluation of prediction properties of the SVM, a 10-fold cross-validation was used, where the results are demonstrated in a confusion table.

3 Results and Discussion

Single cell measurements were performed on a Raman micro-spectroscopic setup with an excitation wavelength of 785 nm, and Raman maps were generated using a linear scanning mode. Altogether, 110 Raman cell maps were collected. These maps include 19, 23, 26, 16, 5, and 19 single cell maps of the breast cancer cell lines BT-20, HCC-1143, JIMT-1, MCF-7, MT-3, and T47-D, respectively.

After a preselection based on the calculated cell value as mentioned in Sec. 2, a total of 61,580 Raman cell spectra (correlating with 65.7% of all Raman data) were finally evaluated. The enormous data volume, and the crucial but often minute

Becker-Putsche et al.: Toward improving fine needle aspiration cytology...

Table 1 Confusion table with classification results for six breast cancer cell lines, T47-D, MT-3, MCF-7, JIMT-1, HCC-1143, and BT-20, generated by SVM plus corresponding specificities and sensitivities.

True labels	Predicted labels						Sensitivity (%)
	T47-D	MT-3	MCF-7	JIMT-1	HCC-1143	BT-20	
T47-D	13205	1	0	39	15	1	99.58
MT-3	0	8246	0	0	1	0	99.98
MCF-7	2	0	4362	0	5	80	98.05
JIMT-1	38	1	0	12952	45	3	99.33
HCC-1143	9	0	0	21	11762	1	99.74
BT-20	7	0	25	0	4	10763	99.67
Specificity	99.96%	99.99%	99.96%	99.88%	99.86%	99.83%	

spectral differences in Raman spectra of cancer cells, requires a statistically based data processing method.

Figure 1 shows selected Raman mean spectra in the fingerprint region of all breast cancer cell lines, demonstrating the impossibility to distinguish such small spectral differences for several thousand Raman spectra by eye. Thus, we used supervised classification methods like SVM and LDA for data evaluation. The classifier SVM with the one-against-one voting scheme was used for a stable evaluation of multiclass problems, while the LDA was used for tasks with only few group members.

In this contribution, a classification model was created for discriminating all Raman cell spectra by their breast cancer cell line through application of SVM. Table 1 shows the SVM results for all Raman cell spectra. This classification model revealed an almost exact separation of all Raman data, with an overall accuracy of 99.52%. Thus, the classification model achieved specificities (true-negative rate) of 99.96%, 99.99%, 99.96%, 99.88%, 99.86%, and 99.83% for breast cancer cell lines T47-D, MT-3, MCF-7, JIMT-1, HCC-1143, and BT-20, respectively. Also, the sensitivities (true-positive rate) are between 98.05% and 99.98% for cell lines MT-3 and MCF-7, respectively. An additional correction of the internal correlation within the Raman cell scans was implemented. In doing so, we studied the influence of similar Raman spectra within one cell scan on the overall classification capability of the model. Here, the SVM yields an accuracy of 97.22%, which is in the range of the result obtained from the correction-free model. We refrained from using this computationally expensive correction technique in further calculations, since this evaluation allows only the prediction of single-cell scans (by LOOCV) and not of single Raman spectra.

A further classification model was carried out to separate all Raman cell spectra according to their cell line origin. Here, cell lines MT-3, BT-20, and HCC-1143 had their origin in solid tumors (group "solid tumor"), while cell lines MCF-7, JIMT-1, and T47-D were extracted out of pleural effusions (group "pleural effusion"). For this issue, the supervised classification method LDA was utilized for separating all Raman data by their physiological origin.

Out of a total of 30,839 Raman spectra from the solid tumor group, 28,896 Raman data were assigned correctly and 1943

Raman cell spectra were misclassified. For Raman data from the pleural effusions group, 29,022 Raman spectra were assigned correctly and 1727 Raman data were misclassified out of a total of 30,749 cell spectra.

The LDA model achieved a classification accuracy of 94.04% with specificities of 94.4% and 93.7% for group "solid tumor" and group "pleural effusion," respectively. The separation experiment of various cell lines by their origin achieved no exact classification results for both groups. This can be seen in Fig. 2 as an overlap in the histogram (right-hand side) and in detail in the distribution of the single spectra (left-hand side). An explanation for these results is that the cell lines undergo enormous changes during their establishment and maintenance.

