

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR GRENZFLÄCHEN- UND BIOVERFAHRENSTECHNIK IGB

BERICHTE AUS FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG NR. 042

Marieke Pudlas

Nicht invasive Diagnostik in der Regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie

FRAUNHOFER VERLAG

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 042

Nicht invasive Diagnostik in der Regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie

Marieke Pudlas

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Nobelstraße 12 70569 Stuttgart Telefon 0711 970-4000 Telefax 0711 970-4200 E-Mail info@igb.fraunhofer.de URL www.igb.fraunhofer.de

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar. ISBN: 978-3-8396-0396-3

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2012

Druck: Mediendienstleistungen des Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart

Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by FRAUNHOFER VERLAG, 2012

Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart Telefon 07 11 9 70-25 00 Telefax 07 11 9 70-25 08 E-Mail verlag@fraunhofer.de URL http://verlag.fraunhofer.de

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

Nicht invasive Diagnostik in der Regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Marieke Pudlas

aus Geseke

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hirth, Universität Stuttgart Mitberichterin: Prof. Dr. rer. nat. Heike Walles, Universität Würzburg

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2012

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Marieke Pudlas

Danksagung

Danken möchte ich insbesondere **Herrn Prof. Dr. Hirth**, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit am Fraunhofer IGB und am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT) der Universität Stuttgart anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Bei **Frau Prof. Dr. Heike Walles** möchte ich mich für die stete Unterstützung und ihr Vertrauen in mich bedanken. Zudem bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei beiden Personen möchte ich mich speziell dafür bedanken, dass sie mich dabei unterstützt und es mir ermöglicht haben, einen Teil meiner Dissertation in Brisbane, Australien anzufertigen. Ohne diese Unterstützung wäre ich um eine wertvolle Erfahrung ärmer. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank **Prof. Dr. Dietmar Hutmacher** und **Dr. Travis Klein** von der QUT in Brisbane, die mich uneingeschränkt in ihre Abteilung / Gruppe integriert haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Außerdem möchte ich mich bei der Abteilung Zellsysteme des Fraunhofer IGB sowie dem Cartilage Regeneration Laboratory an der QUT für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Dr. Steffen Koch** und **Markus Schandar** für die fachliche Betreuung, die vielen guten Ratschläge und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Kathrin Holz, Miriam Votteler, Sibylle Thude und Dr. Katja Schenke-Layland möchte ich mich für die hilfreichen Tipps und die tatkräftige Unterstützung im Labor sowie für die Hilfe bei der Erstellung sämtlicher schriftlicher Ausarbeitungen bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich dazu ermutigt haben, auch einmal höhere Hürden zu nehmen.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Ehemann **Sascha Pudlas** für seine aufbauenden Worte, wenn mal wieder ein Versuch misslungen war, seinen grenzenlosen Rückhalt und seine unermüdliche Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzung	sverzeichnis	I
Symbolverz	zeichnis	. III
Abbildungs	verzeichnis	V
Tabellenver	zeichnis	. IX
1. Zusam	menfassung	1
2. Einleitu	ing, Motivation und Zielsetzung	5
2.1. Einlei	tung und Motivation	5
2.2. Ziel d	er Arbeit	6
3. Theore	tische Grundlagen und Stand der Technik	8
3.2. Zellul	äre Charakterisierung und Diagnosemethoden	12
3.2.1.	Herkömmliche invasive Analysemethoden	13
3.2.2.	Nicht invasive Methoden	16
3.3. Rama	an-Spektroskopie	19
3.3.1.	Theorie der Raman-Spektroskopie	20
3.3.2.	Techniken der Raman-Spektroskopie	24
3.3.3.	Raman-Spektroskopie an biologischem Material	25
3.4. Multiv	variate Datenanalyse	26
3.4.1.	Theorie der Hauptkomponentenanalyse	26
3.4.2.	Graphische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse	28
3.4.3.	Theorie und graphische Darstellung der Support Vector Machine	29
4. Materia	I und Methoden	33
4.1. Mater	rialien und Geräte	33
4.1.1.	Verwendete Geräte	33
4.1.2.	Verwendete Verbrauchsmaterialen	37
4.1.3.	Verwendete Chemikalien	39
4.1.4.	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen	42
4.1.5.	Verwendetes biologisches Material	47
4.2. Meth		48
4.2.1.	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen	48
4.2.1	1. Porcine Chondrozyten	48
4.2.1	2. Porcine Knochenmarkstammzellen	49
4.2.1		50
4.2.1	4. Humane Fibroblasten	51
4.2.1	5. Humane Keratinozyten	52
4.2.1	.6. Humane my Endotneizellen	53
4.2.1	7. Humane Melanozyten	54
4.2.1	.8. Humaner Gelenkknorpel und Knochen	55
4.2.2.	Kultivierung numaner Zeillinien	55
4.2.3.	Zelizaniung und Vitalitätsbestimmung	50
4.2.4.	Immunzyto- und histologische Farbungen	50
4.2.4	.1. Herstellung von Zytospots und Fixierung von Zellen	50
4.2.4	2. Fixierung und Einbellen von Gewebe	5/ 57
4.2.4	Herstellung von Daraffingebritten	ט/ בס
4.2.4	5 Entroroffiniorung von Deroffinschnitten	00
4.2.4	.5. Entparannierung von Parannischnitten	DQ E0
4.2.4	.o. Durchnung der innnunchemischen Färbung	00 CC
4.2.4	Durchflugezytemetrische Anglygen	00
4.2.3.		02

4.2.6.	In-vitro-Differenzierungsassay	64
4.2.7.	Raman spektroskopische Analysen	65
4.3. Ausv	vertung der Raman-Spektren	66
4.3.1.	Datenvorbehandlung	66
4.3.2.	Hauptkomponentenanalyse	67
4.3.3.	ANOVA und Support Vector Machine	68
5. Ergebi	nisse	69
5.1. Ūnte	rscheidung verschiedener primärer Zelltypen	69
5.1.1.	Hautzellen	69
5.1.2.	Stammzellen	80
5.2. Unte	rscheidung primärer Zellen von Zellen der korrespondierenden Zelli	inie 84
5.2.1.	Hautzellen	85
5.2.2.	Endothelzellen	88
5.2.3.	Chondrozyten	91
6.3. Char	akterisierung von Knorpel und Knochen	93
6.3.1.	Charakterisierung der Chondrozyten	94
6.3.2.	Charakterisierung der extrazellulären Matrix des Knorpels	101
6.3.3.	Charakterisierung der Knochenmatrix	106
6. Diskus	sion der Ergebnisse	110
6.1. Char	akterisierung von Hautzellen	112
6.2. Char	akterisierung von Endothelzellen	116
6.3. Char	akterisierung von Stammzellen	118
6.4. Char	akterisierung von Knorpelgewebe und -zellen	119
6.5. Char	akterisierung von Knochenmatrizen	125
7. Zusam	menfassung und Ausblick	128
8. Literat	urverzeichnis	129
9. Anhan	g	140
Wissensch	aftliche Beiträge	150

Abkürzungsverzeichnis

3-D	Dreidimensional
a.u.	Willkürliche Einheit
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl₂	Calciumchlorid
Ca₂HPO₄	Calciumhydrogenphosphat
CARS	Coherent anti-stokes Raman spectroscopy
CCD	Charge-coupled Device
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbacco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSP-1	Fibroblast Surface Protein
H ₂ O	Wasser
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes
HCHON	Human Chondrozyten
HCI	Salzsäure
hMEC-1	Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Line
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
lgG1	Immunglobulin Typ G1
lgG2a	Immunglobulin Typ G2a
IgM	Immunglobulin Marker
IR	Infrarot
KBM	Keratinocyte Basal Medium
KCI	Kaliumchlorid
KH ₂ CO ₃	Kaliumdihydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mv	mikrovaskulär
N ₂	Stickstoff
	Numerische Apertur
	Dinatnumnydrogenphosphat
	Nathumeniona Nuclear Magnetic Decompose
	Jauer Stoll

P4Hbeta PBS	Prolyl-4-Hydroxylase beta Phosphate buffered saline
PC	Principal Component; Hauptkomponente
PCA	Principal Component Analysis; Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptavidin
PGA	Polyglykolid
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SVM	Support Vector Machine
SW1353	Chondrosarkoma-Zelllinie
T25; T75; T175	25 cm ² ; 75cm ² ; 175 cm ² Zellkulturflaschen
TBS	Tris-buffered Saline
TGF	Transforming growth factor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Symbolverzeichnis

- *α* Polarisierbarkeit
- λ Wellenlänge
- *b* Verschiebung (Bias)
- c Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
- *E* Energie des Strahlungsquants
- E_M Residuenmatrix
- e_{iz(A)} Restfehler nach A Hauptkomponenten
- ΔE Energieverschiebung
- $f_{\scriptscriptstyle N}$ falsch negative Zuordnung
- f_{P} falsch positive Zuordnung
- *h* Plancksches Wirkungsquantum
- I Intensität der Raman-Strahlung
- *I*₀ Intensität des anregenden Lasers
- k Kraftkonstante
- μ schwingende Atommasse
- *n* Anzahl der streuenden Moleküle
- P Loadingsmatrix
- p_{za} Loadingwert für Variable z und Hauptkomponente a
- r_p richtig positive Zuordnung
- r_N richtig negative Zuordnung
- t Zeit
- T Scoresmatrix
- t_{ia} Scorewert für Objekt i und Hauptkomponente a
- \widetilde{v} Wellenzahl
- v_0 Anregungsfrequenz
- *v*_s Schwingungsfrequenz
- v Frequenz der Strahlung
- *v*_D Deformationsschwingung
- *v_k* Kippschwingung

- *v_s* Streckschwingung
- *w* Normalenvektor
- *x* Datenmatrix
- *X* Mittenzentrierte Originaldatenmatrix
- $x_{mittel,z}$ z-ter Spaltenmittelwert
- z Spalte

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Aufbau der Arbeit
Abbildung 3-1:	Schematische Übersicht über die Inhalte der Regenerativen Medizin 8
Abbildung 3-2:	Prinzip der künstlichen Gewebeherstellung.
Abbildung 3-3:	Molekülschwingungstypen
Abbildung 3-4:	Schematische Erklärung der verschiedenen Raman Streuungen. 22
Abbildung 3-5:	Matrizen der Hauptkomponentenanalyse
Abbildung 3-6	Graphische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse 29
Abbildung 3-7	Graphische Erklärung der Large Margin Separation einer Support
	Vector Machine 30
Abbildung 4-1	Schematischer Aufhau des eigenentwickelten Raman
	Snektrometers 36
Abbildung 4-2 [.]	Strahlengang des Lasers des eigenentwickelten Raman
/ loondarig + 2.	Snektrometers 36
Abbildung 5-1	Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Eibroblasten und
Abbildung o 1.	Keratinozyten 70
Abbildung 5-2	Mittelwertsnektren Standardabweichungen Differenzsnektrum und
Abbildung 5-2.	Loadingenektrum primärer Fibroblasten und Keratinozyten 70
Abbildung 5-3	Veraleich der Intensitäten der Raman Banden, die für die Trennung
Abbildung 5-5.	von primären Fibroblasten und Keratinozyten identifiziert wurden. 71
Abbildung 5-4:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
Abbildung 5-4.	nrimären Eibroblasten und Keratinozyten
Abbildung 5 5	Immunzytologische Färbungen primärer Fibroblasten und
Abbildung 5-5.	Keretinezyton
Abbildung 5 6:	Liehtmikreekenieehe Aufnehmen von nrimären Melanezuten und
Abbildung 5-0.	
Abbildung E 7	Neralinozylen
Abbildung 5-7.	kinderwertspektren, Standardabwerchungen, Dinerenzspektrum und
Abbildung E 9:	Loadingspektrum primarer Melanozyten und Keratinozyten
Abbildung 5-6.	vergielen der Intensitäten der Raman Danden, die für die Trennung
Abbildung E Or	von primaren Melanozyten und Keratinozyten identiliziert wurden. 75
Abbildung 5-9.	Scole-Piol del Haupikomponentenanalyse del Raman Spekiren von
Abbildung 5 40.	primaren Melanozyten und Keratinozyten
Abbildung 5-10:	Immunchemische Farbung der primaren Melanozyten und
Abbildunger C. 11.	Keratinozyten
Abbildung 5-11.	Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Fibrobiasten und
	Endotneizellen
Abbildung 5-12:	Wittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und
	Loadingspektrum primarer Fibrobiasten und mv Endotneizeilen 78
Abbildung 5-13:	vergleich der Intensitäten der Raman Banden, die für die Trennung
	von primaren Fibroblasten und mv Endotheizellen identifiziert
	wurden
Abbildung 5-14:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren der
	primaren Fibroblasten und mv Endotheizeilen
Abbildung 5-15:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Stammzellen und
ALL'IL	Fibroblasten
Abbildung 5-16:	Durchtusszytometrische Analyse von primären Stammzellen und
Abbildung 5-17:	In-vitro-Differenzierungsassay der Stammzell- und Fibroblasten-
	population

Abbildung 5-18	Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und
	Loadingspektrum von Stammzellen und Fibroblasten
Abbildung 5-19:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	biohterikenske Aufrekense van USOST Zellen und rinsiner
Abbildung 5-20:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von HaCal Zeilen und primaren
Abbildung C 04.	Neralinozylen
Abbildung 5-21:	Wittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und
	Loadingspektrum von HaCaT Zeilen und primaren Keratinozyten. 86
Abbildung 5-22:	Vergleich der Intensitäten der Raman Banden, die für die Trennung von
	HaCal Zellen und primaren Keratinozyten identifiziert wurden
Abbildung 5-23:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	HaCal Zellen und primaren Keratinozyten
Abbildung 5-24:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von nivieC-1 Zeilen und mv
	Endotneizeilen
Abbildung 5-25:	Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und
	Loadingspektrum von hMEC-1 Zellen und primären mv
	Endotheizellen
Abbildung 5-26:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	hMEC-1 Zellen und primären my Endothelzellen
Abbildung 5-27:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse unter ausschließlicher
	Verwendung der Raman Bande bei 980 cm ⁻¹ der Spektren von
	hMEC-1 Zellen und primären mv Endothelzellen
Abbildung 5-28	Lichtmikroskopische Aufnahmen von SW1353 Zellen und primären
	Chondrozyten
Abbildung 5-29:	Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und
	Loadingspektrum von SW1353 Zellen und primären Chondrozyten 92
Abbildung 5-30:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	SW1353 Zellen und primären Chondrozyten
Abbildung 5-31:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen,
	Differenzspektrum und Loadingspektrum von porcinen Stammzellen
	und porcinen Chondrozyten
Abbildung 5-32:	Vergleich der Intensitäten der Raman Banden, die für die Trennung
	von primären, porcinen Stammzellen und Chondrozyten identifiziert
	wurden
Abbildung 5-33:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	porcinen Stammzellen und Chondrozyten
Abbildung 5-34:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen sowie das
	Loadingspektrum von Chondrozyten, die gar nicht, für eine, zwei
	oder drei Wochen kultiviert wurden
Abbildung 5-35:	Vergleich der Intensitäten der Raman Banden, die für die Analyse
	des Differenzierungsstatus porciner Chondrozyten identifiziert
	wurden
Abbildung 5-36:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	Chondrozyten, die gar nicht für eine, zwei oder drei Wochen
	kultiviert wurden
Abbildung 5-37:	Einzelne Score-Plots der Hauptkomponentenanalyse der Raman
	Spektren von Chondrozyten, die gar nicht, für eine, zwei oder drei
	Wochen kultiviert wurden100
Abbildung 5-38:	Immunzytologische Färbungen der frisch isolierten Chondrozyten
	sowie von Chondrozyten, die für eine, zwei und drei Wochen im
	Monolayer kultiviert wurden

Abbildung 5-39:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen,
	Differenzspektrum und Loadingspektrum der Superfizial- und
	Radiarzone des hyalinen Knorpels
Abbildung 5-40	Vergleich der Intensitäten der Raman Banden, die für die Trennung
	der Superfizial- und Radiarzone des hyalinen Knorpels identifiziert
	wurden
Abbildung 5-41:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren der
	Supertiziaizone und Radiarzone des nyalinen Knorpeis
Abbildung 5-42:	Satranin O Farbung histologischer Knorpeischnitte vor und hach
	enzymatischer Benandlung
Abbildung 5-43:	Raman Mittelwertspektren und Standardabweichungen der Radiarzone
Abbildung 5 44	des Knorpeis vor und nach enzymatischer Benandlung
Abbildung 5-44.	Vergieich der Intensitäten der Raman Banden, die für die
	der enzymetischen Rebendlung verslichen wurden
Abbildung 5 45:	Demon Mittelwortenektron und Stenderdebweichungen nrimörer
Abbildung 5-45.	
Abbildung 5 46:	Rilochennidulizes
Abbildung 5-40.	Differenzenektrum und Loadingenektrum der <i>in vitro</i> synthetisierten
	Knochenmatrix sowie der dazugehörigen Kontrollmatrix
Abbildung 5-47	Score-Plot der Hauntkomponentenanalyse der Raman Spektren der
Abbildung 5-47.	<i>in vitro</i> synthetisierten Knochenmatrix und der Kontrollmatrix 100
Abbildung 8-1.	In-vitro-Differenzierungsassav der Stammzell- und Eibroblasten-
Abbildung 0-1.	nonulation 140
Abbildung 8-2	In-vitro-Differenzierungsassav der Stammzell- und Eibroblasten-
/ obliguing o 2.	nonulation 140
Abbildung 8-3	Raman Mittelwertspektren Standardabweichungen sowie das
/ obligang o o.	Loadingspektrum von Chondrozyten, die gar nicht für eine zwei
	oder drei Wochen kultiviert wurden 141
Abbilduna 8-4:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
,	Chondrozvten, die gar nicht, für eine, zwei oder drei Wochen
	kultiviert wurden
Abbildung 8-5:	Einzelne Score-Plots der Hauptkomponentenanalyse der Raman
5	Spektren von Chondrozyten, die gar nicht, für eine, zwei oder drei
	Wochen kultiviert wurden
Abbildung 8-6:	Immunzytologische Färbungen der frisch isolierten Chondrozyten
C C	sowie von Chondrozyten, die für eine, zwei und drei Wochen im
	Monolayer kultiviert wurden
Abbildung 8-7:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen sowie das
	Loadingspektrum von Chondrozyten, die gar nicht, für eine, zwei
	oder drei Wochen kultiviert wurden143
Abbildung 8-8:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren von
	Chondrozyten, die gar nicht, für eine, zwei oder dre Wochen
	kultiviert wurden143
Abbildung 8-9:	Einzelne Score-Plots der Hauptkomponentenanalyse der Raman
	Spektren von Chondrozyten, die gar nicht, für eine, zwei oder drei
	Wochen kultiviert wurden
Abbildung 8-10:	Immunzytologische Färbungen der frisch isolierten Chondrozyten
	sowie von Chondrozyten, die für eine, zwei und drei Wochen im
	Nionolayer kultiviert wurden

Abbildung 8-11:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenz- spektrum und Loadingspektrum der Superfizial- und Radiärzone des
	hyalinen Knorpels145
Abbildung 8-12:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren der
	Superfizialzone und Radiärzone des hyalinen Knorpels145
Abbildung 8-13:	Safranin O-Färbung histologischer Knorpelschnitte vor und nach enzymatischer Behandlung146
Abbildung 8-14:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenz-
-	spektrum und Loadingspektrum der Superfizial- und Radiärzone des hyalinen Knorpels
Abbildung 8-15:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren der
	Superfizialzone und Radiärzone des hyalinen Knorpels147
Abbildung 8-16:	Safranin O-Färbung histologischer Knorpelschnitte vor und nach
	enzymatischer Behandlung147
Abbildung 8-17:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenz-
	spektrum und Loadingspektrum der in vitro synthetisierten
	Knochenmatrix sowie der dazugehörigen Kontrollmatrix148
Abbildung 8-18:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren der
	<i>in vitro</i> synthetisierten Knochenmatrix und der Kontrollmatrix148
Abbildung 8-19:	Raman Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenz-
	spektrum und Loadingspektrum der <i>in vitro</i> synthetisierten
	Knochenmatrix sowie der dazugehörigen Kontrollmatrix
Abbildung 8-20:	Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman Spektren der
	in vitro synthetisierten Knochenmatrix und der Kontrollmatrix149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Vier-Felder-Tabelle	31
Tabelle 4-1:	Verwendete Geräte	33
Tabelle 4-2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	38
Tabelle 4-3:	Verwendete Chemikalien	39
Tabelle 4-4:	Verwendete Antikörper für die immunchemischen Färbungen	41
Tabelle 4-5:	Verwendete Kits für immunchemischen Färbungen	41
Tabelle 4-6:	Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen	42
Tabelle 4-7:	Zusammensetzungen der verwendete Medien, Puffer und Lösungen	42
Tabelle 4-8:	Zusammensetzungen der verwendeten Stammlösungen für die	
	immunchemischen Färbungen	44
Tabelle 4-9:	Zusammensetzungen der verwendeten Arbeitslösungen für die	
	immunchemischen Färbungen	44
Tabelle 4-10	: Zusammensetzungen der verwendeten Stammlösungen für die	
	histologischen Färbungen	44
Tabelle 4-11	: Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen für den in-vitro	-
	Differenzierungsassay	46
Tabelle 4-12	: Zusammensetzung der verwendeten Arbeitslösungen für den in-vitro	-
	Differenzierungsassay	46
Tabelle 4-13	: Verwendete humane Zelllinien	48
Tabelle 5-1:	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen primären	
	Fibroblasten und Keratinozyten.	72
Tabelle 5-2:	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen primären	
	Melanozyten und Keratinozyten	76
Tabelle 5-3:	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen primären	
	Fibroblasten und mv Endothelzellen	79
Tabelle 5-4:	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen HaCaT Zellen und	
	primären Keratinozyten	86
Tabelle 5-5	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen porcinen	
	Stammzellen und Chondrozyten	96
Tabelle 5-6:	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen frisch isolierten und	b
	kultivierten Chondrozyten.	99
Tabelle 5-7:	Raman spektroskopische Unterschiede zwischen der Superfizial- und	d
	Radiärzone des hyalinen Knorpels1	03
Tabelle 5-8:	Raman Banden primärer Knochenproben.	07

1. Zusammenfassung

Die Regenerative Medizin stellt ein multidisziplinarisches Forschungsgebiet dar, bei dem ingenieur- und naturwissenschaftliche Verfahren auf medizinischen Fragestellungen anwendet werden. Das übergeordnete Ziel der Regenerativen Medizin ist die Rekonstruktion sowie der Ersatz von fehlendem oder geschädigtem Gewebe durch die Verwendung von Zellsuspensionen, Biomaterialien oder Tissue Engineering Produkten. Für die Herstellung solcher Gewebekonstrukte ist zunächst die Zellisolierung erforderlich, an die sich die in-vitro-Kultivierung der Zellen in oder auf einem geeigneten Scaffold anschließt bevor diese dem Patienten implantiert werden können. Ein weiteres Anwendungsgebiet solcher artifiziellen Gewebe sind die in-vitro-Testsysteme, die für die Testung der Biokompatibilität verschiedener Materialien sowie Medikamente und kosmetischer Produkte Verwendung finden. Die nicht invasive Überprüfung solcher Konstrukte während der in-vitro-Reifung oder nach der Implantation in vivo ist sehr wichtig, um die Eigenschaften des Implantats evaluieren zu können. Allerdings bedingen die traditionellen Analysemethoden wie beispielsweise die Histologie, Immunhistochemie oder Biochemie eine invasive Veränderung des Konstrukts, die in dessen Zerstörung resultiert. Die Raman-Spektroskopie ist ein optisches Verfahren, das auf der unelastischen Streuung von Laserphotonen durch molekulare Schwingungen basiert und die Möglichkeit bietet, lebende Zellen nicht invasiv in situ oder in vivo zu analysieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Potential der Raman-Spektroskopie für die nicht invasive Unterscheidung verschiedener primärer Zelltypen sowie für die Detektion wichtiger zellulärer Eigenschaften wie beispielsweise des Differenzierungszustands und pathologischer Veränderungen aufgrund langer *in-vitro*-Kultivierungszeiten zu überprüfen. Außerdem wurde die Charakterisierung der extrazellulären Matrix des Knorpels und des Knochens angestrebt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich primäre, humane Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten nicht invasiv anhand ihrer Raman-Spektren unterscheiden lassen. Darüber hinaus ist die Unterscheidung primärer und *in vitro* modifizierter Keratinozyten durch Raman spektroskopische Untersuchungen möglich. Diese Ergebnisse sind besonders für die Herstellung artifizieller Haut und *in-vitro*-Hauttestsysteme relevant, bei denen sowohl die Biopsie als auch das Konstrukt aus mehreren Zelltypen besteht. Neben der Charakterisierung von Hautzellen spielte die Raman spektroskopische Analyse von Knochenmarksstammzellen eine wichtige Rolle, da diese Zellen eine wichtige Zellquelle

für Anwendungen der Regenerativen Medizin darstellen. Eine große Herausforderung bei der Verwendung solcher Stammzellen ist die Sicherstellung einer reinen Zellpopulation und der Ausschluss einer Kontamination mit Fibroblasten. Daher wurden beide Zelltypen sowohl mit Hilfe herkömmlicher Analysemethoden als auch Raman spektroskopisch untersucht. Obwohl ein *in-vitro*-Differenzierungsassay die multipotenten Eigenschaften der Stammzellen aufgezeigt hat, sind die langen Kultivierungszeiten der große Nachteil dieser Methode. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie eine zügige Unterscheidung von Fibroblasten und Stammzellen ermöglicht und somit eine effiziente Methode für die Detektion einer Kontamination von Stammzellkulturen mit Fibroblasten ist.

Des Weiteren wurden sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die Zellen des Gelenkknorpels Raman spektroskopisch untersucht, da dieses Gewebe ein wichtiges Anwendungsgebiet der Regenerativen Medizin ist. Die Unterscheidung primärer Chondrozyten von Zellen der korrespondierenden Zelllinie (SW1353) war aufgrund ihrer Raman-Spektren möglich. Außerdem wurde der Differenzierungsstatus der Chondrozyten, der durch die Veränderungen der Expression typischer extrazellulärer Matrixproteine beschrieben wird, anhand der Raman-Spektren detektiert und durch immunzytologische Färbungen bestätigt. Die zonale Struktur des Knorpels, die sich vor allem in die kollagenreiche Superfizialzone sowie die proteoglykanreiche Radiärzone unterteilt, konnte durch Unterschiede der jeweiligen Raman-Spektren identifiziert werden. Zusätzlich bestätigten histologische Färbungen diese spektroskopischen Resultate. Um die Metastasierung von Krebszellen und die Kanzerogenese in Knochengewebe untersuchen zu können, wurde eine in vitro synthetisierte Modellmatrix entwickelt. Damit bestimmt werden kann, inwiefern die Zusammensetzung dieser artifiziellen Matrix mit der des nativen Knochens übereinstimmt, wurden beide Gewebe Raman spektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass die Modellmatrix die natürliche Situation des Knochens zufriedenstellend widerspiegelt, da beide Spektren strukturell sehr ähnlich waren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie eine vielversprechende Methode für die Charakterisierung von Einzelzellsuspensionen und Tissue Engineering Konstrukten ist, da sowohl verschiedene zelluläre Eigenschaften als auch die extrazelluläre Matrix nicht invasiv analysiert werden können. Daher ist dieses Verfahren ein aussichtsreiches Werkzeug für die nicht invasive in situ Qualitätskontrolle für Anwendungen der Regenerativen Medizin.

Abstract

Regenerative Medicine is a multidisciplinary field that combines engineering, physical and biological sciences and medicine with the overall goal to restore or to replace damaged tissues or organs. In order to reach this goal there are several strategies such as the application of cell suspensions or biomaterials. Furthermore the use of tissue engineering constructs, which are produced by a combination of both cells and scaffolds, is a more sophisticated approach. Therefore, it is necessary to isolate cells from the patient that are cultured together with the scaffold *in vitro* before this construct can be implanted into the patient. Other application fields of tissue engineered products are *in vitro* test systems to test the biocompatibility of materials, drugs and cosmetic products.

Non-invasive monitoring of such engineered tissues during their *in vitro* maturation or post implantation *in vivo* is relevant for graft evaluation. However, traditional methods for analysing cell and matrix components in tissue engineered constructs such as histology, immunohistochemistry or biochemistry require invasive tissue processing, resulting in the need to sacrifice these constructs. Raman spectroscopy is an optical technique based on inelastic scattering of laser photons by molecular vibrations, which offers the possibility to study living cells non-invasively *in situ* and *in vivo* and to discriminate cell populations based on their specific biochemical fingerprint.

The aim of this study was to determine the applicability of Raman spectroscopy for the non-invasive spectral separation of several primary cell types as well as the identification of key cellular characteristics including differentiation state and pathological changes due to prolonged *in vitro* cultivation times. Furthermore, the characterization of the extracellular matrix composition of cartilage and bone by Raman spectroscopy was aimed.

Interestingly, it was shown that it is possible to non-invasively distinguish between primary human fibroblasts, keratinocytes and melanocytes. Additionally, the discrimination between primary and *in vitro* modified keratinocytes by their Raman spectra was successful. These findings are especially relevant for the production of artificial skin and for the engineering of *in vitro* skin models, where both the biopsy and the transplant consist of several cell types.

As bone-marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC) are a promising cell source for regenerative medicine, this cell type was also analyzed by Raman spectroscopy. One challenge is to determine whether isolated BM-MSC populations are free of

contaminating fibroblasts. It was aimed to discriminate these two cell types by traditional methods and Raman spectroscopy. Although *in vitro* differentiation assays revealed the multipotent character of BM-MSCs in contrast to fibroblasts, long culture periods are disadvantageous. Raman spectroscopy allows the discrimination between BM-MSCs and fibroblasts and thus it is a sufficient method for the rapid detection of fibroblastic contaminations in BM-MSC cultures.

Further investigations focussed on the potential of Raman spectroscopy to characterize cartilage *ex vivo*, *in situ*. Raman spectra were able to discriminate primary chondrocytes and cells from the immortalized counterpart (SW1353). Moreover, the differentiation status of chondrocytes, described by changes in the expression of typical extracellular matrix proteins, was detectable by Raman spectroscopy and confirmed by immunohistological stainings. Furthermore, the zonal structure of cartilage sections was measurable by identifying differences between the Raman spectra of the majorly collagen containing superficial zone and the proteoglycan-rich middle/deep zone of native cartilage. These findings were also confirmed by histological staining.

The composition of an *in vitro* synthesized bone matrix, which should serve as a model to study cancer metastasis and carcinogenesis, was analyzed by Raman spectroscopy. The comparison of both native bone and the model matrix showed that the matrix adapts the *in vivo* situation satisfactorily due to similar pattern in the Raman spectra.

In conclusion, Raman spectroscopy is a capable technology for the characterization of cell suspensions and tissue engineered constructs as several cellular and extracellular matrix properties are detectable by just one non-invasive measurement. Therefore, it is a promising tool for the non-invasive *in situ* quality control in regenerative medicine applications.

2. Einleitung, Motivation und Zielsetzung

Dieser Abschnitt dient dazu einen Überblick über das Thema, die Motivation sowie das daraus resultierende Ziel dieser Arbeit zu erhalten.

2.1. Einleitung und Motivation

Die erfolgreiche Therapie von Organversagen sowie großer Gewebedefekte stellt nach wie vor eine große Herausforderung der Medizin dar. Sowohl die Rekonstruktion als auch Transplantation sind potentielle Behandlungsstrategien, die allerdings logistisch aufwendig und sehr kostenintensiv sind. Ferner resultieren diese Therapien häufig in immunologischen Reaktionen und können zur Übertragung von Infektionen führen. Aus diesen Gründen müssen neue Behandlungsmethoden etabliert werden.

Der Einsatz von Biomaterialien und Zellen zur Unterstützung der Regeneration der kranken oder verletzen Regionen sowie die Implantation von artifiziellen Organen und Geweben stellen potentielle Lösungsansätze dar und werden in den Forschungsbereich der Regenerativen Medizin eingeordnet. Das Feld der Regenerativen Medizin beschäftigt sich ganz allgemein mit den für den Menschen wichtigen Bereichen Trauma, Alterung und Krankheit.

Um sicherstellen zu können, dass solche Konstrukte einheitliche Qualitäten aufweisen und den vorgeschriebenen Spezifikationen entsprechen, müssen die Herstellprozesse standardisiert sein. Mittlerweile ist europaweit entschieden worden, dass alle *in vitro* hergestellten Gewebe wie pharmakologische Wirkstoffe zu behandeln sind, d.h. alle Herstellverfahren ein Zulassungsverfahren gemäß dem Arzneimittelgesetz durchlaufen müssen [1].

Potentielle Risiken während der Herstellung solcher artifiziellen Gewebe oder Organe stellen beispielsweise pathologische Veränderungen der Zellen aufgrund untypischer Kultivierungsbedingungen, das Absterben der Zellen innerhalb eines Konstrukts aufgrund schlechter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie der Einsatz von mit anderen Zelltypen kontaminierten Zellpopulationen dar. Die Qualitätskontrolle dieser Konstrukte spielt somit eine wichtige Rolle und ist ein erforderlicher Prozessschritt innerhalb des Produktionsprozesses von Produkten der Regenerativen Medizin.

Herkömmliche Verfahren, wie die Histologie sowie biochemische oder molekularbiologische Methoden, die für die Überprüfung der Konstrukteigenschaften angewendet werden, sind invasiv und bedingen die Prozessierung der Konstrukte.

5

Daher werden typischerweise zwei identische Konstrukte hergestellt, wobei ein Konstrukt der Charakterisierung dient und das zweite Konstrukt dem Patienten implantiert wird. Dadurch besteht ein gewisses Restrisiko für den Patienten, da lediglich angenommen wird, dass beide Konstrukte identische Eigenschaften besitzen. Die Implementierung einer nicht invasiven Charakterisierungsmethode für die Überprüfung der Qualität würde sowohl einen zeitlichen als auch wirtschaftlichen Vorteil bringen. Ferner würde die Analyse des zu implantierenden Konstrukts möglich werden, wodurch das Risiko für den Patienten sinkt, ein ungeeignetes Transplantat zu erhalten.

Die Raman-Spektroskopie ist eine nicht invasive Analysemethode die auf der unelastischen Streuung von Licht an Molekülen unter der Verwendung von geeigneten Lasern beruht, wodurch die Charakterisierung von Molekülen einer Probe möglich ist. Die daraus resultierenden Raman-Spektren enthalten sogenannte biochemische Fingerabdrücke, die Informationen über Zell- und Matrixbestandteile beinhalten. Daher ist eine Unterscheidung verschiedener Zelltypen aufgrund ihrer Phänotyp-spezifischen Raman-Spektren möglich.

2.2. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer nicht invasiven, d.h. markerunabhängigen, berührungs- und zerstörungsfreien Analysemethode für die medizinischen Diagnostik als auch für die Qualitätskontrolle von Produkten der Regenerativen Medizin. Die Implementierung der Raman-Spektroskopie als Diagnostikwerkzeug würde in einem schnelleren Analyseprozess der jeweiligen Produkte resultieren. Daher sollte innerhalb dieser Arbeit, das Potential der Raman-Spektroskopie sowohl für die zelluläre Charakterisierung als auch zur Analyse der extrazellulären Matrix überprüft Insbesondere Fragestellungen werden. wurden aus dem Bereich der Qualitätskontrolle und des Monitorings von Produkten der Regenerativen Medizin behandelt. Der Fokus lag dabei zunächst auf der Unterscheidung verschiedener primärer Zelltypen sowie der Abgrenzung von primären Zellen und Zellen der korrespondierenden Zelllinien. Ferner wurde der Differenzierungszustand von Chondrozyten Raman spektroskopisch analysiert, der eine wichtige Rolle bei in vitro produzierten Knorpeltransplantaten spielt. Grundsätzlich wurden schrittweise die Grenzen der Raman-Spektroskopie als Analysewerkzeug ausgetestet, indem Zellen vermessen wurden, deren Unterscheidungsmerkmale immer geringer waren (siehe

6

Abbildung 2-1). An diese zelluläre Charakterisierung sollte sich die Analyse der extrazellulären Matrix von Knorpel- und Knochengewebe anschließen, da diese zusätzlich eine wichtige Rolle in der Diagnostik sowie in der Qualitätskontrolle von Tissue Engineering Konstrukten spielt. Dabei lag der Fokus auf der Detektion der zonalen Struktur des Knorpelgewebes sowie der Vergleich einer *in vitro* synthetisierten und nativen Knochenmatrix (siehe Abbildung 2-1). Als Referenzmethoden sollten klassische Analysemethoden wie die Immunzytologie, Durchflusszytometrie und Histologie dienen.



Abbildung 2-1: Aufbau der Arbeit

Um die teilweise nur sehr feinen Unterschiede in den Raman-Spektren der Proben detektieren zu können, sollten alle Spektren multivariat ausgewertet werden. Für die Klassifikation der Daten sollte die Hauptkomponentenanalyse zum Einsatz kommen und für die Regression wurde die Support Vector Machine verwendet. Anhand dieser Methoden sollten einerseits die spektralen Bereiche, die für die Unterscheidung sowie für die Charakterisierung der Proben ausschlaggebend waren, herausgearbeitet und andererseits die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Daten überprüft werden.

3. Theoretische Grundlagen und Stand der Technik

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen sowie der Stand der Technik der Regenerativen Medizin sowie der verschiedenen Analysemethoden aufgezeigt. Ferner werden die Prinzipien der Raman-Spektroskopie und der Auswertemethoden beschrieben.

3.1. Regenerative Medizin

Die Regenerative Medizin ist ein breites interdisziplinäres Feld mit dem definierten Ziel, fehlendes oder geschädigtes Gewebe zu rekonstruieren, reparieren oder ersetzen. Bei der Realisierung dieses Ziels liegt der Fokus auf der Adaption an die natürliche Funktion und Architektur des zu ersetzenden Gewebes [2]. Innerhalb der Regenerativen Medizin existieren drei unterschiedliche Strategien um dieses Ziel zu erreichen: Die Verwendung von Biomaterialien bzw. Scaffolds, die Anwendung von Zelltherapeutika oder die Nutzung von Tissue Engineering Produkten (siehe Abbildung 3-1), die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden [3, 4].



Abbildung 3-1: Schematische Übersicht über die Anwendungsbereiche der Regenerativen Medizin, die sich in die Verwendung von Bioaktiven Materialen/ Scaffolds, von Zelltherapeutika und Tissue Engineering Produkten untergliedert (verändert nach [3])

Biomaterialien

Grundsätzlich werden Materialien als Biomaterialien bezeichnet, die mit biologischen Systemen in Kontakt stehen [5]. Vorausgesetzt, dass das räumliche Umfeld sowohl das Zellwachstum als auch die Zellfunktion beeinflusst, sollte eine Adaption des künstlichen Gewebes an die natürliche räumliche Organisation des ursprünglichen Gewebes angestrebt werden. Dafür werden Trägerstrukturen (Scaffolds) verwendet, die die räumliche Organisation der Zellen vorgeben. Dieser sogenannte Vital/- Avital-Verbund von Zellen und Scaffold ist analog zum natürlichen Gewebe, bei dem die Trägerstruktur durch die extrazelluläre Matrix ersetzt ist. Diese Trägerstrukturen können je nach Anwendungsgebiet in der chemischen und biologischen Funktionalisierung der Oberfläche als auch in der räumlichen Koordination sowie den mechanischen Eigenschaften variieren. Die verwendeten Materialien können sowohl natürlichen Ursprungs (Kollagen, Alginat, azellularisierte Strukturen) sein als auch aus synthetischen Polymeren (Polylactid (PLA), Polyglycolid (PGA) oder Polylactidco-Glycolid (PLGA)) bestehen. Alle Trägerstrukturen müssen biokompatibel sein, damit diese nach der Implantation keine toxischen Auswirkungen auf das umgebende Patientengewebe haben und außerdem die Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen ermöglichen. Ferner sollten die Materialien möglichst biodegradierbar sein, damit diese im Körper abgebaut und durch körpereigene Materialien ersetzt werden können [3, 6].