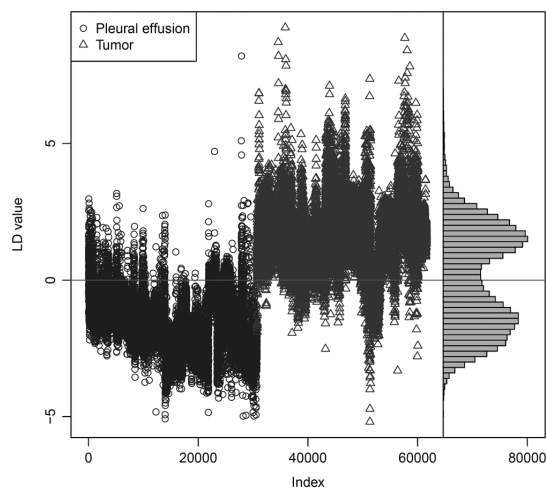


Fig. 2 Linear discriminant analysis (LDA) results for classification of breast cancer cell lines by their origin of extraction (group "pleural effusion" versus group "solid tumor"). The scatter plot and the histogram show the distribution of single Raman spectra for the group "solid tumor" containing Raman data of MT-3, BT-20, and HCC-1143 (triangle) and for the group "pleural effusion" comprising Raman data of MCF-7, JIMT-1, and T47-D (circle).

Becker-Putsche et al.: Toward improving fine needle aspiration cytology...

Table 2 Subtype grading for each breast cancer cell line with corresponding subtype features used for characterization.

Cell line	Subtype	ER	PR	ERBB2/HER2	Source	Tumor type	Reference(s)
MT-3	Basal	-	-	-	Primary tumor	Adenocarcinoma	39-41
BT-20	Basal A	-	-	-	Primary tumor	Adenocarcinoma	37, 42
HCC-1143	Basal A	-	-	-	Primary tumor	Ductal carcinoma	37, 43
MCF-7	Luminal A	+	+	-	Pleural effusion	Metastatic adenocarcinoma	37, 38, 42, 43
T47-D	Luminal A	+	+	-	Pleural effusion	Invasive ductal carcinoma	37, 38, 42, 43
JIMT-1	Her2 + /ER-	-	-	+	Pleural effusion	Ductal carcinoma	44

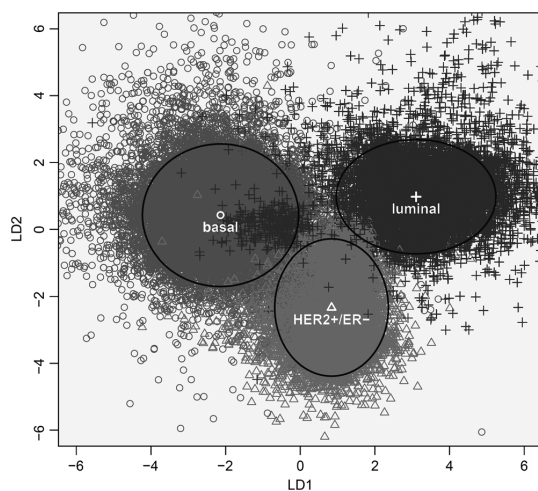


Fig. 3 LDA (linear discriminant analysis) subtype classification results for breast cancer Raman spectra. All Raman data were classified into the groups “basal-like” (circle), “HER2 + /ER-” (triangle), or “luminal” (+). A detailed breast cancer cell line assignment to respective subtypes is given in Table 2.

More interesting than the origin of cell line development is the information on the molecular profiles of each cell line. Accordingly, the cancer cells had been characterized by dominant differences in their gene expression pattern as subtypes namely, basal-like, HER2 + /ER-, and luminal A and B.^{37,38} Such classifications are possible because breast cancer is

established molecularly as a very heterogeneous disease. Especially the markers like estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2/HER2) were used for subtype specification.

Table 2 summarizes molecular information corresponding to distinct subtypes for all breast cancer cell lines used here. Hence, breast cancer cell lines MT-3, BT-20, and HCC-1143 were assigned to the basal-like subtype (group “basal-like”), since their status is negative for ER, PR, and ERBB2/HER2. The luminal A subtype corresponding cell lines are T47-D and MCF-7 (group “luminal”), as their status is positive for ER and PR, while for ERBB2/HER2 the status is negative. The subtype grading for cancer cell line JIMT-1 (group “HER2 + /ER-”) indicates an assignment to HER2 + /ER- subtype, because of a positive ERBB2/HER2 status and a negative status for ER and PR.