Zelltherapie

Die Zelltherapie basiert auf der Verwendung von Einzelzell-Suspensionen, die ohne die Verwendung von Trägermaterialien in erkrankte oder defekte Gewebeareale eingebracht werden [7]. Durch dieses Verfahren soll die körpereigene Regeneration gefördert und unterstützt werden. Da sich die Zellen zum Zeitpunkt der Implantation in einem relativ unreifen Zustand befinden, entwickeln sich diese erst unter dem Einfluss der Umgebung im Körper vollständig weiter. Somit soll die Entwicklung eines funktionellen Gewebes sowie die Integration in die umliegenden Areale erfolgen. Typischerweise wird die Zelltherapie bei Erkrankungen wie beispielsweise Leukämie, Knorpelverletzungen oder Herzinfarkten angewendet [3, 8-10].

Tissue Engineering

Eine weitere Behandlungsstrategie um kranke Gewebe oder Organe zu unterstützen bzw. zu substituieren, ist die Verwendung von in vitro kultivierten Zell-Matrix-Konstrukten. Die herkömmliche Therapie um die Funktion von krankheits- oder unfallbedingten Schädigungen eines Organs wieder herzustellen, ist der Einsatz von Spenderorganen. Allerdings führen Limitationen wie der große apparative, logistische und personelle Aufwand sowie die Risiken der Transplantationschirurgie und die mangelnde Verfügbarkeit von kompatiblen Spenderorganen dazu, dass der Bedarf an Spenderorganen nur zu einem geringen Anteil abgedeckt werden kann [4]. Darüber hinaus ist bei den Transplantat-Empfängern eine lebenslange Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten erforderlich, die schwerwiegende und möglicherweise lebensverkürzende Nebenwirkungen zur Folge haben kann. Um diese Limitationen zu umgehen, werden autologe (patienteneigene) Transplantate benötigt, die mit Hilfe von Tissue Engineering-Verfahren hergestellt werden können [11]. Die Anwendungsgebiete reichen von der Herstellung künstlicher Haut- oder Knorpelersätze bis hin zum Einsatz von künstlichen Teilorganen wie beispielsweise der Leber oder Pankreas [3, 12, 13]. Des Weiteren können solche Konstrukte auch als in-vitro-Testsysteme zur Prüfung der Biokompatibilität von Werkstoffen oder für die Testung von Medikamenten verwendet werden, was in der Reduzierung der für solche Prüfungen verwendeten Tierversuche resultiert [11, 12, 14, 15]. Während bei der Zelltherapie die reine Zellsuspension in die Zone des Defekts eingebracht wird, werden bei den Therapieansätzen des Tissue Engineerings Zellen auf Trägermatrizes aufgebracht und das daraus resultierende Gewebekonstrukt als Implantat verwendet. Grundsätzlich unterteilt sich das Prinzip der künstlichen Gewebeherstellung in die folgenden Schritte, das hier am Beispiel des Knorpels dargestellt ist (siehe Abbildung 3-2):

- 1. Entnahme der Biopsie
- 2. Isolierung und Kultivierung der Zellen
- 3. Einbringen der Zellen in/auf eine Trägermatrix (Scaffold)
- 4. Implantierung des Konstrukts.



Abbildung 3-2: Prinzip der künstlichen Gewebeherstellung. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der Herstellung eines Knorpelkonstrukts. 1. Entnahme einer Biopsie aus einem unbelasteten Knorpelareal, 2. Isolation und Kultivierung der Zellen, um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten 3. Einbringen und Kultivierung der Zellen in/auf geeignete Matrix, 4.Implantation des *in vitro* hergestellten Konstrukts (verändert nach [3])

Die sowohl für die Zelltherapie als auch im Tissue Engineering verwendeten Zellen können verschiedensten Ursprungs sein. Dabei können allogene, xenogene oder syngene Zellen aber auch Zelllinien zum Einsatz kommen [16]. Das Ziel ist die Verwendung von autologen Zellen, da dadurch Abstoßungsreaktionen im Patienten vermieden werden können. Die größten Herausforderungen liegen dabei in der Gewinnung einer ausreichend großen Menge an Zellen sowie in der Isolierung reiner und definierter Zellpopulationen [16]. Um die gewünschte Zellzahl zu erhalten, werden die isolierten Zellen in vitro expandiert, wodurch sich der Phänotyp einiger Zellen verändern kann, wie beispielsweise bei Chondrozyten [17]. Des Weiteren besteht die Gefahr einer potentiellen pathologischen Veränderung der in vitro kultivierten Zellen aufgrund der für die Zellen untypischen zweidimensionalen Kultivierungsbedingungen. Da die Biopsate aus denen die Zellen isoliert werden, wie beispielweise die Haut, häufig aus mehreren Zelltypen bestehen, ist der Erhalt von Zellpopulationen, die nur aus einem Zelltypen bestehen. erschwert. Die Kontamination von Zellkulturen mit Fibroblasten ist dabei ein häufig beschriebenes Problem, das vor der Verwendung der Zellpopulationen ausgeschlossen werden muss [18-20]. Daher müssen die Zellpopulationen sowohl direkt nach der Isolierung als auch vor der Verwendung analysiert werden, um gewährleisten zu können, dass ausschließlich definierte und gesunde Zellen verwendet werden. Ferner müssen die Gewebekonstrukte untersucht werden, damit deren Qualität sichergestellt werden kann. Die dafür herkömmlicherweise genutzten Analysemethoden werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2. Zelluläre Charakterisierung und Diagnosemethoden

Wie bereits im oberen Abschnitt und für Abbildung 3-2 beschrieben, liegen zwischen dem Herstellungsbeginn und der Fertigstellung eines Gewebekonstrukts viele Arbeitsschritte, die das Pipettieren, das Ansetzen von Medien und die Inkubation der Konstrukte umfassen können [3]. Diese technischen Vorgänge lassen sich gut standardisieren sowie überwachen und können sogar vollautomatisiert von Robotern durchgeführt werden [21]. Die qualitative Beurteilung des Reifungsgrads und der Funktionalität des Gewebekonstrukts wird allerdings häufig vernachlässigt [3]. Prinzipiell muss überprüft werden, ob sich neben den typischen auch atypische Strukturen innerhalb des Konstrukts entwickelt haben, d.h. ob die Qualität der kultivierten Zellen und Gewebe den Anforderungen entspricht. Das oberste Ziel sollte dabei die funktionelle Adaption des Konstrukts an die entsprechende Struktur im Organismus sein. Grundsätzlich müssen alle Faktoren, die die zelluläre Differenzierung und die daraus resultierende biologische Variabilität des Konstrukts beeinflussen können als auch das Wachstumsverhalten der Zellen, beachtet werden. Diese Charakterisierung der Gewebekonstrukte wird allerdings durch das häufige Fehlen geeigneter Marker für den Nachweis dieser Differenzierungsunterschiede erschwert [3].

Da die Expression von gewebespezifischen Proteinen häufig als Qualitätsmerkmal Verwendung findet. ist die Analyse der unterschiedlichen Stufen der Proteinbiosynthese wichtig, um Aussagen über die Qualität und Funktionalität des Gewebekonstrukts und der darin enthaltenen Zellen machen zu können. Da gerade in in-vitro-Zell- und Gewebekulturen eine normale Prozessierung von Proteinen nicht garantiert ist und eine Transkription nicht die sofortige und komplette Translation bedeutet, sollte die Zell- und Gewebequalität sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Translationsebene untersucht werden. Für die erfolgreiche Beurteilung der Qualitäten ist die Verfügbarkeit geeigneter Marker natürlich vorausgesetzt. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)-Methode dient dabei dem biochemischen Nachweis der messenger Ribonukleinsäure (mRNA), d.h. der Transkriptionsebene.

Ferner kann das entstandene Produkt auf der Translationsebene mit Hilfe der Immunhistochemie detektiert werden, solange ein geeigneter Antikörper existiert. Anhand von licht- oder elektronenmikroskopischer Untersuchungen wird dann festgestellt, ob das Zielprotein synthetisiert wurde und ob es beispielsweise an der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist. Die elektrophoretischen Methoden dienen der Auftrennung von Proteinfraktionen der Zelle. Mit Hilfe des Western Blots wird anhand einer markierten Bande ein synthetisiertes Protein mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Gerade die Kombination von morphologischen, molekularbiologischen und auch immunhistochemischen Charakterisierungsmethoden ist notwendig, um Aussagen über die Qualität der Zellund Gewebekulturen machen zu können [3].

Der große Nachteil dieser oben beschriebenen Gold-Standard-Methoden ist die notwendige Zerstörung des Konstrukts, die für die Charakterisierung der verschiedenen Qualitätsmerkmale unabdingbar ist. Die bisherige Qualitätskontrolle der Konstrukte resultiert in der Herstellung von zwei identischen Transplantaten, wobei ein Transplantat ausschließlich für die Analyse verwendet wird und das zweite uncharakterisierte Konstrukt implantiert wird. Es wird angenommen, dass beide Transplantate identische Eigenschaften besitzen, wodurch ein gewisses Restrisiko für den Patienten bestehen bleibt. Eine kontinuierliche sowie zerstörungsfreie Analyse der Ausgangszellpopulationen sowie der Konstrukte würde die Sicherheit des Prozesses erhöhen, da das zu implantierende Konstrukt auch analysiert werden würde. Ferner verringert eine nicht invasive Analyse den zeitlichen Aufwand solcher Prozesse, da die Prozessierung der Konstrukte wegfallen würde und nur ein Transplantat hergestellt werden müsste. Typische nicht invasive Charakterisierungsmethoden sind die Sonographie, die Magnetresonanztomographie, die optische Kohärenztomografie sowie die IR- oder Raman-Spektroskopie.

Neben der Charakterisierung von *in vitro* kultivierten Gewebekonstrukten spielen die oben beschriebenen Methoden auch eine große Rolle in der medizinischen Diagnostik. Für die Detektion pathologischer Veränderungen werden heutzutage sowohl invasive als auch bildgebende Methoden verwendet, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

3.2.1. Herkömmliche invasive Analysemethoden

Die Verwendung von invasiven Analysemethoden bedingt immer eine Prozessierung der zu untersuchenden Probe, wie beispielsweise das Fixieren von Gewebe, die Lyse von Zellen oder das Markieren der Zielstrukturen mit beispielsweise Antikörpern.

Histologie

Eine wichtige Methode in der Diagnostik von Gewebeproben ist die Histologie, die sich mit der morphologischen Analyse von Materialien aus Sektionen, Operationen, Biopsien und Punktionen beschäftigt. In der Histologie werden gesunde Gewebe mikroskopisch untersucht wobei in der Pathohistologie krankhaft verändertes Gewebe analysiert wird. Diese Methode dient der Frühdiagnose von Tumoren, deren Klassifizierung in gut- oder bösartig sowie dem Nachweis unterschiedlichster Erkrankungen. Ein weiteres Anwendungsgebiet der Histologie ist die Regenerative Medizin, in der die Qualität der in vitro synthetisierten Konstrukte vor der Verwendung bestimmt werden muss. Grundsätzlich unterteilt sich die histologische Analyse von Präparaten in die folgenden Arbeitsschritte: Fixierung, Einbettung, Schneiden, Färben und Mikroskopieren. Die Fixierung der Gewebe ist einerseits notwendig um alle zellulären Abläufe zu stoppen und somit den momentanen Zustand der Probe festzuhalten und andererseits um die Autolyse (Selbstauflösung) oder Fäulnis des Gewebes zu unterbinden. Um von dem Gewebe dünne Schnitte anfertigen zu können und um eine gleichbleibende Schnittqualität zu erhalten, ist eine gewisse Härte und Homogenität des Präparates erforderlich. Dafür ist es notwendig die Probe in ein erstarrendes Medium (wie z.B. Paraffin) einzuschließen und somit vor allem das in der Probe enthaltene Wasser durch das Einbettmedium zu ersetzen. Nachdem das Präparat eingebettet wurde, werden für die lichtmikroskopische Untersuchung dünne Schnitte (2-10 µm) angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Um die Zell- und Gewebebestandteile voneinander unterscheiden sowie pathologische Veränderungen detektieren zu können, werden mit einem oder mehreren Farbstoffen gefärbt die Schnitte und dann lichtmikroskopisch betrachtet. Die Vielfältigkeit dieser Methode und die damit verbundene Vielzahl an Diagnosemöglichkeiten kann durch die verschiedenen Färbemethoden realisiert werden.

Darüber hinaus erlaubt die Immunhistologie durch sehr spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen einen Nachweis von zellulären Antigenen in Gewebeschnitten. Anhand dieser Methode können neben den oben beschriebenen Merkmalen noch zelluläre Eigenschaften wie beispielsweise auch die Differenzierungsstadien, die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen sowie Zell-Zell-Kontakte detektiert werden. Ein Nachteil dieser Technologie ist der zeitliche und experimentelle Aufwand [22, 23].

14

Durchflusszytometrie

Eine invasive aber quantitative Charakterisierungsmethode intakter Einzelzellen ist die Durchflusszytometrie. Prinzipiell werden die spezifisch gefärbten Zellen dabei hydrodynamisch transportiert und optisch vermessen. Die Zellsuspension wird in einem Durchflusszytometer durch einen Hüllstrom verdünnt, damit die Zellen dann vereinzelt in einer Sequenz im rechten Winkel an einer Lichtquelle (z.B. Laser) vorbeigeführt werden können. Der gemeinsame Fokus von Probenstrom und Laser stellt den Messpunkt dar, in dem die Streuung des Anregungslichts und der Anregung von Fluoreszenzmarkern der gleichzeitigen Analyse von physikalischen als auch molekularen Zelleigenschaften dienen. Üblicherweise werden die Zellen in Größen zwischen 0,2 und 20 µm mit einer Geschwindigkeit von 200 bis 2000 Ereignissen/s an dem Laser vorbeigeführt. Grundsätzlich können mit diesem Verfahren die Zellgröße, die Granularität, Zellpigmente, der DNA- und RNA-Gehalt, Proteine, Oberflächenmarker sowie intrazelluläre Marker und Enzymaktivitäten gemessen werden. Dabei entspricht die Intensität der Fluoreszenzsignale je nach Anwendung beispielsweise der Menge der gebundenen Antikörper oder dem nukleären DNA-Gehalt. Die Streuung des Lichts gibt Auskunft über die Zellgröße und Granularität [24, 25].

Molekularbiologische und immunologische Methoden

Neben der qualitativen (immun)histologischen Analyse von Gewebestrukturen und der darin befindlichen Zellen sowie der durchflusszytrometrischen Untersuchung von intrazellulären- und Oberflächenmarkern spielen die molekularbiologischen und immunologischen Methoden eine wichtige Rolle in der medizinischen Diagnostik sowie bei der Charakterisierung von Konstrukten der Regenerative Medizin. Das molekularbiologische und immunologische Methodenspektrum umfasst Methoden wie die PCR, Western Blotting und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Eine sehr empfindliche molekularbiologische Analysetechnik ist die **PCR**, die ein breites Anwendungsspektrum hat, das von der Detektion von Pathogenen über die Ursachenforschung von Krankheiten bis hin zur Analyse der Nukleinsäuren von Einzelzellen reicht. Dieses *in-vitro*-Verfahren dient der selektiven Anreicherung von definierten Nukleinsäurebereichen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Die Technologie basiert auf der Nutzung von thermoresistenten DNA-Polymerasen, die in mehreren Schritten DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen polymerisieren. Dazu wird

die Ausgangs-DNA durch eine Temperaturerhöhung denaturiert, damit DNA-Einzelstränge vorliegen. Dann erfolgt die Anlagerung der spezifischen Primer an die komplementären Sequenzen und die Erzeugung des komplementären Strangs durch die DNA-Polymerasen. Diese drei Schritte werden als ein Zyklus bezeichnet, der ca. 25- bis 40 mal wiederholt wird und somit eine exponentielle Zunahme der DNA-Menge erreicht. Dieses PCR-Produkt wird dann über eine Gelelektrophorese und mit Hilfe einer DNA-Leiter anhand seiner Größe identifiziert. Neben dieser sehr vereinfacht dargestellten Version der PCR, gibt es darüber hinaus die verschiedensten Variationen, die auch quantitative Aussagen über die DNA-Menge zulassen [26].

Unter einem **Western Blot** wird grundsätzlich die Übertragung eines Proteins auf eine Trägermembran bezeichnet, die aufgrund verschiedener Reaktionen nachgewiesen werden können. Anhand dieser Methode wird nicht die Zelle direkt analysiert, sondern ein Proteingemisch, das zunächst mit Hilfe der Gel-Elektrophoresetechnik entsprechend ihrer Eigenschaften wie Molekulargewicht und Ladung innerhalb eines Gels aufgetrennt und dann auf eine Membran (z.B. Nitrozellulosemembran) übertragen wird. Anschließend werden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran geblockt, bevor diese mit den spezifischen Antikörpern inkubiert wird. Die Detektion des gebundenen Antikörpers wird häufig mit Hilfe eines Sekundärantikörpers durchgeführt [26, 27].

Ein quantitativer Nachweis von Proteinen ist mit Hilfe des **ELISA**s möglich, bei dem das Protein die Rolle eines Antigens spielt. Für diese Analyse werden in der Regel Mikrotiterplatten verwendet, in deren Vertiefungen die Proben immobilisert werden. Dieses Protein wird anhand eines an einen Antikörper gekoppeltes Nachweissystem detektiert, welches häufig aus einem Enzym (z.B. Alkalische Phosphatase) besteht, das ein Substrat in ein Produkt umsetzt. Das Reaktionsprodukt wird durch einen Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen, wobei die Intensität die Menge des Zielproteins anzeigt wird [26-28].

3.2.2. Nicht invasive Methoden

Nicht invasive Analysemethoden bieten die Möglichkeit biologische Prozesse und Krankheiten in intakten lebenden Organismen zu evaluieren. Gerade die bildgebenden Verfahren spielen in der klinischen Diagnostik eine große Rolle. Darüber hinaus eignen sich die nicht invasiven Methoden für die Charakterisierung molekularer Zusammensetzungen von Zellen und extrazellulärer Matrizes.

Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie) ist sowohl eine gualitative als auch quantitative Analysemethode, die in den Bereich der Molekülspektroskopiemethoden eingeordnet wird. Diese Technik dient vor allem der Strukturaufklärung organischer Verbindungen anhand der Unterscheidung verschiedener funktioneller Gruppen und der dadurch bedingten Zuordnung zu einer Verbindungsklasse. Das Prinzip dieser Technologie beruht auf der Anregung von Molekülschwingungen durch die Die Bedingung für Absorption der IR-Strahlung. die Detektion dieser Schwingungsänderung ist die Gesamtänderung des Dipolmoments von Molekülen infolge seiner Schwingungs- und Rotationsbewegung. Da nicht alle Moleküle diese Bedingung erfüllen, kann die IR-Spektroskopie nur für sogenannte IR-aktive Moleküle verwendet werden. Bei homonuklearen Verbindungen wie beispielsweise O₂ oder N₂ tritt während der Schwingung oder Rotation keine Gesamtänderung des Dipolmoments auf und somit können diese Verbindungen im Infraroten nicht absorbieren. Die relativen Positionen der Atome eines Moleküls verändern sich permanent aufgrund einer Vielzahl verschiedener Schwingungsarten. Diese Schwingungen werden in die Kategorien Streckung und Deformation unterteilt. Die Streckschwingung beschreibt die kontinuierliche Änderung des Abstands zwischen zwei Atomen entlang der Schwingungsachse dieser Atome (siehe Abbildung 3-3 A, D). Die Deformationsschwingungen sind durch die Änderung des Winkels zwischen zwei Bindungen charakterisiert (siehe Abbildung 3-3 B, C, E, F). Ferner wird zwischen symmetrischen und asymmetrischen Schwingungen unterschieden je nachdem ob die Molekülsymmetrie im Verlauf der Schwingung erhalten bleibt (siehe Abbildung 3-3).



Abbildung 3-3: Molekülschwingungstypen. Streckschwingung: (A) symmetrische, (D) asymmetrische, Deformationsschwingung: (B) Pendeln in der Ebene, (E) Scherenbewegung in der Ebene, (C) Wippen aus der Ebene heraus, (F) Verdrillung aus der Ebene heraus. + symbolisiert die Bewegung aus der Ebene auf den Leser zu, -symbolisiert die Bewegung aus der Ebene von dem Leser weg (verändert nach [29])
Messprinzip IR-Spektroskopie Das der beruht auf der Abnahme der Strahlungsintensität beim Durchtritt durch die Probe. In einem IR-Spektrum wird üblicherweise der Transmissionsgrad in Prozent über die Wellenzahl in reziproken Zentimetern aufgetragen. Unter der Transmission wird der von der Probe nicht absorbierte Anteil der eingedrungenen Strahlung verstanden. Bei der Spektrenauswertung werden grundsätzlich zwei Bereiche betrachtet. Oberhalb von 1500 cm⁻¹ befinden sich die Absorptionsbanden, die den einzelnen funktionellen Gruppen zugeordnet werden können, unterhalb von 1500 cm⁻¹ befinden sich Banden, die von Deformationsschwingungen verursacht werden und charakteristisch für das ganze Molekül und nicht nur für einzelne funktionelle Gruppen sind und somit einen sogenannten Fingerprint des Moleküls darstellen [30].

Neben der IR-Spektroskopie dient auch die Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) der Identifizierung und Strukturaufklärung organischer und anorganischer Verbindungen. Biochemische Anwendungsbereiche dieser Methode sind die Aufklärung von 3-D Strukturen von Proteinen, die Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen sowie die Charakterisierung von Biosyntheseprozessen. Grundsätzlich werden bei der Kernspinresonanzspektroskopie Informationen über Atomkerne und deren Umgebungen erhalten, wodurch Rückschlüsse auf die chemische Struktur des Moleküls möglich sind. Die Bedingung für diese Messungen ist das Vorliegen eines Kernspins bei einzelnen Atomen einer Verbindung, dessen Größe durch die Kernspinquantenzahl beschrieben ist. Das Prinzip der kernmagnetischen Resonanz beruht auf der Wechselwirkung eines Systems von Kernspins mit einem statischen Magnetfeld und zeitlich veränderlichen Magnetfeldern. Da diese Methode auch in vivo angewendet werden kann, wird die Kernspintomographie in der Medizin als bildgebendes Verfahren verwendet. Darüber hinaus wird die in vivo Spektroskopie für begrenzte Körperregionen zur gezielten Analyse wie beispielsweise zur Untersuchung von Hautregionen genutzt [30-32].

Zwei weitere bildgebende Analyseverfahren sind die **Sonographie** und die **Optische Kohärenztomografie** (OCT). Das Prinzip der Sonographie beruht auf der an Molekülstrukturen wirksam werdenden mechanischen Energie durch die Ausbreitung von Schallwellen. Diese "verloren gegangene" Energie führt zu einer

18

Temperaturerhöhung des beschallten Mediums, die mit dem Absorptionsquotienten der unterschiedlichen Gewebe (niedriger Quotient für Flüssigkeiten, hoher Quotient für beispielsweise Knochen) korreliert. Grundsätzlich ist der entscheidende Bildgebungsparameter die unterschiedliche Schallfähigkeit von Gewebe [33, 34]. Die OCT-Technologie basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie die Sonographie, nur dass Schallwellen Lichtstrahlenbündel verwendet werden. anstatt von Dieses Messverfahren dient der Entfernungsmessung reflektierender physikalische Materialien mit Hilfe der Interferometrie (Messung der Überlagerung von Lichtwellen) mit kurzkohärentem Licht. Das verwendete Licht, das beispielsweise von einer Superlumineszenzdiode emittiert wird, hat eine Wellenlänge von 850 nm und wird für die Analyse in zwei Teile geteilt. Ein Teil des Lichtes gelangt zum Untersuchungsobjekt und der andere Teil in einen Referenzstrahlengang bekannter Länge. Anschließend wird das rückgestreute Licht mit dem rückgestreuten Referenzlicht definierter optischer Länge überlagert. Für die einfach rückgestreuten Photonen entstehen Interferenzmodulationen, die der Tiefe des Objektes zugeordnet werden können. Die Tiefenabtastung wird durch die definierte Veränderung der Länge des Referenzweges erreicht. Somit repräsentiert ein OCT-Bild die Amplitude optischer Rückstreuung von Gewebe [35].

3.3. Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie zählt wie die IR-Spektroskopie zu den schwingungsspektroskopischen Methoden. Grundsätzlich basieren beide Techniken auf der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung und Materie, die allerdings auf unterschiedlichen physikalischen Ursachen beruhen. Bei der IR-Spektroskopie handelt es sich, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, um einen Absorptionsprozess, bei dem der Anteil des direkt absorbierten Lichts gemessen wird. Bei der Raman-Spektroskopie handelt es sich um einen Streuprozess, bei dem der inelastisch gestreute Lichtanteil detektiert wird. Den experimentellen Nachweis dieser Raman-Streuung lieferte 1928 der indische Physiker C.V. Raman, der 1930 dafür den Nobelpreis erhielt [36].

Im Gegensatz zu invasiven Analysemethoden ermöglicht es die Raman-Spektroskopie als zerstörungs- und markerfreies Verfahren, Zellen und Gewebe in ihrer natürlichen Umgebung und ohne Prozessierung zu untersuchen. Es sind weder Probenvorbereitungen noch die Suche nach geeigneten Markern notwendig. Ferner könnten durch eine stetige Überwachung der Eigenschaften von biologischen Proben frühzeitige Veränderungen detektiert werden.

Die Raman-Spektroskopie zeigt aber auch im Gegensatz zu anderen nicht invasiven Methoden Vorteile wie beispielweise gegenüber Anwendung der IR-Spektroskopie, die für die nicht invasive Charakterisierung lebender Zellen oder in vitro kultivierter Konstrukte nicht geeignet ist, da Wasser ein relativ starkes IR-Signal liefert, das die Messung stören könnte. Die Raman-Spektroskopie hingegen hebt sich von der IR-Spektroskopie durch die Möglichkeit der Analyse von wässrigen Systemen ab [37]. Die herkömmlichen Diagnostikmethoden in der Medizin sind nur einige der oben beschriebenen bildgebenden Verfahren, die auf die Charakterisierung von Gewebestrukturen und extrazellulärer Matrix fokussieren. Anhand dieser Verfahren werden die Strukturen der Konstrukte wiedergegeben, allerdings kann nur eine stark eingeschränkte Aussage über den Zustand der Zellen gemacht werden. Die Raman-Spektroskopie ist für die Analyse der unterschiedlichsten Zelleigenschaften sowie für die Charakterisierung verschiedenster Gewebe in vivo als auch in vitro in der Literatur beschrieben [38-41]. Aus diesem Grund wurde das Anwendungspotential der Raman-Spektroskopie als nicht invasives Diagnosewerkzeug in der Regenerativen Medizin innerhalb dieser Arbeit überprüft.

3.3.1. Theorie der Raman-Spektroskopie

Für die Detektion von Raman gestreutem Licht wird eine Probe mit monochromatischem Licht (Laser) bestrahlt, wodurch diese Strahlung an den Molekülen abgelenkt und in alle Raumrichtungen gestreut wird. Voraussetzung für das Auftreten des Raman-Effektes ist im Gegensatz zur IR-Spektroskopie die Änderung der Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingung. Unter der Polarisierbarkeit wird das Maß der Deformierbarkeit der Elektronenwolke um ein Molekül oder Atom verstanden. Besonders eignet sich die Raman-Spektroskopie zur Charakterisierung von unpolaren bzw. wenig polaren Verbindungen, wie z.B. C=C, C=C, N=N, C-C, O-O, S-S sowie von C-Ringen [42].

Grundsätzlich werden drei Arten von Streuung beobachtet. Als Rayleigh-Strahlung wird die elastisch gestreute elektromagnetische Strahlung bezeichnet, deren Frequenz exakt der Frequenz der Anregungswellenlänge entspricht und die am wahrscheinlichsten eintritt. Da die Energie eines Strahlungsquants direkt abhängig von der Frequenz der Strahlung ist, ändert sich die Energie des Photons bei einer elastischen Streuung nicht (siehe Formel (3.1)) [43].

E = hv

Da bei dieser elastischen Streuung kein messbarer Energieaustausch zwischen Photon und Molekül stattfindet und somit keine Informationen über die Probe in dieser Streuung enthalten sind, wird diese gewöhnlich zur Messung der Raman-Streuung, aus dem gestreuten Licht herausgefiltert. Der sehr viel geringere Anteil der Strahlung (~1 von 10⁶-10⁸ Photonen) wird inelastisch an den Molekülen gestreut und erfährt dadurch, wie in Abbildung 3-4 dargestellt, eine Energiezu- oder abnahme. Die sogenannte Stokes-Strahlung besitzt im Vergleich zum anregenden Licht eine geringere Energie und die sogenannte Anti-Stokes-Strahlung zeichnet sich durch eine im Vergleich zum anregenden Licht höhere Energie aus.



Abbildung 3-4: Schematische Erklärung der verschiedenen Raman-Streuungen. Unterschieden werden die Rayleigh Streuung, die Stokes Streuung und die Anti-Stokes Streuung (verändert nach [29]).

Diese Energieverschiebungen wirken sich folglich auf die Wellenlänge des gestreuten Lichts im Verhältnis zur Anregungswellenlänge aus, die als Raman-Shift bezeichnet und als Wellenzahl in cm⁻¹ angegeben werden (siehe Formel 3.2).

(3.1)

$$\widetilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$
(3.2)

Wenn ein Photon auf ein Molekül im elektronischen Grundzustand trifft, geht dieses in einen virtuellen Zustand zwischen Grundzustand und erstem angeregten Elektronenzustand über. Da dieser Prozess nicht gequantelt ist, kann die Energie des Moleküls in Abhängigkeit von der Strahlungsfrequenz der Quelle jeden beliebigen Zustand zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem niedrigsten elektronischen Grundzustand annehmen. Durch den darauffolgenden Energieübergang in ein Schwingungsniveau oberhalb des Grundzustands, kommt es durch den Energieverlust ΔE des anregenden Photons zu einem Stokes-Shift der eingebrachten Strahlung (siehe Formel 3.3 und Abbildung 3-4).

$$\Delta E = h(v_0 - v_s) \tag{3.3}$$

Befindet sich ein Molekül in einem angeregten Elektronenzustand wie beispielsweise bei erhöhter Temperatur, dann kehrt sich dieser Prozess um. Das Molekül gibt seine Schwingungsenergie ΔE an das anregende Photon ab, wodurch das Molekül seinen Energiegrundzustand einnimmt und das streuende Photon dadurch eine geringere Wellenlänge als die Anregungsstrahlung hat (siehe Formel 3.4).

$$\Delta E = h(v_0 + v_s) \tag{3.4}$$

Die Energie, die bei der inelastischen Streuung abgegeben oder aufgenommen wird, entspricht der Differenz zwischen zwei Energieniveaus einer Molekülschwingung. Da sich die Moleküle bei einer Anti-Stokes Streuung bereits in einem unwahrscheinlicheren höheren Energieniveau befinden müssen, ist die Stokes Streuung wahrscheinlicher und dadurch intensiver und wird aus diesem Grund in dieser Arbeit verwendet.

In einem Raman-Spektrum werden normalerweise der Raman-Shift, d.h. die Wellenlängenverschiebung über die Intensität des Raman-Signals aufgetragen. Da der Betrag dieser Raman-Verschiebungen unabhängig von der anregenden Wellenlänge ist, werden trotz der Verwendung verschiedener Anregungslaser identische Verschiebungsmuster erhalten. Die Energie- bzw. Wellenzahlverschiebungen entsprechen den Schwingungsfrequenzen der Moleküle, die unter anderem von den in den Molekülen vorhandenen Atommassen (μ), der

22

Kraftkonstante (k), dem Aggregatzustand sowie von elektronischen Effekten abhängen (siehe Formel 3.5) [42].

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$
(3.5)

Die Schwingungsfrequenz ist laut Formel 3.5 proportional zur Kraftkonstanten. Für die Bindungsstärke von Kohlenstoff-Atomen gilt beispielsweise der folgende Zusammenhang: $k_{C=C} > k_{C-C}$

Die Intensität der Raman-Bande hingegen hängt, wie aus Formel 3.6 ersichtlich, von der Frequenz und Intensität der anregenden Laserstrahlung sowie von der Konzentration des Moleküls und der Polarisierbarkeitsänderung ab.

$$I \propto v_{ex}^{4} I_0 n (\frac{\partial \alpha}{\partial r})^2$$
(3.6)

Den größten Einfluss auf die Intensität des Raman-Signals hat die Frequenz der anregenden Laserstrahlung. Je größer die Anregungsfrequenz, d.h. je kleiner die Wellenlänge ist (siehe Formel 3.2), desto größer ist die Intensität der Raman-Banden. Die Verwendung eines 532 nm Lasers resultiert also im Gegensatz zu einem 785 nm Lasers in einer höheren Intensität der Raman-Banden. Allerdings wurde in dieser Arbeit, um eine Schädigung der Probe sowie eine Anregung von Fluoreszenz während der Messung zu vermeiden, ein Laser mit einer Anregungswellenlänge im nahen IR-Bereich (785 nm) verwendet und somit ein geringeres Raman-Signal in Kauf genommen. Des Weiteren verhält sich die Intensität der Raman-Banden proportional zum Quadrat der Polarisierbarkeitsänderung. Nicht alle Moleküle lassen sich Raman spektroskopisch vermessen, da ein Raman-Signal nur bei Raman-aktiven, d.h. Verbindungen mit symmetrischen Valenzschwingungen, zu beobachten sind. Asymmetrische Schwingungen führen zu keiner Polarisierbarkeitsänderung und zeigen somit kein Raman-Signal. Diese Schwingungen können allerdings mit der IR-Spektroskopie detektiert werden [29]. Außerdem geht aus Formel 3.6 hervor, dass anhand der Intensitäten der Raman-Banden auch quantitative Aussagen gemacht werden können, da die Intensität direkt proportional der Konzentration eines Moleküls ist.

3.3.2. Techniken der Raman-Spektroskopie

Grundsätzlich ist die inelastische Streuung ein seltenes Ereignis, was sich durch die sehr geringen Streuquerschnitte des spontanen Raman-Prozesses widerspiegelt. Daher gibt es neben der konventionellen Raman-Spektroskopie einige nicht-lineare Raman-Verfahren, die im Folgenden erklärt werden.

Die Kohärente Anti-Stokes Raman-Spektroskopie (Coherent anti-stokes Raman spectroscopy, CARS) beruht auf einer besonderen Anregungsart. Grundsätzlich werden bei dieser Methode zwei Laser benötigt. Die Moleküle werden hierbei so angeregt, dass überwiegend Anti-Stokes Streuung auftritt. Zuerst wird das Molekül durch ein Photon in einen angeregten virtuellen Zustand und dann über das zweite dem elektronischen Grundzustand Photon in einen übergeordneten Schwingungszustand versetzt. Anschließend wird das Molekül durch ein Photon angeregt und es wird Anti-Stokes Streuung emittiert, die dann detektiert wird. Die Vorteile dieser Methode sind im Vergleich zur klassischen, spontanen Raman-Mikroskopie, die um mehrere Größenordnungen intensiveren Raman-Signale und die Unempfindlichkeit gegenüber störenden Fluoreszenzsignalen. Die Nachteile dieses Verfahrens im Gegensatz zur klassischen Raman-Spektroskopie sind die kostenintensivere Ausrüstungen und der höhere experimentelle Aufwand [29, 44].

Unter der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) wird die Aufnahme normaler Raman-Spektren von Proben verstanden, die an Oberflächen kolloidaler Metallpartikel oder an aufgerauhten Oberflächen entsprechender Metallteile adsorbiert sind. Dieser Effekt kann einerseits durch die Oberflächen-Plasmon-Resonanz und andererseits durch die chemische Verstärkung, die durch eine Bindung zwischen Molekül und Metall zustande kommt, erklärt werden. Eine Verstärkung des Raman-Signals um den Faktor 10³ bis 10¹⁴ kann aufgrund des adsorbierten Moleküls erreicht werden [45,29,46].

Die Resonanz Raman-Streuung beruht auf dem Phänomen, dass die Intensitäten der Raman-Banden stark zunehmen, wenn mit Wellenlängen, die nahe der Absorptionsbanden für die elektronische Anregung des Analyten liegen, angeregt wird. Ein abstimmbarer Laser ist für Resonanz-Raman-Messungen notwendig, um die größtmögliche Signalverstärkung zu erhalten. Die Größe der Raman-Banden, die von symmetrischen Schwingungen stammen, nimmt um den Faktor 10² bis 10⁶ zu. Daher lässt diese Methode die Bestimmung von Analyten mit einer Konzentration von 10⁻⁸ M (0,1 M bei normalen Raman-Messungen) zu [47, 29].

3.3.3. Raman-Spektroskopie an biologischem Material

Die Raman-Spektroskopie wird schon seit langem erfolgreich zur Analyse von chemischen Materialien eingesetzt. Erste Publikationen zum Einsatz dieser spektroskopischen Methode zur Charakterisierung lebender Zellen wurden 1990 veröffentlicht [48]. Grundsätzlich bietet diese physikalische Methode den großen Vorteil, biologisches Material kontaktfrei und im Gegensatz zu herkömmlichen Analysemethoden nicht invasiv zu untersuchen. Darüber hinaus zeichnet sich diese Methode durch ihren geringen Zeitaufwand sowohl in der Probenvorbereitung als auch in der Messung selber aus. Diese vorteilhaften Eigenschaften der Raman-Spektroskopie zeigen, dass diese Technologie ein hohes Potential hat, um in Gebieten wie der Diagnostik, der Qualitätskontrolle von biologischen Systemen und als Charakterisierungsmethode für zellbiologische Fragestellungen zum Einsatz zu kommen. Außerdem erhöhen die stetigen Entwicklungen in der Lasertechnologie die Optimierung der Detektionssysteme die Praxisrelevanz sowie dieser spektroskopischen Methode.

Neben der Analyse von mikrobiellen Proben sind die Charakterisierung von Zellen sowie von komplexen Geweben potentielle Anwendungsfelder der Raman-Spektroskopie. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Unterscheidung verschiedener Mikroorganismen, die Differenzierung von Mikroorganismen und Zellen, sowie die Bestimmung unterschiedlicher zellulärer Eigenschaften mittels Raman-Spektroskopie möglich ist [39, 49-51].

Besonders die zelluläre Charakterisierung mittels Raman-Spektroskopie wurde bereits von einer Reihe von Arbeitsgruppen untersucht. Neben der Detektion chemischer Veränderungen während des Zellzyklus konnten unterschiedliche Vitalitätsstadien von Zellen Raman spektroskopisch bestimmt werden [49, 52-55]. Des Weiteren konnte durch das Abrastern von Zellen mit Hilfe eines Lasers die Verteilung zellulärer Bestandteile gezeigt werden [56-58]. Die Unterscheidung von sowohl gesundem und krankem Gewebe als auch Zellen konnte anhand unterschiedlicher Krankheitsbilder wie beispielsweise Krebs, Alzheimer oder Morbus Crohn belegt werden [59-75]. Außerdem wurden die Zusammensetzungen verschiedenster extrazellulärer Matrizes mit dem Raman-Spektrometer bestimmt [76-79].