A LDA to discriminate Raman cell spectra by their molecular profiles. The scatter plot in Fig. 3 shows the classification result of the LDA. Here, 95.4% of the respective Raman cell spectra for each subtype group were localized within each cluster area marked with a black circle. These data correlate with the double standard deviation (SD) for all Raman data of each subtype group.

Table 3 displays the discrimination result for each Raman spectrum. Consequently, out of a total of 30,839 basal-like subtype Raman spectra, 30,304 were classified correctly into group “basal-like”; 12,461 Raman spectra were assigned correctly into group “HER2 + /ER-” out of a total of 13,039 Raman data for the HER2 + /ER- subtype; and 17,253 out of 17,710 luminal subtype Raman data were accurately classified into group “luminal.” Accordingly, the assignment of Raman cell data into several subtypes achieved a classification accuracy

Table 3 Confusion table with discrimination results for Raman cell spectra separated by their gene expression pattern (breast cancer subtype) plus corresponding specificities and sensitivities.

True labels	Predicted labels			Sensitivity (%)
	Basal-like subtype	HER2 + /ER- subtype	Luminal subtype	
Basal-like subtype	30304	371	164	98.27
HER2 + /ER- subtype	288	12461	290	95.57
Luminal subtype	394	63	17253	97.42
Specificity	97.78%	99.11%	98.97%	

Becker-Putsche et al.: Toward improving fine needle aspiration cytology...

of 97.45%. Here, the sensitivities and specificity are 98.27% and 97.78% for group “basal-like,” 95.57% and 99.11% for group “HER2 + /ER-,” and 97.42% and 98.97% for group “luminal.”

These results demonstrate the high potential of Raman spectroscopy to extract diagnostic relevant information from single cancer cells without the use of time-consuming staining techniques.

4 Conclusions

In conclusion, we showed that the biochemical information in Raman cell spectra allow for classification experiments under various aspects on single breast cancer cells. In this proof-of-principle study, Raman microspectroscopy was combined with multivariate analysis, namely SVM and LDA.

The Raman data of each cell line contain significant biochemical information so that the SVM results exhibited a differentiation between the breast cancer cell lines T47-D, MT-3, MCF-7, JIMT-1, HCC-1143, and BT-20 with an accuracy of 99.51%. Furthermore, all Raman cell spectra were assigned according to their respective origin (solid tumor or pleural effusion) with 94.04% classification accuracy by applying LDA.

A diagnostically relevant step is the differentiation of breast cancer cell lines by their gene expression pattern. Accordingly, LDA revealed a classification accuracy of 97.45% with high specificities of 97.78%, 99.11%, and 98.97% for the discrimination between the breast cancer subtypes basal-like, HER2 + /ER-, and luminal, respectively. These results reveal that biochemical information in Raman cell spectra have a high potential to acquire diagnostically relevant information on single cells. Hence, the application of Raman microspectroscopy combined with chemometric evaluation can omit extensive cytological evaluations, and thus, will improve clinical diagnosis.

In future research, the current data should be enhanced with more breast cancer cell lines as well as patients' samples, because including information on biochemical diversity, e.g., in age, sex, ethnic background, progress of the disease, molecular profiling, diagnosis, and therapy, would optimize the statistical model. Identification experiments on unknown samples are planned in future studies. Exact identification of real samples on the single-cell level by means of Raman microspectroscopy can support pathologists and cytologists in clinical diagnosis on samples with suspicious FNA results.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Cornelia Jörke for the preparation of the cell samples. The funding of the research project Exprimage (FKZ 13N9364) within the framework “Biophotonik” from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) is gratefully acknowledged.

References

- J. Ferlay, D. M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher, “Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008,” *Eur. J. Cancer* **46**(4), 765–781 (2010).
- J. White et al., “Male breast carcinoma: increased awareness needed,” *Breast Cancer Res.* **13**(5), 219–225 (2011).
- V. Speirs, “Not just for women,” *Nature* **485**(7400), S66 (2012).
- M. Rosa, “Fine-needle aspiration biopsy: a historical overview,” *Diagn. Cytopathol.* **36**(11), 773–775 (2008).
- P. D. Britton, “Fine needle aspiration or core biopsy,” *Breast* **8**(1), 1–4 (1999).
- S. Nagar et al., “An analysis of fine needle aspiration versus core needle biopsy in clinically palpable breast lesions: a report on the predictive values and a cost comparison,” *Am. J. Surg.* **204**(2), 193–198 (2012).
- J. G. Elmore et al., “Ten-year risk of false positive screening mammograms and clinical breast examinations,” *New Eng. J. Med.* **338**(16), 1089–1096 (1998).
- R. Ariga et al., “Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation,” *Am. J. Surg.* **184**(5), 410–413 (2002).
- E. Alkuwari and M. Auger, “Accuracy of fine-needle aspiration cytology of axillary lymph nodes in breast cancer patients,” *Cancer Pathol.* **114**, 89–93 (2008).
- I. Mansoor and A. A. Jamal, “Role of fine needle aspiration in diagnosing breast lesions,” *Saudi. Med. J.* **23**(8), 915–920 (2002).
- T. Bocklitz et al., “A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis,” *J. Raman Spectrosc.* **40**(12), 1759–1765 (2009).
- I. Notingher and L. L. Hench, “Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro,” *Expert. Rev. Med. Dev.* **3**(2), 215–234 (2006).
- U. Schmid et al., “Gaussian mixture discriminant analysis for the single-cell differentiation of bacteria using micro-Raman spectroscopy,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **96**(2), 159–171 (2009).
- M. Krause et al., “The investigation of single bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.* **38**(4), 369–372 (2007).
- M. Harz et al., “Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy,” *J. Biophoton.* **2**(1–2), 70–80 (2009).
- A. Walter et al., “Raman spectroscopic detection of physiologic changes in plasmid-bearing *Escherichia coli* with and without antibiotic treatment,” *Anal. Bioanal. Chem.* **400**(9), 2763–2773 (2011).
- S. Meisel et al., “Raman spectroscopy as a potential tool for detection of *Brucella* spp. in milk,” *AEM* **78**(16), 5575–5583 (2012).
- D. F. M. Willems-Erix et al., “Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method,” *JCM* **47**(3), 652–659 (2009).
- R. E. Kast et al., “Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model,” *Biopolymers* **89**(3), 235–241 (2008).
- M. V. P. Chowdary et al., “Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy,” *Biopolymers* **83**(5), 556–569 (2006).
- C. Kendall et al., “Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics,” *Analyst* **134**(6), 1029–1045 (2009).
- C. J. Frank, R. L. McCreery, and D. C. Redd, “Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues,” *Anal. Chem.* **67**(5), 777–83 (1995).
- A. S. Haka et al., “Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy,” *PNAS* **102**(35), 12371–12376 (2005).
- R. A. Bitar et al., “Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy,” *J. Biomed. Opt.* **11**, 054001 (2006).
- M. Moreno et al., “Raman spectroscopy study of breast disease,” *Theor. Chem. Acc.* **125**(3–6), 329–334 (2010).
- J. G. Kelly et al., “A biospectroscopic interrogation of fine needle aspirates points towards segregation between graded categories: an initial study towards diagnostic screening,” *Anal. Bioanal. Chem.* **401**(3), 957–967 (2011).
- L. Baia et al., “Confocal Raman investigations on hybrid polymer coatings,” *Vib. Spectrosc.* **29**(1–2), 245–249 (2002).
- D. Zhang and D. Ben-Amotz, “Removal of cosmic spikes from hyperspectral images using a hybrid upper-bound spectrum method,” *Appl. Spectrosc.* **56**(1), 91–98 (2002).
- T. Dörfer et al., “Checking and improving calibration of Raman spectra using chemometric approaches,” *Zeitschrift Physikal. Chem.* **225**(6–7), 753–764 (2011).
- C. A. Lieber and A. Mahadevan-Jansen, “Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra,” *Appl. Spectrosc.* **57**(11), 1363–1367 (2003).
- K. Pearson, “On lines and planes of closest fit to systems of points in space,” *Philos. Mag.* **2**(11), 559–572 (1901).

Becker-Putsche et al.: Toward improving fine needle aspiration cytology...