25

Um die teilweise nur sehr geringen Unterschiede von sehr ähnlichen Zellen innerhalb der Raman-Spektren detektieren zu können, müssen spezielle Auswertemethoden angewendet werden, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

3.4. Multivariate Datenanalyse

Für die Auswertung von großen Datensätzen wird seit vielen Jahren die multivariate Datenanalyse verwendet [80]. Einerseits dient diese Analyse der Einordnung und Klassifizierung von Daten (Hauptkomponentenanalyse, Diskriminanzanalyse) andererseits handelt es sich hierbei um eine Regressionsmethode (Support Vector Machine, Partial Least Square Regression, Principal Component Regression). Grundsätzlich sind die Ziele dieser Methode die Datenreduktion, die Trennung von Informationen und Nicht-Informationen z.B. Entfernen von Rauschen, das Erkennen von Ausreißern und die Vorhersage unbekannter Proben [81]. Gerade für die Auswertung spektroskopischer Daten wird diese Technik sehr häufig angewendet, da durch die Messung von nur einem Spektrum bis zu 1000 Einzelwerte vorliegen können. Aus diesem Grund wurden die Datensätze der Raman-Spektren mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ausgewertet und durch die Anwendung der Support Vector Machine klassifiziert.

3.4.1. Theorie der Hauptkomponentenanalyse

Das Prinzip der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) Berechnung der Hauptkomponenten (Faktor) beruht auf der aus dem Ausgangsdatensatz (Matrix X, mit N Objekten [z.B. Proben] und M Eigenschaften [z.B. Variablen]), indem die ursprünglichen Daten als Linearkombinationen, d.h. als Eigenvektoren und zugehörige Eigenwerte der Datenmatrix betrachtet werden. Daraus entsteht eine Faktorenmatrix (P), wobei jede Hauptkomponente eine Spalte der Matrix P bildet und die Anzahl der Zeilen durch die Ausgangsmatrix festgelegt wird. Als Loadings werden dabei die Elemente der Spalten der Matrix P genannt. Durch den Eigenwert wird bestimmt wie hoch der Anteil der Hauptkomponente an der Gesamtvarianz der Ausgangsdaten ist, d.h. je höher der Eigenwert, desto mehr Gesamtvarianz wird erklärt und desto wichtiger ist die Hauptkomponente für die Beschreibung der Ausgangsdaten [81]. Der nächste Schritt dieser Analyse besteht darin, die Originaldaten in einen neuen Faktorenraum zu transformieren, d.h. innerhalb eines neuen Faktorenkoordinatensystems zu beschreiben, indem für jedes Objekt seine Koordinaten berechnet werden. Durch die Abbildung jedes Objekts auf jeden Faktor werden die Koordinaten erhalten, die Scores genannt werden. Die Matrix T wird dadurch von den Scores gebildet, die genauso viele Zeilen wie die Matrix P Objekte hat und die Anzahl der Spalten entspricht der Dimension des neuen Koordinatensystems also der Anzahl der Hauptkomponenten.

Werden allerdings für die Analyse der Daten weniger Hauptkomponenten verwendet als aufgrund der Anzahl der Originalvariablen möglich wäre, so wird die Residuenmatrix (E_M) gebraucht. Diese Matrix E_M enthält den Anteil der Originaldaten, der durch die Hauptkomponenten nicht erklärt wird. Je mehr Hauptkomponenten berechnet werden, desto kleiner werden die Werte in der Matrix E_M . Entspricht die Anzahl der Hauptkomponenten der Anzahl der Originalvariablen, so sind die Werte der Matrix E_M gleich Null. Häufig enthält diese Matrix nur sehr unwichtige Informationen wie beispielweise das Rauschen.

Für die Berechnung der Hauptkomponenten und Loadings gilt der Zusammenhang, der in Abbildung 3-5 dargestellt ist, wobei von einer mittenzentrierten Ausgangsmatrix ausgegangen wird (siehe Formel 3.7).

$$x(zentriert)_{iz} = x(original)_{iz} - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} x(original)_{iz}$$
(3.7)



Abbildung 3-5: Matrizen der Hauptkomponentenanalyse. X= mittenzentrierte Originaldatenmatrix, N= Anzahl der Proben, M= Anzahl der Variablen, T= Scoresmatrix, P= Loadingsmatrix, A= Anzahl der Hauptkomponenten, E_M = Residuenmatrix (verändert nach [81]).

Ganz allgemein wird das Hauptkomponentenmodell auch durch die folgende Formel beschrieben:

$$X = TP^{T} + E_{M}$$
(3.8)

Wird davon ausgegangen, dass die Mittenzentrierung der Datenmatrix schon vorangegangen ist, so kann das Hauptkomponentenmodell auch wie folgt als lineares additives Modell formuliert werden.

$$x_{iz} = x_{mittel,z} + \sum_{a=1}^{A} t_{ia} p_{za} + e_{iz(A)}$$
(3.9)

Anhand von Formel 3.9 wird deutlich, dass der Informationsgehalt der Hauptkomponenten nacheinander hinzugefügt wird, d.h. je mehr Hauptkomponenten berechnet werden, desto kleiner wird der Anteil des Residuenterms.

3.4.2. Graphische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse

Die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Hauptkomponentenanalyse wird in diesem Abschnitt durch eine graphische Darstellung verdeutlicht. Wie bereits oben beschrieben, ist das Ziel der PCA die Datenreduktion und Klassifizierung, die in Abbildung 3-6 am Beispiel von nur zwei Hauptkomponenten veranschaulicht wird.



Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der Hauptkomponentenanalyse (verändert nach [49, 81]) (A) Originaldaten im ursprünglichen Koordinatensystem, (B) Projektion der Originaldaten (rot) auf die Gerade mit der Richtung der maximalen Varianz der Daten (blau) (PC1), (C) Projektion der Originaldaten (rot) auf die Gerade in Richtung der maximalen Varianz der Daten (blau) orthogonal zur ersten Hauptkomponente (PC2), (D) Festlegung des Einheitskreises und Zuweisung der neuen Koordinaten (Scores).

Der erste Schritt in der Analyse von komplexen Datensätzen ist die Ermittlung der Richtung der maximalen Varianz, indem die Datenpunkte innerhalb des ursprünglichen Koordinatensystems so auf eine Gerade projiziert werden, dass der Unterschied zwischen den Datensätzen am deutlichsten ist (Abbildung 3-6 B). Diese Gerade ist die erste Hauptkomponente (Principal Component 1 auch PC1) und eine Achse des neuen Koordinatensystems. Die Hauptkomponente verdeutlicht, dass es sich um zwei Gruppen handelt und erklärt die größtmögliche Variation innerhalb des Datensatzes (siehe Abbildung 3-6 B). Die zweite Hauptkomponente (PC2), d.h. die zweite Achse des neuen Koordinatensystems muss orthogonal auf der ersten Achse stehen und wird so durch die erste Achse gelegt, dass der Nullpunkt des neuen Koordinatensystems durch den Schwerpunkt aller Daten bestimmt wird. Die Richtung der PC2 wird erneut durch die Richtung der verbliebenen maximalen Varianz festgelegt (siehe Abbildung 3-6 C). Die Scores sind die Projektionen der Datenpunkte auf die Hauptkomponenten, d.h. die neuen Koordinaten der Ausgangsdaten. Die Einheiten des neuen Koordinatensystems werden so festgelegt, dass der Schnittpunkt des Einheitskreises mit den Achsen den Betrag Eins erhält (siehe Abbildung 3-6 D). Die Richtungen der Hauptkomponenten im ursprünglichen Koordinatensystem geben die Loadings der einzelnen Hauptkomponenten an. Ein hoher Loadingswert bedeutet, dass die Hauptkomponente stark in die Richtung einer bestimmten Variablen zeigt und dass diese Variable somit am wichtigsten für die Richtung der Hauptkomponente ist. Im Gegensatz dazu zeigt ein geringer Loadingswert, dass eine bestimmte Variable nur einen geringen Einfluss auf die Richtung der Hauptkomponente hat.

Neben der Bestimmung der Werte für die Scores and Loadings ist es für die Hauptkomponentenanalyse wichtig, Aussagen über die erklärte Varianz zu machen. Dabei wird für jede Hauptkomponente angegeben, wie viel Prozent der Varianz des Datensatzes durch diese Komponente erklärt ist.

3.4.3. Theorie und graphische Darstellung der Support Vector Machine

Die Support Vector Machine (SVM) bietet neben einer Klassifizierung den Vorteil der Vorhersage von Daten (Regression), d.h. es handelt sich um einen trainierbaren Klassifikator. Jeder Datenpunkt wird durch einen Vektor in einem Vektorraum beschrieben. Bekannte Daten werden nach einem "Lernprozess" in verschiedene Kategorien eingeteilt und der einfachste Fall ist die Unterscheidung von nur zwei Kategorien. Grundsätzlich verwendet die SVM zwei verschiedene Konzepte, die "Large Margin Separation" (Breiter-Rand-Klassifikator) und die Kernel-Funktion.

Die Trennung mit Hilfe des Breiter-Rand-Klassifikators kann durch die Klassifizierung von linear trennbaren Datenpunkten motiviert sein, indem eine trennende Hyperebene zwischen zwei Datenpunktgruppierungen gelegt wird. Die eine Gruppe wird positiv und die andere Gruppe negativ genannt. Dabei ist es wichtig, dass der Abstand der Hyperebene zu den Datenpunkten, die der Hyperebene am nächsten sind, maximal ist. Dadurch wird sichergestellt, dass nicht nur der Trainingsdatensatz sondern auch die zukünftigen unbekannten Datenpunkte richtig klassifiziert werden. Die Punkte, die der Hyperebene am nächsten liegen, werden Support Vectors (Stützvektoren) genannt, die in Abbildung 3-7 gekennzeichnet sind. Nur diese Vektoren beeinflussen die Lage der Hyperebene, wobei alle anderen Datenpunkte keinen Einfluss auf die Position haben. Für dieses Konzept ist nicht die exakte Lage der Datenpunkte ausschlaggebend sondern nur die relative Position bzw. die Ähnlichkeit der Datenpunkte untereinander.



Abbildung 3-7: Graphische Erklärung der Large Margin Separation einer SVM. w= Gewichtungsvektor (verändert nach [82])

Die Entscheidungsfunktion für die Berechnung der SVM ist in Formel 3.10 beschrieben.

$$f(x) = \langle w, x \rangle + b \tag{3.10}$$

Für die trennende Hyperebene gilt f(x) = 0 und für die Trennspanne (engl. Margin) zwischen den Stützvektoren gilt $-1 \le \langle w, x \rangle + b \le 1$. Für die Stützvektoren, die wie beschrieben, genau an den Rändern der Margin liegen gilt f(x) = -1 und f(x) = 1. Ein neues Objekt wird also je nach Vorzeichen von f(x) einer der beiden Klassen zugeordnet.

Das zweite Konzept ist die Kernel-Methode, die bei nicht linear trennbaren Daten Verwendung findet und bei der die Ähnlichkeit zwischen zwei Datenpunkten berechnet wird. Das Ziel der Kernel-Methode ist es, den Vektorraum sowie die Trainingsvektoren so in einen mehrdimensionalen Raum zu überführen, so dass die verschachtelten Vektoren linear trennbar werden. In diesem höherdimensionalen Raum wird daraufhin die trennende Hyperebene bestimmt. Diese Hyperebene wird dann durch die Rücktransformation in den niedrigerdimensionalen Raum zu einer Hyperfläche, die die Vektoren linear trennt. [82, 83]

Berechnung der Sensitivität und Spezifität

Um diese Klassifikatoren bewerten zu können, eignet sich die Berechnung der Sensitivität und Spezifität. Diese Werte sind gerade für die klinische Diagnostik wichtig, da anhand der Sensitivität (Empfindlichkeit) einer Methode die Fähigkeit bestimmt wird, Kranke als krank zu identifizieren. Die Spezifität (Genauigkeit) einer Testmethode ist die Fähigkeit, Gesunde als gesund zu identifizieren. Beide Werte werden in Prozent angegeben und durch den Vergleich des Testresultats mit der "wahren Diagnose" beispielsweise aufgrund einer Biopsie, ermittelt. Diese Ergebnisse werden herkömmlicherweise in einer sogenannten Vier-Felder-Tabelle dargestellt, die die vier möglichen Aussagen zusammenfasst [84].

Tabelle	3-1:	Vier-Felder-Tabelle

	krank	gesund
Test positiv	richtig positiv (r _P)	falsch positiv (f⊳)
Test negativ	falsch negativ (f _N)	richtig negativ (r _N)

Die Sensitivität berechnet sich nach Formel 3.11.

$$Sensitivität = \frac{r_P}{r_P + f_N}$$
(3.11)

31

Die Spezifität berechnet sich nach Formel 3.12.

$$Spezifität = \frac{r_N}{r_N + f_P}$$
(3.12)

Diese beiden Werte sind im Zusammenhang mit der Diagnostik von Produkten der Regenerativen Medizin mittels Raman-Spektroskopie wichtig, um die Zuverlässigkeit der Raman-Spektren bestimmen zu können.

4. Material und Methoden

In den folgenden Abschnitten ist eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte gegeben. Ferner werden die angewendeten Methoden beschrieben.

4.1. Materialien und Geräte

Die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen sowie die biologischen Materialien sind in den folgenden Unterpunkten genannt.

4.1.1. Verwendete Geräte

Die Laborgeräte, die für die Anfertigung dieser Arbeit notwendig waren, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Gerät	Kennzeichnung	Hersteller	Firmensitz
Abzug	Faz 1	Waldner Laboreinrichtungen	Wangen im Allgäu, D
	Einbettautomat	Shandon	Frankfurt, D
	GE 66	Getinge Skärhamm AB	Skärhamm, SE
Autoklav	Тур 24	Melag	Lugano, I
	FEDEGARI FVS/3	Fedegari	Berlin, D
Becherglas, Glas und Kunststoff	diverse Größen	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG	Eberstadt, D
CCD Kamera	F-View	Soft Imaging Systems	Münster, D
	DU420A-BR-DD	Andor	Belfast, IE
Cryotom	CM3000	Leica	Nussloch, D
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Einbettautomat	Citadell 1000	Shandon	Frankfurt a.M., D
Eismaschine	UBE 125	Ziegra	Isernhagen, D
Feinwaage	200A	Sartorius AG	Göttingen, D
Feuchtekammer	Humidity Chamber	Tissue Gnostics GmbH	Wien, A
Folienschweißgerät	Melaseal	Aelaseal Melag	
Gefrierschrank -20°C -80°C	Hera freeze	Liebherr Heraeus	Bulle, CH Hanau, D
Glaspipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Hirschmann	Eberstadt, D

Tabelle 4-1: Verwendete Geräte

Gerät	Kennzeichnung	Hersteller	Firmensitz
Heißluftsterilisator	ST-5050	Heraeus	Hanau, D
Kamera	AxioCam HRC	Zeiss	Göttingen, D
Kühlplatte	Model No. 2084	Bavimed Laborgeräte	Birkenau, D
Kühlschrank		Liebherr	Biberach a. d. Riss, D
Küvetten		Assistent	Sondheim, D
Kryobox Mr. Frosty		Nalgene	Roskilde, DK
Laborflaschen	diverse Größen	Schott AG	Mainz, D
Laminar Flow	Herasafe KS Heraguard	Thermo Scientific	Schwerte, D
Laser	dfBeam-785-s	Toptica Photonics AG	München, D
Linienstrahler	Pen-Ray, Xenon	LOT-Oriel	Darmstadt, D
Magnetrührer	MR Hei-Tec	Heidolph Instruments	Schwabach, D
Messkolben	diverse Größen	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG	Eberstadt, D
Messzylinder	diverse Größen	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG	Eberstadt, D
	IX 71	Olympus	Hamburg, D
Mikroskop	Axio Vert 200M	Zeiss	Göttingen, D
	FXA	Nikon	Düsseldorf, D
Neubauerzähl- kammer		Marienfeld	Lauda-Königshofen, D
Objektiv	UPlanSApo, 60x, 1,2W	Olympus	Hamburg, D
Objektträgerkörbe		Assistent	Sondheim, D
Paraffinspender (61°C) T	Тур 47311	Medax Nagel	Kiel, D
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo	Schwarzbach, CH
Pinzetten	diverse Größen	Assistent	Sondheim, D
	Multipette	Eppendorf	Hamburg, D
Pipette	Reference 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg
	Vollpipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand	Wertheim
Pipettenstopfgerät	Technoplug	Tecnomara AG	Zürich, Ch
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences	Fernwald, D
Präzisionswaage	Precisa 4000C	Sartorius AG	Göttingen, D

Gerät	Kennzeichnung	Hersteller	Firmensitz
Daman Spaktromator	Eigenentwicklung	Fraunhofer IPM, IGB	Freiburg, Stuttgart, D
	inVia Raman microscope	Renishaw	Gloucester, UK
Rotationsmikrotom	RM 2145	Leica	Nussloch, D
Rührfische		Assistent	Sondheim, D
Septophag		Hesse	Emmerich, D
Spektrograph	HoloSpec f/1.8	Kaiser Optical Systems	Ann Arbor, US
Skalpellklingenhalter		Assistent	Sondheim, D
Spatel		Assistent	Sondheim, D
Spülmaschine	Desinfector Automatic G7735	Miele	Pieterlich, CH
	Hamo DS	Hamo	Pieterlich, CH
Stickstoffbehälter für Langzeitkon- servierung	Biosafe®MD	Messer Cryotherm	Kirchen, D
Streckbad für Paraffinschnitte		Medax Nagel	Kiel, D
Vakuumpumpe		neoLab GmbH	Heidelberg, D
Vortexer	VF2	Janke & Kunkel	Staufen, D
Wärmeschrank		Memmert	Schwabach, D
Wasseraufarbeitungs- anlage	Super Q	Millipore	Eschborn, D
Wasserbad	U3	Julabo	Seelbach, D
Zellzählgerät	Casy-1	Schärfe Systems	Reutlingen, D
	Multifuge 3 S-R	Heraeus	Hanau, D
Zontrifuco	Cytospin 3	Heraeus	Hanau, D
Zenthuye	Centrifuge 5415 R	Eppendorf	Hamburg, D
	Centrifuge 5415 C	Eppendorf	Hamburg, D

Für die Raman spektroskopischen Untersuchungen der vitalen Zellen und der Kryoschnitte sind zwei verschiedene Raman-Spektrometer verwendet worden, die im Folgenden beschrieben werden.

a) Eigenentwicklung

Das Raman-Spektrometer, das für die Untersuchungen der vitalen Zellen Verwendung fand, entstand in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik (IPM) in Freiburg. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 4-1 gezeigt. Dieses Gerät kombiniert ein kommerziell erhältliches Mikroskop mit einem Raman-Spektrometer. Der Raman-Aufbau ist mit einem 785 nm

Laser (Ausgangsleistung 85 mW), einem Notch-Filter, einem Spektrographen und einer CCD-Kamera ausgestattet (Details siehe Tabelle 4-1). Für die Fokussierung des Lasers auf die Probe wird ein 60x Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur (NA) von 1,2 verwendet.



Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau des Raman-Spektrometers [49]

Der Strahlengang des Lasers ist in Abbildung 4-2 dargestellt und wird mit Hilfe der folgenden Einzelteile auf die Probe fokussiert.