32. K. Hartmann et al., "A study of docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy," *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 745–753 (2012).
33. R. A. Fisher, "The use of multiple measurements in taxonomic problems," *Annals Eugen.* **7**(2), 179–188 (1936).
34. W. N. Venables and B. D. Ripley, *Modern Applied Statistics with S*, 4th ed., Springer, New York (2002).
35. O. Ivanciuc, "Application of support vector machines in chemistry," in *Reviews on Computational Chemistry*, K. B. Lipkowitz and T. R. Cundari, Eds., pp. 291–400, Wiley & Sons, Hoboken, NJ (2007).
36. C.-C. Chang and C.-J. Lin, "LIBSVM: a library for support vector machines," *ACM Trans. Intell. Sys. Technol.* **2**, 27:1–27:27 (2011).
37. J. Kao et al., "Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery," *PLoS ONE* **4**(7), e6146 (2009).
38. C. M. Perou et al., "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature* **406**(6797), 747–752 (2000).
39. M. Lacroix and G. Leclercq, "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update," *Breast Cancer Res. Treat.* **83**(3), 249–289 (2004).
40. N. Prang et al., "Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody mt201 against breast cancer cell lines," *Br. J. Cancer* **92**(2), 342–349 (2005).
41. R. J. Hambly et al., "Establishment and characterisation of new cell lines from human breast tumours initially established as tumour xenografts in NMRI nude mice," *Breast Cancer Res. Treat.* **43**(3), 247–258 (1997).
42. L. W. Engel and N. A. Young, "Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review," *Cancer Res.* **38**(11 Pt. 2), 4327–4339 (1978).
43. R. M. Neve et al., "A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes," *Cancer Cell* **10**(6), 515–527 (2006).
44. M. Tanner et al., "Characterization of a novel cell line established from a patient with herceptin-resistant breast cancer," *Mol. Cancer Ther.* **3**(12), 1585–1592 (2004).

Publikationen

Veröffentlichungen

- [MBP1] Thomas Bocklitz, Melanie Putsche, Carsten Stüber, Josef Käs, Axel Niendorf, Petra Rösch, Jürgen Popp, A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis, *Journal of Raman Spectroscopy* 2009, 40, 1759-1765.
- [MBP2] Katharina Hartmann, Melanie Becker-Putsche, Thomas Bocklitz, Katharina Pachmann, Axel Niendorf, Petra Rösch, Jürgen Popp, A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 403, 745-753.
- [MBP3] Melanie Becker-Putsche, Thomas Bocklitz, Joachim Clement, Petra Rösch, Jürgen Popp, Toward improving fine needle aspiration cytology applying Raman microspectroscopy, *Journal of Biomedical Optics* 2013, 18, 047001-1 - 047001-7.

Sonstige Veröffentlichungen

1. Jürgen Popp, Stephan Stöckel, Susann Meisel, Thomas Bocklitz, Wilm Schumacher, Melanie Putsche und Petra Rösch, Raman spectroscopic characterization of single cells, *Proceedings of SPIE* 2010, 7560(Biomedical Vibrational Spectroscopy IV: Advances in Research and Industry), 75600B.

Posterpräsentationen

1. Bocklitz, T.; Putsche, M.; Rösch, P.; Popp, J.: Classification and mapping approaches in biomedical Raman spectroscopy. In: *Photonics 4 Life, Brussels*, 2008.
2. Putsche, M.; Bocklitz, T.; Ramoji, A.; Rösch, P.; Popp, J.: The use of Raman spectroscopy to identify and characterize normal and breast cancer cells. In: *ICORS, London*, 2008.
3. Bocklitz, T.; Putsche, M.; Ramoji, A.; Rösch, P.; Käs, J.; Stüber, C.; Popp, J.: Classification of cells from malignant and benign cell lines with Raman spectroscopy and chemometrics. In: *ANAKON, Berlin*, 2009.
4. Bocklitz, T.; Putsche, M.; Stüber, C.; Käs, J.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Raman spectroscopic investigations on breast cancer cell lines. In: *ECSBM, Palermo*, 2009.

5. Bocklitz, T.; Putsche, M.; Stüber, C.; Käs, J.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Raman spectroscopy and chemometrical analysis for cancer research. In: *International Graduate summer school Biophotonics, Ven, 2009*.
6. Putsche, M.; Bocklitz, T.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Comparative investigations on cultivated breast cancer cell lines by means of Raman spectroscopy. In: *ICAVS, Melbourne, 2009*.
7. Putsche, M.; Bocklitz, T.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Investigations on cultivated breast cancer cell lines by means of Raman spectroscopy. In: *Photonics 4 Life - Scientific meeting, Barcelona, 2009*.
8. Putsche, M.; Bocklitz, T.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Characterization of different cancer cell lines by means of Raman spectroscopy. In: *SPIE Photonics Europe, Brussels, 2010*.
9. Putsche, M.; Hartmann, K.; Bocklitz, T.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Raman spectroscopic investigations of the effect of cytostatic agents on breast cancer cells. In: *2nd Postgraduate Symposium on Cancer Research, Dornburg, 2010*.
10. Putsche, M.; Bocklitz, T.; Hartmann, K.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Einblicke in chemische und molekulare Änderungen therapierter Brustkrebs-Zellen - Raman-spektroskopische Untersuchungen an Einzelzellen (MCF-7 Zellen). In: *2. Symposium Tumor Microenvironment: Bedeutung für Tumorbiologie und Klinik, Jena, 2010*.
11. Putsche, M.; Bocklitz, T.; Hartmann, K.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Raman spectroscopic investigations of the effect of cytostatic agents on breast cancer cells. In: *XXII International Conference on Raman Spectroscopy ICORS, Boston, 2010*.
12. Hartmann, K.; Putsche, M.; Bocklitz, T.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Interactions between Docetaxel and human cancer cells by Raman spectroscopic imaging. In: *13. Frühjahrssymposiums des JungChemikerForums (JCF), Erlangen, 2011*.

Vorträge

Hartmann, K.; Putsche, M.; Bocklitz, T.; Pachmann, K.; Rösch, P.; Popp, J.: Raman microspectroscopic investigations of the interaction between Docetaxel and human breast cancer cells (MCF-7). In: *Espying the Secrets of Cells - Nanosensor/Microscopy Workshop, Dornburg, 2010*.

Danksagung

Im Folgendem möchte ich mich bei allen, die es mir ermöglicht haben, ein so hoch interessantes Thema zu bearbeiten, mich unterstützt haben, mit mir im Team (im Rahmen des BMBF Projektes "Exprimage") gearbeitet haben, mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, nach den kleinsten Fehlern in meiner Dissertation gesucht haben, mich immer wieder ermuntert haben weiter zu machen und immer an meiner Seite gestanden haben, ganz herzlich bedanken.

Lieber Herr Prof. Dr. Jürgen Popp, Dir möchte ich ganz besonders danken, dass Du mir die Möglichkeit gegeben hast eine so zukunftsweisende Technik kennenzulernen und mit dieser große Erfolge in der Brustkrebsforschung zu erzielen.

Für die Betreuung und die angenehme Zusammenarbeit im Rahmen des BMBF Projektes "Exprimage" möchte ich Frau Dr. Petra Rösch ein ganz großes Dankeschön aussprechen.

Dir, lieber apl. Prof. Dr. Michael Schmitt, möchte ich Danke sagen, weil Du zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Probleme hattest.

Im Rahmen des Projektes "Exprimage" möchte ich Dr. Thomas Bocklitz für die chemometrischen Berechnungen der Raman-Daten und Dr. Anuradha Ramoji für die schöne Zusammenarbeit danken.

Zum Glück war da Frau Cornelia Jörke, die sich Zeit genommen hat, mich mit Zellproben zu versorgen. Danke. In diesem Zusammenhang bin ich auch Frau Prof. Dr. Katharina Pachmann und dem Laborleiter Herrn Dr. Joachim Clement aus der Klinik für Innere Medizin II Abt. für Hämatologie und internistische Onkologie zu Dank verpflichtet.

Danke auch an Dr. Dana Cialla und Dr. Katharina Strelau für die Einweisung und die Unterstützung bei der Lösung kleiner Probleme beim Messen am Raman-Mikroskop CRM 300 von WITec.

Dipl.-Troph. Anja Silge möchte ich für den Austausch und die Teilhabe an ihren Erfahrungen in der Zellkultur danken. Mit Deiner Hilfe und den Tipps von Dipl.-Chem. Bettina Rudolph konnte ich ein Zelllabor aufbauen. Für die Einführung in die Zellkultivierung möchte ich Dr. Marc Richter Danke sagen. Dir und Dr. Christian Matthäus möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit in unserem Zelllabor danken.

Für die liebe Unterstützung, die organisatorische Leistung und Erfüllung so einiger Wünsche danke ich Gisela Zeise, Marion Krause und Antje Raabe aus dem Sekretariat des IPCs.