Abbildung 4-2: Strahlengang des Lasers des Raman-Spektrometers [49]

Der Laserstrahl wird über Umlenkspiegel in einen optischen Isolator geführt, der bei einer eventuellen Reflexion des Laserstrahls die Beschädigung des Lasers verhindert. Um eventuell auftretende Randfrequenzen abzuschirmen, wird der Laserstrahl über einen Polarisator linear polarisiert. Danach erfolgt die Aufweitung des Laserstrahls über zwei Beam-Expander, um eine optimale Ausleuchtung des verwendeten Objektivs zu erzielen. Ein Shutter ist zwischen die beiden Strahlaufweiter eingebaut, damit der Laserstrahl bei Bedarf blockiert werden kann. Dieser Laserstrahl wird dann über einen Sideport an den Strahlengang des Mikroskops gekoppelt und durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Das von der Probe gestreute Licht gelangt durch denselben Strahlengang des Mikroskops auf einen Notch-Filter, an dem die Anregungswellenlänge reflektiert wird. Dieser Filter lässt also nur das Raman gestreute Licht durch, welches über zwei Umlenkspiegel in den Spektrographen gelangt. Durch ein holographisches Gitter wird dieses wellenlängenveränderte Licht spektral zerlegt und in einer für den nahen IR-Bereich optimierten CCD-Kamera detektiert. Die zweite CCD-Kamera, die an das Mikroskop angeschlossen ist, sowie die Software cellB (Olympus, Münster, D), dienten der Aufnahme des mikroskopischen Bildes. Für die Aufnahme der Spektren wird die Software des Kameraherstellers (Andor SOLIS for Imaging, Andor, Belfast, UK) verwendet.

b) inVia Raman-Mikroskop

Die Analyse von Kryoschnitten erfolgte mittels des inVia Raman-Mikroskops (Renishaw), an der QUT, Chemistry Department, (Brisbane, AUS). Dieses handelsübliche Raman-Mikroskop verfügt über einen 785 nm Laser und im Gegensatz zum eigenentwickelten Aufbau, über einen Linienlaser mit einer Fokuslänge von ca. 20 µm. Ferner handelt es sich um ein Auflichtmikroskop, das mit einem 50x short distance Luftimmersionsobjektiv ausgestattet ist. Da es sich um ein handelsübliches Gerät handelt, wird der Strahlengang dieses Aufbaus nicht weiter erläutert.

4.1.2. Verwendete Verbrauchsmaterialen

Alle notwendigen Verbrauchsmaterialen sind in der folgenden Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Material	Kennzeichnung	Hersteller	Firmensitz
Casy-Cups		Ratiolab GmbH	Dreieich, D
Chamber-Slides	Lab-Tek, w/ Cover Glas Slide 8 Well/ 4 Well	Nalge Nunc	New York ,USA
Deckgläser	24 x 60 mm	Assistent	Nordheim, D
Einbettzubehör		Shandon	Frankfurt a.M., D
Einmalhandschuhe	Safe Skin Nitrile und Latex	Kimberly Clark	Koblenz- Rheinhafen, D
Einmalpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Eppendorf-Tubes	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Safe-lock Tubes	Eppendorf	Hamburg, D
FACS Calibrite Beads Calibrite TM3		BD Biosciences	Heidelberg, D
Filter tips	RNase & DNase frei 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Gewebekulturflaschen	Cellstar® Tissue Flask 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Kryoröhrchen	Nunc Cryo Tube [™] Vials, 18 ml	NUNC GmbH & Co. KG	Wiesbaden, D
Liquid Blocker	Super PapPen	Dako	Hamburg, D
Mikrotommesser	Blades Model 1818	Leica Instruments GmbH	Mannheim, D
Objektträger für Cytospots	Micro Slides X- Tra-Adhesive	Surgipath	Peterborough, UK
Objektträger für die Antikörperfärbung	Poly-L-Lysin beschichtet	Fisher Scientific	Schwerte, D
Objektträger aus Stahl für Raman- Spektroskopie	Edelstahlstücke mit Objetträger- abmessungen	Werkstatt QUT	Brisbane, AUS
Parafilm®		Roth	Karlsruhe, D
Pasteurpipetten	long form, 230 nm	Hirschmann	Eberstadt, D
Petrischalen	60 mm², 94 mm²,145 mm²	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Pipetten, Einweg	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Easy-Load, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D

Tabelle 4-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Kennzeichnung	Hersteller	Firmensitz
Polystyrol-Röhrchen	0,6 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Skalpellklingen	Bayha®, abgerundet	C. Bruno Bayha GmbH	Tuttlingen, D
Spritzen, Einweg	Omnifix 1 ml, 2 ml, 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen GmbH	Melsungen, D
Storilfiltor	Whatman®, 0,2 µm	Schleicher & Schuell	Dassel, D
Stermitter	Sterivex®, 0,2 μm	Millipore	Eschborn, D
Vorfilter für Sterilfiltration	Glass Fiber Prefilters	Millipore	Eschborn, D
Zellkulturplatten	Cellstar® 6 und 12 Well mit Deckel	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Zellkulturschale mit Glasboden	CELLview™	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen	Cellstar® Blue Cap 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Zellsiebe	70 µm	BD Biosciences	Heidelberg, D

4.1.3. Verwendete Chemikalien

Die in Tabelle 4-3 aufgelisteten Chemikalien fanden während der Anfertigung dieser Arbeit Verwendung.

Tabelle 4-3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Alcian Blau 8 XG	Merck	Darmstadt, D
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Aluminiumsulfatlösung	Merck	Darmstadt, D
Ammoniak	Merck	Darmstadt, D
Aquatex®	Merck	Darmstadt, D
Ascorbat-2-Phosphat	Merck	Darmstadt, D
Bicoll	Biochrom AG	Berlin, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Calciumchlorid (CaCl ₂) x 2 H ₂ O	Merck	Darmstadt, D
CASY®-clean	Schärfe-System	Reutlingen, D
CASY®-ton	Schärfe-System	Reutlingen, D
Chondroitinase	Sigma-Aldrich	Sydney, AUS
Dako Cytomation antibody diluent	Dako	Hamburg, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, D
DMEM Ham's F12	PAA Laboratories GmbH	Pasching, AT
DMEM-Pulver	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim, D

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Eisen(III)-chlorid-Lösung 29%	Sigma Aldrich	Castle Hill, AUS
Eisessig	Roth	Karlsruhe, D
Endothelial Cell Growth Medium mv	Promocell	Heidelberg, D
Epidermal Growth Factor	BD Biosciences	Heidelberg, D
Ethanol 100%	Roth	Karlsruhe, D
Ethanol 96 %	Merck	Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), >99 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Eukitt Mounting Medium	Sigma Aldrich	Castle Hill, AUS
FACS ®-Clean	Becton Dickinson	Heidelberg, D
FACS ®-Flow	Becton Dickinson	Heidelberg, D
FACS ®-Rinse	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Fast Green	Sigma Aldrich	Castle Hill, AUS
FBS Stain Buffer	BD Biosciences	Heidelberg, D
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
Gentamycinlösung (10 mg/ml)	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
Hämalaun	Merck	Darmstadt, D
Hämatoxylin	Sigma Aldrich	Castle Hill, AUS
Histofix (4% Paraformaldehyd)	Roth	Karlsruhe, D
Hydrocortison	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Indomethacin	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Insulin, human	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Intrastain	Dako	Hamburg, D
Isomount	Labonord	Templemars, F
Isopropanol	Merck	Darmstadt, D
ITS+	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Kaliumchlorid (KCI)	Merck	Darmstadt, D
Kaliumdihydrogencarbonat (KH ₂ CO ₃)	Merck	Darmstadt, D
Keratinocyte Growth Medium (KGM) + Zusätze	Promocell	Heidelberg, D
Kernechtrot	Merck	Darmstadt, D
Kollagenase NB4	Serva Elektrophoresis	Heidelberg, D
L-Glutamin	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
L-Prolin	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) x 6 H ₂ O	Merck	Darmstadt, D
MCDB 131 Medium	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
Melanocyte Growth Medium M2	Promocell	Heidelberg, D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck	Darmstadt, D
Natriumhydroxidplätzchen (NaOH)	Merck	Darmstadt, D
O.C.T. Compound	Sakura Finetek	Tokyo, JP
Ölrot O-Lösung	Merck	Darmstadt, D

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Paraffin	Labonord	Templemars (F)
Penicillin/Streptavidin (Pen/Strep)	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
Peroxidase Blocking Reagent Ready- to-Use	Dako	Hamburg, D
Pronase	Roche	Basel, CH
Pyruvat	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Roticlear	Roth	Karlsruhe, D
Safranin O	Sigma Aldrich	Castle Hill, AUS
Salzsäure (HCI), 0,1 N	Merck	Darmstadt, D
Salzsäure (HCI), 32 %, pro analysis	Merck	Darmstadt, D
Stickstoff	Linde	Pullach, D
TGF-β3	R&D Systems	Wiesbaden, D
Tris HCI	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Trizma® base	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Trypsin-EDTA	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
Tween 20	Merck	Darmstadt, D
Versene	Gibco Invitrogen	Karlsruhe, D
Xylol	Merck	Darmstadt, D
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim, D

Die immunchemische Charakterisierung der zu analysierenden Zellpopulationen fand unter Anwendung der nachfolgenden Antikörper statt.

Antikörper	Klon	lsotyp	Hersteller	Firmensitz
Aggrekan	1R11 14A6	lgG1	Invitrogen	Karlsruhe, D
Kollagen Typ 1	I - 8H5	lgG2a	Acris Antibodies	Herford, D
Kollagen Typ 2	II - 4C11	lgG1	Acris Antibodies	Herford, D
Melan-A	A 103	lgG1	Dako	Glostrup, DK
Prolyl-4-Hydroxylase				
beta (P4Hbeta)	5B5	lgG1	Abcam	Cambridge, USA
Pan-Cytokeratin	AE1/AE3	lgG1	Abcam	Cambridge, USA
Isotyp IgG1	polyklonal		Dako	Glostrup, DK
Isotyp IgG2a	polyklonal		Dako	Glostrup, DK

Tabelle 4-4: Verwendete Antikörper für die immunchemischen Färbungen

Die folgenden Kits fanden für die Durchführung der immunchemischen Analysen der Proben Verwendung:

Tabelle 4-5: Verwendete Kits für immunchemischen Färbungen

Kit für Antikörperfärbung	Details	Hersteller	Firmensitz
AEC Substrate Pack	Nachweisreagenz für die Antikörperfärbung	BioGenix	Hamburg, D

Kit für Antikörperfärbung	Details	Hersteller	Firmensitz
AEC Substrate Pack	Nachweisreagenz für die Antikörperfärbung	BioGenix	Hamburg, D
Super Sensitive Link Label IHC Detection System	Nachweisreagenz für die Antikörperfärbung	BioGenix	Hamburg, D
Dako EnVision System	Nachweisreagenz für die Antikörperfärbung	Dako	Hamburg, D

Die Analyse intrazellulärer Proteine sowie die Detektion zellulärer Oberflächenmarker erfolgten über den Einsatz nachstehend aufgelisteter Antikörper.

Antikörper	Klon	lsotyp	Hersteller	Firmensitz		
CD90 PE	5E10	lgG2a	Beckman Coulter	Krefeld, D		
CD45 APC	2A5	lgG1	Beckman Coulter	Krefeld, D		
P4Hbeta	5B5	lgG1	Abcam	Cambridge, USA		
Fibroblast Surface						
Protein (FSP-1)	1B10	IgM	Abcam	Cambridge, USA		
IgM	polyklonal		Acris Antibodies	Herford, D		
IgG1 APC	polyklonal		Beckman Coulter	Krefeld, D		
lgG2a PE	polyklonal		Beckman Coulter	Krefeld, D		
2nd FITC			Dako	Hamburg, D		

Tabelle 4-6: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen

4.1.4. Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen bzw. Bezugsquellen aller Medien, Puffer und Lösungen sind im folgenden Abschnitt angegeben.

Tabelle 4-7: Zusammensetzungen der	r verwendete Medien	Puffer und Lösungen
Tabelle 4-7. Zusallilleliselzullyeli uel	i veiwenuele weulen,	Fuller und Losungen

	Zusammensetzu	ng
	NaCl	140 mM
	KCI	2 mM
PBS ⁻ , pH 7,2	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,5 mM
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
	NaCl	140 mM
	KCI	2 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
PBS⁺, pH 7,2	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,5 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,9 mM
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml
	NaCl	140 mM
	KCI	2 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
FB37EDTA, pT17,2	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,5 mM
	Na-EDTA Salz	0,5 mM
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

	Zusammensetzu	ng
	Trypsin	0,5%
Trypsin/EDTA	Na₄EDTA	5,3 mM
	NaCl	145,5 mM
	Trypsin/EDTA	10 ml
rypsiniosung	Versene	ad 100 ml
Kollagenaselösung	Kollagenase in PBS ⁺	500 U/ml 3 U/ml
	Trypanblau	5,2 mM
Trypanblaulösung	NaCl	154 mM
	H ₂ O bidest.	ad 200 ml
	FCS	50 ml
Fibroblaston und HaCaT	Gentamycin	5 ml
	DMEM	ad 500 ml
	Rinderhypophysenextrakt	2 ml
	Epidermal Growth Factor	62,5 ng
	Insulin	2,5 mg
Kultivierunasmedium für	Hydrocortison	165 µg
Keratinozyten	Epinephrin	195 µg
	Transferrin. holo	5 mg
	CaCl ₂	0.06 mM
	KGM	ad 500 ml
Kultivierungsmedium für	Gentamycin	1ml
Melanozyten	Melanocyte Growth Medium M2	ad 100 ml
	Gentamycin	5 ml
Kultivierungsmedium für mvEndothelzellen	Endothelial Cell Growth Medium	ad 500 ml
	I -Glutamin	20 ml
	Pen/Strep	5 ml
Kultivierungsmedium für	FCS	75 ml
hMEC-1	Hydrocortison	500 µl
	Epidermal Growth Factor	5 µg
	MCDB 131	ad 500 ml
Kultiviorungsmodium für	FCS	50 ml
humane und porcine	Pen/Strep	5 ml
Knochenmarkstammzellen	Ascorbat-2-Phosphat (siehe	500 µl
porcine Chondrozyten	Tabelle 4-11)	
	DMEM Ham's F12	ad 500 ml
Kultivierunasmedium für	FCS	50 ml
SW1353	Pen/Strep	5 ml
	DMEM Ham'S F12	ad 500 ml

Für die immunchemischen Färbungen fand zunächst die Herstellung der Stammlösungen statt, aus denen dann die jeweiligen Arbeitslösungen und die Blockierungslösung hergestellt wurden.

Tabelle 4-8: Zusammensetzungen der verwendeten Stammlösungen für die immunchemischen Färbungen

Stammlösungen	Zusammensetzung		
Waschpuffer, BioGenix Kit			
	Trizma®base	60,6 g	
TBS Puffer (0,5 M), pH 7,6	NaCl	87,66 g	
	VE-Wasser	ad 1000 ml	
Waschpuffer, Dako Kit			
	Tris HCI	65,3 g	
Lösung A	Trizma®base	11,8 g	
	VE-Wasser	ad 500 ml	
Lögung P	NaCl	146,1 g	
	VE-Wasser	ad 500 ml	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	7,35 g	
Calciumenionu-Losung	VE-Wasser	ad 50 ml	

Tabelle 4-9: Zusammensetzungen der verwendeten Arbeitslösungen für die immunchemischen Färbungen

Arbeitslösungen	Zusammen	setzung
	TBS Puffer (0,5 M)	100 ml
Waschpuffer, BioGenix Kit	Tween	5 ml
	VE-Wasser	ad 1000 ml
	Lösung A	200 ml
	Lösung B	60 ml
Waschnuffer, Dako Kit	Calciumchlorid-	4 ml
Waschpuller, Dako Kit	Lösung	
	BSA	2 g
	VE-Wasser	ad 2000 ml
	BSA	1 ml
Blockierungslösung, BioGenix Kit	FCS	2,5 ml
	TBS (0,05 M)	ad 50 ml

Für die Durchführung der histologischen Färbungen wurden die nachfolgend beschriebenen Lösungen eingesetzt, deren Herstellungsvorschriften im Anschluss an Tabelle 4-10 beschrieben sind.

Tabelle 4-10: Zusammensetzungen der verwendeten Stammlösungen für die histologischen Färbungen

	Zusammenset	zung
Alcian Blau-Färbelösung, pH 1		
Alcian Blau Lösung (1%)	Alcian Blau 8GX	2 g
Alcian blau-Losung (1%)	Essigsäure (3%)	ad 200 ml
	Kernechtrot	0,2 g
Kernechtrotlösung (0,1%)	wässrige	
	Aluminiumsulfatlösung (5%)	ad 200 ml
Alizarin Rot S-Färbelösung	-	
	Alizarin Rot S	0,25 g
	Ammoniak	250 µl
	VE-Wasser	ad 25 ml

Safranin O/ Fast Green- Färbelösung	Zusammensetzung			
	Eisessig	1 ml		
Essigsaure (1%)	VE-Wasser	99 ml		
Sefrenin Lägung (0, 125%)	Safranin	0,125 g		
Salianin-Losung (0, 125%)	VE-Wasser	ad 100 ml		
Fast Groop Libourg (0.01%)	Fast Green	0,01 g		
Fast Green-Losung (0,01%)	VE-Wasser	ad 100 ml		
Woigortecho Lösung A	Hämatoxylin	1 g		
Weigertsche Losung A	Ethanol (96%)	ad 100 ml		
	Eisen(III)-chlorid-Lösung 29%	4 ml		
Vveigertsche Losung B	VE-Wasser	95 ml		
	Salzsäure (25%)	1 ml		
Ölrot O-Färbelösung				
	Ölrot O	0,5 g		
	99% Isopropanol	ad 100 ml		

a) Alcian Blau-Färbung

Der blaue Farbstoff wurde in der 3%igen Essigsäure durch Rühren aufgelöst, ein pH-Wert von eins eingestellt und diese Lösung abschließend mit Hilfe von Filterpapier filtriert. Für die Herstellung der Kernechtrotlösung wurde die 5%ige Aluminiumsulfatlösung auf einer Heizplatte bis zum Sieden erhitzt, das Kernechtrotpulver hineingegeben und diese Mischung gekocht bis das Pulver vollständig gelöst war. Nach dem Erkalten der Lösung fand eine Filtration durch Filterpapier statt.

b) Alizarin Rot S-Färbung

Die Alizarin Rot-Färbelösung musste vor Gebrauch frisch hergestellt werden, indem der Farbstoff in VE-Wasser gelöst und anschließend die Ammoniaklösung hinzugegeben wurde.

c) Ölrot O-Färbung

Die Ölrot O-Stammlösung bestehend aus 0,5 g Ölrot O gelöst in 100 ml Isopropanol wurde vor Gebrauch in einem Verhältnis von 1,5:1 mit VE-Wasser verdünnt. Anschließend war die Filtration der Lösung mittels eines Filterpapiers notwendig.

d) Safranin O/ Fast Green-Färbung

Die Herstellung der Safranin O- als auch der Fast Green-Färbelösungen bestand in der Lösung der jeweiligen Chemikalie in VE-Wasser. Des Weiteren war die Herstellung einer 1%igen Essigsäurelösung aus Eisessig und VE-Wasser notwendig. Für die Vorbereitung der Weigertschen Lösung wurden Lösung A und Lösung B in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.

Für die Differenzierung der Knochenmarkstammzellen und Fibroblasten in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten wurde ein *in-vitro*-Differenzierungsassay verwendet. Für diesen Versuchsansatz erfolgte zunächst die Herstellung der Stammlösungen, die dann für das Ansetzen der Arbeitslösungen genutzt wurden. Die Zusammensetzungen dieser Lösungen sind in Tabelle 4-11 und Tabelle 4-12 beschrieben.