Auch dem gesamten Team der Lessignstraße 10, im Speziellen Herrn Ralf Gause und Herrn Wolfgang Fähndrich bei der Einrichtung des Zelllabores, Frau Dipl.-Chem. Ute Backhaus bei der Unterstützung im Praktikum und Anna Schmidt für Ihre Zuverlässigkeit bei den Chemikalienbestellungen, möchte ich danken.

Für die schöne Zeit am Mittagstisch, den anstrengenden aber interessanten Touren durch die wunderschönen Städte der Welt in den anschließenden Urlaubswochen nach

den Tagungen und natürlich für die aufschlussreichen Gespräche während der Konferenzen danke ich Dipl.-Ing. (FH) Susann Meisel, Dr. Stephanie Tschierlei, Dr. Stephan Stöckel, Dr. Valerian Ciobotta, Dr. Anuradha Ramoji und Dipl.-Chem. Michael Kühnert. Lieber Stephan, Dir möchte ich auch dafür Danke sagen, dass Du Dich durch meine Dissertation gekämpft hast.

Für die schöne Zeit im Büro danke ich Dr. Petra Rösch, Dipl.-Biol. Antje Haase für die langen Gespräche und den Spaß, den wir zusammen hatten, Dipl.-Phys. Sonja Höfer und Dr. Nicolae Tarcea. Lieber Nico, Dir danke ich zusätzlich, dass Du Dir die Zeit genommen hast, meine Dissertation Korrektur zu lesen, und darüber hinaus zu interessanten Diskussionen angeregt hast.

Katharina Bräutigam, Dir danke ich für die schöne Zusammenarbeit im Rahmen der Betreuung Deiner Staatsexamensarbeit sowie für die schöne Zeit, die wir mit Susann zusammen in München verbracht haben.

Liebe Susann Meisel, Dir möchte ich auf diesem Weg ganz besonders für die aufbauenden Worte, Deine aufgeschlossene und zuvorkommende Art, dass Du immer zur Diskussion bereit warst und in allem etwas Positives gesehen hast, Danke sagen.

Meinen Eltern Sabine und Peter Putsche danke ich, dass sie mir den Weg bis hierher geebnet haben, mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und meine Euphorie oft mit kritischen Anmerkungen in eine reale Sichtweise umgewandelt haben.

Meiner Oma Ilse Gotthardt danke ich, dass sie noch da ist und miterleben kann, wie ich meinen Lebensweg gehe.

Für die kritische Begutachtung meiner Dissertation und die konstruktiven Anmerkungen danke ich meiner Schwester Isabel Freitag.

Nun komme ich zu meiner kleinen Familie, der ich diese Arbeit gewidmet habe. Danke gebührt meinem lieben Ehemann Michael, der mir immer den Rücken frei gehalten hat, damit ich mich in die Arbeit stürzen konnte und über dessen Witze ich nach jetzt schon 13 Jahren immer noch lachen kann, danken. Meinen beiden kleinen Töchtern Zoe und Phoebe, die mich in den letzten Wochen nach einem anstrengenden Tag am Institut mit einer überschwänglichen Freude begrüßen und mir damit ein wunderbares Gefühl schenken, möchte ich einfach nur Danke sagen. Danke, dass Ihr zu uns auf diese Welt gestoßen seid.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Melanie Becker-Putsche, geb. Putsche
geb. am 05.09.1980 in Apolda
verheiratet, 2 Kinder

SCHULAUSBILDUNG

09/1987 – 09/1991 Grundschule Dr.-Theodor-Neubauerschule Apolda
09/1991 – 06/1999 Gymnasiums Bergschule Apolda
Leistungskurse Deutsch und Biologie
16.07.1997 externer Realschulabschluss an der staatlichen Regelschule Pffif-
felbach
30.06.1999 Allgemeine Hochschulreife

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

10/1999 – 09/2000 rechtswissenschaftliches Studium an der Friedrich-Schiller-
Universität in Jena, abgebrochen
09/2000 – 11/2006 Magisterstudium an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
Hauptfach: Biologie
Nebenfach: biologische Anthropologie
Nebenfach: klassische Archäologie
seit 11/2007 Promotion zur Erlangung des akadem. Grades eines *Doctor*
rerum naturalium am Institut für Physikalische Chemie an der
Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Apolda, 02. September 2013

Selbständigkeitserklärung

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

Jena, den 02. September 2013

Unterschrift