Tabelle 4-11: Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen für den *in-vitro*-Differenzierungsassay

Stammlösungen	Lösungsmittel	Konzentration
β-Glycerophosphat	Aqua bidest	1 µmol/ml
Ascorbat-2-Phosphat	Aqua bidest	50 mg/ml
Dexamethason	Ethanol, 100%	1 µmol/ml
Insulin, human	Aqua bidest	10 mg/ml
IBMX	DMSO	500 µmol/ml
Indomethacin	DMSO	100 µmol/ml
Pyruvat	Aqua bidest	100 mg/ml
L-Prolin	Aqua bidest	40 mg/ml

Tabelle	4-12:	Zusammensetzung	der	verwendeten	Arbeitslösungen	für	den	in-vitro-
Differenz	zierung	sassay						

Arbeitslösung	Zusammensetzui	ng
	Dexamethason	10 µl
	Insulin, human	10 µl
	IBMX	10 µl
Adipogene Differenzierung	Indomethacin	10 µl
	FCS	1 ml
	Pen/Strep	100 µl
	DMEM high glucose	ad 10 ml
	Ascorbat-2-Phosphat	10 µl
	Dexamethason	1 µl
	Pyruvat	10 µl
Chondrogene	L-Prolin	10 µl
Differenzierung	ITS+	100 µl
	(TGF-β3	10 µl)
	Pen/Strep	100 µl
	DMEM high glucose	ad 10 ml

Arbeitslösung	Zusammensetzung	
Osteogene Differenzierung	β-Glycerophosphat	100 µl
	Ascorbat-2-Phosphat	10 µl
	Dexamethason	1 µl
	FCS	1 ml
	Pen/Strep	100 µl
	DMEM high glucose	ad 10 ml

4.1.5. Verwendetes biologisches Material

Das biologische Material, das zur Isolierung der Zellen verwendet wurde, ist in den folgenden Abschnitten näher beschrieben. Außerdem werden Angaben zu den genutzten Zelllinien gemacht.

4.1.5.1. Porcines Material

Das porcine Material aus dem sowohl Chondrozyten als auch Knochenmarkstammzellen gewonnen wurden, stammt von 6-Monate alten deutschen Landrasseschweinen (15-25 kg). Die Entnahme der Hinterbeine dieser Tiere erfolgte in der Abteilung Experimentelle Medizin der Universitätsklinik Tübingen woran sich der gekühlte Transport dieser Materialien nach Stuttgart anschloss.

4.1.5.2. Humanes Material

Zur Gewinnung von Fibroblasten, Keratinozyten und mikrovaskulären (mv) Endothelzellen fand humanes Vorhautgewebe von Patienten, die jünger als acht Jahre alt sind, Verwendung. Als Transportmedium des Gewebes kam DMEM mit 1% Gentamycin zum Einsatz. Die Isolation der Melanozyten erfolgte aus Gewebe weiblicher Patienten im Alter von 36, 58 und 63 Jahren.

Für die Isolation der humanen Knochenmarkstammzellen fand Spongiosa aus dem Hüftkopf Verwendung, die während Hüftimplantationsoperationen an weiblichen und männlichen Patienten im Alter zwischen 56 und 77 Jahren am Universitätsklinikum Würzburg entnommen wurden.

Der humane Gelenkknorpel und der Knochen wurden während Knieimplantationsoperationen am Prince Charles Hospital in Brisbane (Australien) entnommen.

4.1.5.3. Humane Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Zellen	Lieferant	Firmensitz	
HaCaT	DKFZ	Heidelberg, D	
SW1353	ATCC / LGC-Promochem	Wesel, D	
HCHON	Provitro GmbH	Berlin, D	
hMEC-1	Centers for Disease Control and Prevention	Atlanta, USA	

Tabelle 4-13: Verwendete humane Zelllinien

4.2. Methoden

Dieser Abschnitt dient der Beschreibung aller Methoden, die während der Anfertigung dieser Arbeit genutzt wurden.

4.2.1. Isolierung und Kultivierung primärer Zellen

Grundsätzlich fanden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen, d.h. unter geeigneten Sterilbänken statt, um Kontaminationen der Zellkulturen ausschließen zu können. Ferner waren alle Medien, Lösungen und Puffer aus eigener Herstellung steril zu filtrieren (Filterporengröße: 0.22 μ m) und ausschließlich sterile Gegenstände und Verbrauchsmaterialien zu verwenden. Für die Kultivierung der Zellen wurden Brutschränke mit gesättigter Wasserdampfatmosphäre, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37°C verwendet. Die Arbeitstechniken, die für die Isolierung, Kultivierung und Aufrechterhaltung der Zellkulturen notwendig waren, sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

4.2.1.1. Porcine Chondrozyten

Für die Isolation der porcinen Chondrozyten wurde der hyaline Knorpel des Femurs verwendet. Die Zellisolation untergliedert sich in die folgenden Arbeitsschritte:

- Freilegung des Knieknorpels mittels Skalpell
- Abtragung der oberen 1 1,5 cm des hyalinen Knorpels und Überführung dieser Gewebestücke in ein mit 30 ml PBS⁺ gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Fünfmaliges Waschen der Knorpelstücke mit 25 ml PBS⁺
- Überführung der Knorpelstücke und 25 ml PBS⁺ in eine Petrischale (145 mm²)
- Zerkleinerung der Probe in 1 mm² große Stücke mittels Skalpell
- Überführung der Knorpelstücke in eine mit 100 ml Kultivierungsmedium und 10% Kollagenaselösung (3 U/ml) gefüllte Schottflasche

- Überführung dieser Mischung in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min
- Zweimaliges Waschen mit 25 ml PBS⁺
- Resuspension und Vereinigung beider Zellpellets in 5 ml Kultivierungsmedium
- Bestimmung der Zellzahl und -vitalität mittels Neubauerkammer
- Aussaat von 1,15x10⁴ Zellen/cm²
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Chondrozyten spätestens bei 80% Konfluenz
- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS⁻/EDTA
- Zugabe von 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation für 3 min im Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren und Abstoppen mit 1 ml FCS
- Bestimmung der Zellzahl und –vitalität mittels Neubauerkammer (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min
- Konzentration f
 ür Versuche oder Weiterkultivierung einstellen

4.2.1.2. Porcine Knochenmarkstammzellen

Für die Isolierung der porcinen Knochenmarkstammzellen wurde der bei der Isolierung der Chondrozyten verbleibende Femurknochen verwendet.

- Aufsägen des Femurs am Gelenkkopf mittels einer Knochensäge
- Herauskratzen des Knochenmarks mit Hilfe eines scharfen Löffels und Überführen in eine mit einem Rührfisch und 200 ml PBS⁺ gefüllte Schottflasche
- Überführung der Zellsuspension in 4 x 50 ml Zentrifugenröhrchen unter Verwendung von Zellsieben und anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min
- Überstand absaugen, Waschen der Zellen mit PBS⁺ und Zentrifugation bei 1000 rpm f
 ür 10 min
- Resuspension der Zellen in jeweils 25 ml PBS⁺

- Überschichten von jeweils 15 ml Bicoll Lösung mit Zellsuspension und Dichtegradientenzentrifugation bei 1250 rpm f
 ür 30 min mit minimaler Bremskraft der Zentrifuge
- Abnahme der gewünschten Zellschicht mit Hilfe einer Pipette, Überführung und Vereinigung aller Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min
- Waschen des Zellpellets mit 50 ml PBS⁺ und erneute Zentrifugation bei 1000 rpm f
 ür 5 min
- Resuspension des Zellpellets mit Kultivierungsmedium und Bestimmung der Zellzahl und -vitalität mittels der Neubauerkammer
- Aussaat von 6,6*10⁴ Zellen/cm²
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Knochenmarkstammzellen spätestens bei 80% Konfluenz
- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS⁻/EDTA
- Zugabe von 0,25%ige Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation für 3 min im Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren und Abstoppen mit 1 ml FCS
- Bestimmung der Zellzahl und –vitalität mittels Neubauerkammer (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min
- Konzentration für Versuche oder Weiterkultivierung einstellen

4.2.1.3. Humane Knochenmarkstammzellen

Die Isolierung der humanen Knochenmarkstammzellen erfolgte aus Spongiosa. Es waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Probe (Spongiosa aus Hüftkopf + 10 ml Kultivierungsmedium aus Klinikum) für 5 min bei 1200 rpm zentrifugieren
- Überstand (vor allem das Fett) vollständig absaugen
- Zugabe von 10 ml Kultivierungsmedium und kräftiges Schütteln dieser Mischung um die Zellen aus den Knochenstücken herauszuwaschen
- Aufnahme des Überstands und Überführung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen unter Verwendung eines Zellsiebs (100 µm), um Knochenstücke zurückzuhalten

4. Material und Methoden

- Fünfmalige Wiederholung dieses Waschschrittes und Vereinigung aller Überstände in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Zentrifugation der Zellsuspension f
 ür 5 min bei 1200 rpm
- Überstand absaugen und Resuspension der Zellen in 25 ml Medium
- Bestimmung der Zellzahl und -vitalität mit der Neubauerkammer
- Aussaat von 3,4*10⁶ Zellen/ cm²
- Waschen der Zellen mit PBS⁺ nach ca. 2 3 Tagen, um alle nicht adhärenten Zellen zu entfernen
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Knochenmarkstammzellen spätestens bei 80% Konfluenz
- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS⁻/EDTA
- Zugabe von 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation für 3 min im Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren und Abstoppen mit 1 ml FCS
- Bestimmung der Zellzahl und –vitalität mittels Neubauerkammer (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min
- Konzentration für Versuche oder Weiterkultivierung einstellen

4.2.1.4. Humane Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden nach dem folgenden Protokoll isoliert und kultiviert.

- Überführung der Vorhautbiopsie in Petrischale und zweimaliges Waschen mit PBS⁻
- Entfernen von Fett und Bindegewebe mittels Skalpell
- Zerkleinern des Biopsiematerials in 3-5 mm große Stücke
- Enzymatisches Verdauen mit Dispase-Lösung (2 U/ml in PBS⁻) für 16-18 h bei 4-8°C
- Trennen von Epidermis und Dermis mittels zweier Pinzetten
- Dermis f
 ür Isolation der Fibroblasten verwenden und Epidermis f
 ür die Isolation der Keratinozyten verwenden (siehe Abschnitt 4.2.1.5)
- Absaugen der Dispase-Lösung
- Zerkleinern der Dermisstücke mit Skalpell
- Überführung des Materials in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Pinzette

- Zugabe von 10 ml Kollagenaselösung (500 U/ml) und Inkubation f
 ür 45 min bei 37°C im Brutschrank
- Zugabe von 10 ml Kultivierungsmedium
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min
- Absaugen des Überstands und Resuspension des Zellpellets mit 10 ml Kultivierungsmedium
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm für 5 min
- Absaugen des Überstands, Resuspension des Zellpellets mit 2 ml Kultivierungsmedium
- Aussaat in T25-Zellkulturflasche und Kultivierung im Brutschrank
- Zugabe von 2 ml Kultivierungsmedium nach 24-stündiger Kultivierung
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Fibroblasten spätestens bei 100% Konfluenz
- Absaugen des Mediums, Zugabe von 2 ml PBS⁻/EDTA und Inkubation f
 ür 5 min im Brutschrank
- Zugabe von 2 ml 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender Inkubation für 3 min im Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren und Abstoppen der Enzymreaktion mit 1 ml FCS
- Zellzahlbestimmung mittels Casy1 (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min

Konzentration einstellen für Versuche oder Weiterkultivierung

4.2.1.5. Humane Keratinozyten

Die weitere Bearbeitung der Epidermis zur Isolierung der Keratinozyten erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Absaugen der Dispase-Lösung
- Zerkleinerung der Epidermis mittels Skalpell
- Überführung des Materials in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Pinzette
- Zugabe von 10 ml 0,25%-iger Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation f
 ür 18 min bei 37°C im Brutschrank
- Vereinzeln der Zellen durch Resuspension (2 min)
- Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 1 ml FCS und Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min

- Überstand absaugen und Resuspension des Zellpellet mit 2 ml Kultivierungsmedium
- Aussaat in T25-Zellkulturflasche und Kultivierung im Brutschrank
- Nach 4 h Kultivierung, Abnahme des Mediums und Überführung in neue T25-Zellkulturflasche, Zugabe von 4 ml Kultivierungsmedium in erste Kultivierungsflasche
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Keratinozyten spätestens bei 80 % Konfluenz
- Absaugen des Mediums, Zugabe von 2 ml PBS⁻/EDTA und Inkubation f
 ür 10-30 min im Brutschrank
- Zugabe von 2 ml 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation f
 ür 3 min im Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren und Abstoppen der Enzymreaktion mit 1 ml FCS
- Zellzahlbestimmung mittels Casy1 (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Zentrifugation der Zellen 1000 rpm f
 ür 5 min
- Konzentration einstellen für Versuche oder Weiterkultivierung

4.2.1.6. Humane mv Endothelzellen

Neben den humanen Fibroblasten lassen sich auch mv Endothelzellen aus dem dermalen Teil der Vorhautbiopsien isolieren. Hierfür war es erforderlich, die Aufarbeitung der Hautbiopsie bis zur Trennung von Dermis und Epidermis, wie in Protokoll in Abschnitt 4.2.1.4 beschrieben, durchzuführen und anschließend die mv Endothelzellen wie folgt zu isolieren:

- Dermis in Petrischale überführen, in Streifen schneiden und mit 10 ml PBS⁻ /EDTA spülen
- Inkubation mit 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 40 min bei 37°C im Brutschrank
- Abstoppen der Enzymreaktion mit 1 ml FCS
- Überführen der Dermisstückchen in eine mit 37°C warmen Kultivierungsmedium gefüllte Petrischale
- Ausstreichen der Stückchen unter leichtem Druck von allen Seiten mittels Skalpell
- Überführen der Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen unter Verwendung eines Zellsiebes und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min
- Überstand absaugen, Resuspension des Zellpellets mit 4 ml Kultivierungsmedium und Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Aussaat in T25-Zellkulturflaschen mit einer Konzentration von 0,12*10⁵ Zellen/cm²
- Nach 4 h Kultivierung, Abnahme des Mediums und Überführen in neue T25-Zellkulturflasche, Zugabe von 4 ml Kultivierungsmedium in erste Kultivierungsflasche
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Zellen wie in Abschnitt 4.2.1.5 beschrieben

4.2.1.7. Humane Melanozyten

Die Isolation der humanen Melanozyten erfolgte aus dem epidermalen Teil adulter Haut weiblicher Spender nach folgendem Protokoll.

- Überführen von ca. 8 cm² der Hautbiopsie in sterile Petrischale
- Dreimaliges Waschen der Biopsie mit je 10 ml PBS⁺
- Entfernen von Fettgewebe, sichtbarer Adern, Verunreinigungen oder Beschädigungen der Haut
- Zerkleinern der Haut in 1 2 cm dünne Streifen und erneutes Waschen mit 10 ml PBS⁺
- Überführen des Biopsiematerials in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Pinzette
- Zugabe von 4 ml Dispase und Inkubation f
 ür 3 h bei 37°C im Brutschrank
- Überführen des kompletten Inhalt des Zentrifugenröhrchens in Petrischale
- Absaugen der Dispase-Lösung und zweimaliges Waschen mit je 10 ml PBS⁺
- Trennen von Epidermis und Dermis mittels zweier Pinzetten, Verwerfen der Dermis
- Überführen der Epidermisstücke in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Pinzette und Inkubation mit 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C im Brutschrank
- Zugabe von 10 ml PBS⁺ und Vortexen bzw. Schütteln
- Überführen der Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm
- Resuspension des Zellpellets mit 4 ml Kultivierungsmedium und Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer (siehe Abschnitt 4.2.3)
- Aussaat von 5 x 10⁴ Zellen/cm² und Inkubation bei 37°C im Brutschrank

- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Melanozyten sobald dichte Kolonien erkennbar sind, spätestens jedoch nach 10 Tagen
- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit 5 ml PBS⁻
- Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und Inkubation f
 ür 3 10 min bei 37°C
- Zugabe von 10 ml Kultivierungsmedium und Überführen der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1000 rpm
- Konzentration einstellen für Versuche oder Weiterkultivierung

4.2.1.8. Humaner Gelenkknorpel und Knochen

Die Gewinnung der humanen Gelenkknorpel- und Knochenstücke erfolgte aus den Biopsien adulter Patienten.

- Überführen der Biopsie in sterile Petrischale
- Waschen der Biopsie mit PBS⁺
- Heraustrennen einer Knorpelprobe (Breite ~ 2 cm) mit möglichst unbeschädigter Oberfläche bis zur tiefen Zone
- Heraustrennen von 1 cm² großen Knochenstücken
- Überführen der Proben in 15 ml Zentrifugenröhrchen und Überschichten mit 4%iger Paraformaldehydlösung zur Fixierung für 2 h bei 4°C
- Überführung der Knorpelprobe in ein mit O.C.T Compound gefülltes 2 ml Eppendorf Tube und Aufbewahrung bei -80°C bis zur Verwendung
- Überführung der Knochenprobe in PBS⁺ und Aufbewahrung bei 4°C bis zur Verwendung

4.2.2. Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der humanen Zelllinien startete mit einer vom Anbieter versendeten Kryokultur und folgende Arbeitsschritte waren zum Auftauen und Kultivieren der Zellen notwendig:

- Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37°C bis nur noch kleine Eisklümpchen sichtbar sind
- Überführen der aufgetauten Zellsuspension in 10 ml, auf 37°C vorgewärmtes Kultivierungsmedium und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min
- Absaugen des Überstands, Resuspension der Zellen in Kultivierungsmedium und Aussaat in Zellkulturflaschen zur Kultivierung im Brutschrank

- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Zellen bei 80% Konfluenz
- Absaugen des Mediums, Zugabe von 2 ml PBS⁻/EDTA und Inkubation f
 ür 5 min im Brutschrank
- Zugabe von 2 ml 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender Inkubation für 3 min im Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren und Abstoppen der Enzymreaktion mit 1 ml FCS
- Zellzahlbestimmung mittels Casy1 (siehe 4.2.3)
- Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm f
 ür 5 min
- Konzentration einstellen f
 ür Versuche oder Weiterkultivierung

4.2.3. Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

In dieser Arbeit fanden zwei Methoden für die Bestimmung der Zellzahl Verwendung. Für die automatische Zellzählung wurden 100 μ l einer Zellsuspension mit 10 ml Casyton verdünnt und 3 x 400 μ l dieser Mischung mittels eines Casy-1-Gerätes gemessen.

Die manuelle Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte unter Verwendung einer Neubauerzählkammer. Hierfür wurden 10 µl Trypanblaulösung mit 10 µl Zellsuspension gemischt, in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und sowohl lebende als auch tote Zellen ausgezählt. Dabei entspricht das Volumen in den vier Großquadraten, die für die Zellzählung verwendet wurden, 0,1 mm³. Die Vitalität berechnet sich dabei aus dem Quotienten lebender Zellen und Gesamtzellzahl multipliziert mit 100.

4.2.4. Immunzyto- und histologische Färbungen

Es wurden zwei unterschiedliche Detektionssysteme für die Antikörperfärbungen verwendet, die sich sowohl in der Bindung des sekundären Antikörpers als auch in dem verwendeten Substrat unterscheiden. Die für die immunchemischen Färbungen notwendigen Probenpräparationen sowie die detaillierten Protokolle der Färbungen sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

4.2.4.1. Herstellung von Zytospots und Fixierung von Zellen

Für die Herstellung von Zytospots wurden die gewünschten Zellen abgelöst, gezählt

und mit PBS⁺ auf die gewünschte Konzentration (1*10⁵ Zellen/ml) eingestellt. Die Apparatur aus Objektträger, Filterpapier, Trichter und Klammer wurde in die Zentrifuge eingesetzt und mit je 200 µl Zellsuspension befüllt. Die Zentrifugation erfolgte bei 500 rpm für 10 min. Anschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern mit eiskaltem Methanol fixiert und dann bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Damit die Morphologie von Zellen für die immunchemische Färbung erhalten bleibt, wurden Zellen in Chamber Slides ausgesät und für die Färbung fixiert. Dafür wird das Medium nach der Kultivierung von 24-48 Stunden abgesaugt und mit PBS⁺ gespült. Anschließend werden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 10 min fixiert und dann bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.2.4.2. Fixierung und Einbetten von Gewebe

Für die immunchemische und histologische Charakterisierung von Gewebe wurde dieses in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparate, die in Paraffin eingebettet werden sollten, wurden nach dem Fixierschritt in mit Filterpapier ausgelegte Einbettkassetten überführt. Die Entwässerung der Präparate erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe und der anschließenden Überführung in Paraffin. (Programm des Einbettautomaten: Leitungswasser I 1 h, Leitungswasser II 1 h, Ethanol 70% 1 h, Ethanol 90% 1 h, Ethanol 96% 1 h, Isopropanol I 1 h, Isopropanol II 1 h, Isopropanol/ Xylol 1:1 1 h, Xylol I 1 h, Xylol II 1 h, Paraffin I 3 h, Paraffin II 3 h). Nach Ablauf des Einbettprogramms wurden die Einbettkassetten direkt aus dem Automaten in 60°C vorgewärmtes Paraffin überführt, dann auf einer Heizplatte mit einem Skalpell zugeschnitten und in eine mit heißem Paraffin gefüllte Metallschale gelegt. Nach dem Aushärten des Paraffins bei RT lagerten die Blöcke bis zur Verwendung bei 4°C.

Für die Anfertigung von Kryopräparaten war es notwendig, die fixierten Proben in O.C.T. Compound zu geben und bis zur Verwendung bei -80°C einzufrieren.

4.2.4.3. Herstellung von Kryoschnitten

Die Herstellung der Kryoschnitte erfolgte in einem auf -25°C vorgekühlten Gefriermikrotom, in dem die Gewebeprobe zunächst mit O.C.T. Compound auf den Objekttisch fixiert wurde. Um eine glatte Schnittfläche zu erhalten war zuerst die Anfertigung einiger Trimmschnitte mit einer Dicke von 30 µm notwendig, bevor die

10 µm dicken Kryoschnitte angefertigt und auf Objektträger überführt wurden. Diese Schnitte konnten bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

4.2.4.4. Herstellung von Paraffinschnitten

Die Herstellung der Paraffinschnitte erfolgte mit einem Rotationsmikrotom. Um eine glatte Schnittoberfläche zu erhalten, wurden zunächst Trimmschnitte mit einer Dicke von 30 µm angefertigt. Die 3 µm dicken Schnitte mussten dann auf einer 38°C warmen Wasseroberfläche gestreckt und schließlich auf beschichtete Objektträger gezogen werden. Die Trocknung der Schnitte erfolgte auf einer Heizplatte mit einer Temperatur von 42°C für ca. 1 h. Die Schnitte konnten bis zur Verwendung bei RT gelagert werden.

4.2.4.5. Entparaffinierung von Paraffinschnitten

Um die Bindungsstellen für Antikörper und andere Farbstoffe wieder frei zugänglich zu machen und um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, war eine Entparaffinierung der Schnitte nach folgendem Schema notwendig.

- Erwärmen der Paraffinschnitte für 15 min bei 60°C im Wärmeschrank
- Absteigende Alkoholreihe (Roticlear I 10 min, Roticlear II 3 min, 2 x EtOH 96% 2 min, EtOH 70% 2 min, EtOH 50% 2 min, VE-Wasser)

4.2.4.6. Durchführung der immunchemischen Färbung

Für die immunchemischen Färbungen wurden 2 unterschiedliche Detektions-Kits verwendet. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte waren für die Anwendung des BioGenex Super Sensitive[™] IHC Detection System notwendig.

- a) BioGenex Kit
 - Umkreisen der Zytospots oder Gewebeschnitte mit Dako Pen
 - Waschen in Waschpuffer für 2 min
 - Blockieren der endogenen Peroxidasen mit Peroxidase Blocking solution (Dako) für 10 min bei RT
 - Waschen in Waschpuffer für 2 min
 - Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung für 20 min bei RT
 - Blockierungslösung abtropfen, nicht abwaschen
 - Inkubation mit Primärantikörper bzw. Isotypkontrolle über Nacht bei 4°C
 - Dreimaliges Waschen in Waschpuffer für je 5 min
 - Inkubation mit Link-Lösung (Verdünnung 1:100) für 20 min bei RT

- Dreimaliges Waschen in Waschpuffer für je 5 min
- Inkubation mit Label-Lösung (Verdünnung 1:100) für 20 min bei RT
- Dreimaliges Waschen in Waschpuffer für je 5 min
- Inkubation mit AEC Substrate Chromogen (Verdünnung 1:50) für 2-5 min bei RT
- Dreimaliges Waschen mit VE-Wasser
- Inkubation mit Hämalaun für 15 s bei RT
- Waschen mit VE-Wasser
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 min bei RT
- Eindecken mit Aquatex
- Trocknen über Nacht im Abzug
- Lichtmikroskopische Untersuchung der Färbungen
- b) Dako® Kit
 - Umkreisen der Zytospots oder Gewebeschnitte mit Dako Pen (entfällt f
 ür Chamber Slides)
 - Waschen in Waschpuffer für 2 min
 - Blockieren der endogenen Peroxidasen mit Peroxidase Blocking Solution f
 ür 10 min bei RT
 - Waschen in Waschpuffer für 2 min
 - Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung für 20 min bei RT
 - Blockierungslösung abtropfen, nicht abwaschen
 - Inkubation mit Primärantikörper bzw. Isotypkontrolle für 60 min bei RT
 - Dreimaliges Waschen in Waschpuffer für je 2 min
 - Inkubation mit Sekundärantikörper für 30 min bei RT
 - Dreimaliges Waschen in Waschpuffer für je 2 min
 - Inkubation mit DAB Substrate Chromogen (Verdünnung 1:50) für 5 min bei RT
 - Waschen mit VE-Wasser
 - Inkubation mit Hämalaun für 15 s bei RT
 - Waschen mit VE-Wasser
 - Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 5 min bei RT
 - Eindecken mit Aquatex
 - Trocknen über Nacht im Abzug
 - Lichtmikroskopische Untersuchung der Färbungen

4.2.4.7. Durchführung der histologischen Färbungen

Die Protokolle der unterschiedlichen histologischen Färbemethoden sind in den nachstehenden Abschnitten beschrieben.

a) Alcian Blau-Färbung

Die Alcian Blau-Färbung wurde angewandt, um Glykosaminoglykane in Gewebeschnitten sichtbar zu machen. Hierfür war es notwendig die Paraffinschnitte vor der Färbung zu entparaffinieren (siehe Abschnitt 4.2.4.5) Folgendes Färbeprotokoll wurde durchgeführt.

- Überführen der Schnitte in 0,1 N HCI für 3 min
- Färben in Alcian Blau-Färbelösung für 30 min
- Kurzes Spülen mit 0,1 N HCl und dann mit VE-Wasser
- Gegenfärbung mit Kernechtrot-Färbelösung für 3-5 min
- Waschen in VE-Wasser
- Entwässern der Präparate mit aufsteigender Alkoholreihe (2 min 96%, 2 min 100%, 5 min Isopropanol I, 5 min Isopropanol II)
- Eindecken mit Isomount
- Trocknen über Nacht im Abzug
- Lichtmikroskopische Untersuchung der Färbungen

b) Alizarin Rot S-Färbung

Mit Hilfe der Alizarin Rot S-Färbung sollten Ca₂HPO₄⁻-Ablagerungen, die typisch für die Mineralisierung der extrazellulären Matrix während der osteogenen Differenzierung sind, nachgewiesen werden. Diese Strukturen zeigen eine rote bis rotbraune Färbung. Folgendes Protokoll wurde für diese Färbung angewendet:

- Fixierung der Zellmonolayer mit eiskaltem Methanol f
 ür 10 min bei RT
- Waschen der Zellen mit VE-Wasser
- Färben mit Alizarin Rot S-Färbelösung für 2 min
- Entfernen von überschüssiger Färbelösung mit VE-Wasser
- Eindecken mit Aquatex
- Trocknen über Nacht im Abzug
- Lichtmikroskopische Untersuchung der Färbungen

c) Ölrot O-Färbung

Um Lipide innerhalb eines Präparates anzufärben, wurde die Ölrot O-Färbung durchgeführt. Intrazelluläre Lipidvesikel, die während der adipogenen Differenzierung von den Zellen produziert werden, zeigen eine rote bis orange-rote Färbung. Durch die Gegenfärbung mit Hämalaun werden die Zellkerne blau gefärbt. Die durchzuführenden Arbeitsschritte für diese histologische Färbung sind im folgenden Abschnitt beschrieben:

- Fixierung der Zellmonolayer mit Histofix für 10 min bei RT
- Waschen der Zellen mit VE-Wasser und Inkubation mit 60% Isopropanol für 5 min
- Färben mit Ölrot O-Färbelösung für 10 min bei RT
- Entfernen überschüssiger Färbelösung zunächst mit 60% Isopropanol, dann mit VE-Wasser
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 min
- Waschen mit Leitungswasser
- Direkt anschließende lichtmikroskopische Untersuchung der Färbungen

d) Safranin O/ Fast Green-Färbung

Die Safranin O-Färbung wurde verwendet, um die unterschiedlichen Zonen des Knorpels zu detektieren. Die Proteoglykane werden dabei rot und Kollagenstrukturen grün angefärbt. Die Zellkerne zeigen durch das Eisenhämatoxylin eine schwarze Farbe. Das Färbeprotokoll beinhaltete folgende Schritte:

- Fixieren der Kryoschnitte mit eiskaltem Aceton f
 ür 10 min bei 4°C
- Inkubation mit Weigertscher Lösung für 5 min bei RT
- Waschen der Schnitte unter laufendem Leitungswasser für 10 min
- Inkubation mit Fast Green-Färbelösung für 4 min bei RT
- Spülen mit 0,1% Essigsäure für 5 min bei RT
- Flüssigkeit abtropfen
- Inkubation mit Safranin O-Färbelösung für 5 min bei RT
- Entwässern der Präparate (1 min 96% Ethanol, 2 min 100% Ethanol)
- Eindecken der Gewebeschnitte mit Eukitt
- Trocknen über Nacht im Abzug
- Lichtmikroskopische Untersuchung der Färbungen

4.2.5. Durchflusszytometrische Analysen

Da sowohl intrazelluläre als auch Oberflächenmarker analysiert wurden, werden im Folgenden die unterschiedlichen Färbemethoden beschrieben. Für die durchflusszytometrischen Analysen fand das FACSCalibur und die Auswertesoftware CellQuest Pro 4.0.2 (BD Biosciences, Heidelberg, D) Verwendung.

4.2.5.1. Direkte Färbemethode

Die direkte Färbemethode wurde für die folgenden Antikörper und die dazugehörigen Isotypkontrollen durchgeführt: CD90, CD45, IgG1, IgG2a.

- Passagieren der Zellen und Einstellung einer Zellkonzentration von 2*10⁶ Zellen/ml mit PBS⁻
- Überführen von 100 µl Zellsuspension in Polystyrol-Röhrchen
- Zugabe von dem jeweiligen Antikörper- bzw Isotyplösung (1 µg/10⁶ Zellen) und Inkubation für 20 min bei 4°C im Dunkeln
- Zweimaliges Waschen mit 300 µl Stain Buffer und Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min
- Überstand bis auf 50 µl absaugen (Markierung an Polystyrolröhrchen) und Resuspension des Zellpellets mit 200 µl Stain Buffer
- Zellen am FACSCalibur vermessen

4.2.5.2. Indirekte Färbemethode

Die indirekte Färbung der Zellen wurde für den Antikörper FSP und die dazugehörige Isotypkontrolle IgM durchgeführt.

- Passagieren der Zellen und Einstellung einer Zellkonzentration von 2*10⁶ Zellen/ml mit PBS⁻
- Überführen von 1 ml Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min
- Überstand absaugen und Zellpellet in 50 µl Stain Buffer resuspendieren
- Zugabe von 20 μl FcR Blocking Lösung und Inkubation für 10 min bei RT
- Zweimaliges Waschen mit 300 µl Stain Buffer und Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min
- Überstand absaugen, Zellpellet in 1 ml Stain Buffer resuspendieren und jeweils 100 µl Zellsuspension in Polystyrol-Röhrchen überführen um die Zellen wie folgt zu behandeln:

- 1. Röhrchen: Antikörper
- 2. Röhrchen: Isotypkontrolle
- o 3. Röhrchen: Sekundärantikörper
- 4. Röhrchen: Ungefärbte Probe
- Zugabe von Antikörper- bzw. Isotyplösung in jeweils 1. und 2. Röhrchen (Konzentration: 1 µg Antikörper/10⁶ Zellen) und Inkubation für 20 min bei 4°C
- Zweimaliges Waschen mit 300 µl Stain Buffer und Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min
- Überstand auf 50 µl absaugen (Markierung an Polystyrolröhrchen) und Zellpellet in 1., 2. und 3. Röhrchen mit 100 µl Sekundärantikörperlösung (1:50 verdünnt) und das 4. Röhrchen mit 100 µl Stain Buffer resuspendieren und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- Zweimaliges Waschen mit 300 µl Stain Buffer und Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 min
- Überstand bis auf 50 µl absaugen und Resuspension des Zellpellets mit 200 µl Stain Buffer
- Zellen am FACSCalibur vermessen

4.2.5.3. Intrazelluläre und indirekte Färbemethode

Die intrazelluläre und indirekte Färbung war für den Antikörper P4Hbeta und die dazugehörige Isotypkontrolle IgG1 notwendig.

- Passagieren der Zellen und Einstellung einer Zellkonzentration von 2*10⁶ Zellen/ml mit PBS⁻
- Überführen von 750 µl Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 min
- Überstand absaugen und mit 75 µl Stain Buffer resuspendieren
- Inkubation mit 200 µl IntraStain Reagenz A f
 ür 15 min bei RT
- Waschen der Zellen mit 2000 µl Stain Buffer und Zentrifugation bei 1200 rpm f
 ür 3 min
- Überstand bis auf 75 µl absaugen und Zellpellet mit 200 µl IntraStain Reagenz B resuspendieren und für 15 min bei RT inkubieren
- Zellen mit 2000 µl Stain Buffer resuspendieren und Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 min
- Weiterbehandlung der Zellen wie in Abschnitt 4.2.5.2 beschrieben

Grundsätzlich wurden jeweils 10.000 Zellen einer Probe analysiert.

4.2.6. In-vitro-Differenzierungsassay

Mit Hilfe eines *in-vitro*-Differenzierungsassay kann die Plastizität einer Zellpopulation überprüft werden. Durch die Verwendung spezieller Kultivierungsbedingungen sollte die Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen und Fibroblasten in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten induziert werden. Für die adipogene und osteogene Differenzierung wurden Monolayerkulturen in 4-well Chamber Slides verwendet. Im Gegensatz dazu erfolgte die chondrogene Differenzierung in einer Pelletkultur in 15 ml Zentrifugenröhrchen. Im Folgenden sind die verschiedenen Differenzierungsassays beschrieben.

a) Adipogene Differenzierung

- Aussaat von 1*10⁵ Zellen pro Kammer eines Chamber Slides mit 1 ml Kultivierungsmedium und Kultivierung bis 100% Konfluenz
- Austausch von Kultivierungsmedium gegen adipogenes Differenzierungsmedium in 2 Kammern, weitere Kultivierung der restlichen 2 Kammern mit Kultivierungsmedium als Negativkontrolle
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Abbruch der Differenzierung nach 14 Tagen Kultivierungszeit mit Differenzierungsmedium
- b) Chondrogene Differenzierung
 - Zentrifugation von 2,5*10⁵ Zellen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 1200 rpm für 5 min
 - Überstand abnehmen und Zellpellets vorsichtig mit 1 ml Differenzierungsmedium überschichten
 - Zugabe von TGF-β3 zu Differenzierungsansätzen, als Negativkontrolle dienen die Pelletkulturen ohne Supplementation des Wachstumsfaktors aber unter Verwendung des Differenzierungsmediums
 - Medienwechsel alle 3-4 Tage
 - Abbruch der Differenzierung nach 28 Tagen Kultivierungszeit durch Fixierung der Zellpellets mit Histofix und Einbetten in Paraffin (siehe Abschnitt 4.2.4.2)

c) Osteogene Differenzierung

- Aussaat von 1*10⁵ Zellen pro Kammer eines Chamber Slides mit 1 ml Kultivierungsmedium und Kultivierung bis 100% Konfluenz
- Austausch von Kultivierungsmedium gegen osteogenes Differenzierungsmedium in 2 Kammern, weitere Kultivierung der restlichen 2 Kammern mit Kultivierungsmedium als Negativkontrolle
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Abbruch der Differenzierung nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit Differenzierungsmedium

4.2.7. Raman spektroskopische Analysen

Grundsätzlich wurden sowohl Zellsuspensionen als auch Kryoschnitte Raman spektroskopisch analysiert. Die unterschiedlichen Probenvorbereitungen sind in den nachstehenden Absätzen beschrieben.

4.2.7.1. Untersuchung von Zellsuspensionen

Für die Raman spektroskopische Untersuchung der vitalen Zellen wurde das in Abschnitt 4.1.1 beschriebene Raman-Spektrometer verwendet.

Zunächst wurde die CCD-Kamera, die der Aufnahme der Raman-Spektren diente, auf -70°C heruntergekühlt, um eine optimale Messung zu gewährleisten. Durch die tiefen Temperaturen wird der durch thermisch ausgelöste Ladungen verursachte Dunkelstrom und somit das Rauschen minimiert. Die Grundkalibrierung der CCD-Kamera erfolgte mit Hilfe eines Pen-Ray Strahlers und aufgrund des zeitlichen Aufwandes relativ selten. Diese Xenon-Lichtquelle besitzt charakteristische Emissionslinien, die an definierten Positionen im Spektrum wieder zu finden sein müssen. Vor jedem Gebrauch wurde zusätzlich eine Wellenlängenkalibrierung durchgeführt sowie die Laserintensität mit Hilfe eines Silizium-Wafers überprüft. Grundsätzlich lagen die Zellen für die Messungen in Suspension vor, die für die Untersuchungen in eine Petrischale mit Glasboden in Deckglasstärke gegeben wurden. Die Fokuseinstellungen wurden dabei so gewählt, dass der optische Fokus in der Mitte der zu vermessenden Zellen lag. Um eine möglichst reproduzierbare Spektrenaufnahme zu gewährleisten, wurde der Laserfokus (< 1 µm) auf die Mitte der Zelle gerichtet. Die Integrationszeit betrug einheitlich für alle Messungen 100 s (10x10 s) und pro Versuchsansatz wurden 20-30 Zellen gemessen. Um den Einfluss des Mediums und des Glasbodens zu minimieren, wurde zu jeder Messung ein Referenzspektrum des Hintergrundes aufgenommen, das hinterher vom gemessenen Spektrum subtrahiert wurde.

4.2.7.2. Untersuchung von fixiertem Gewebe

Die Kryoschnitte und das fixierte Knochengewebe wurden mit dem Raman-Spektrometer an der QUT (siehe Abschnitt 4.1.1) vermessen. Da dieses Gerät sehr empfindlich auf Glas reagiert, mussten die Kryoschnitte für die Untersuchungen auf Edelstahl aufgebracht werden, da dieses Material die Messung am wenigsten beeinflusste. Die Dicke der Kryoschnitte betrug 20 µm, die wie in Abschnitt 4.2.4.3 beschrieben, hergestellt wurden. Die fixierten Knochenstücke wurden für die Messungen nur auf den Edelstahlobjektträger gelegt und benötigten keine weitere Präparation. Vor jedem Gebrauch wurde eine Wellenlängenkalibrierung durchgeführt sowie die Laserintensität mit Hilfe eines Silizium-Wafers überprüft. Auch für diese Analysen wurden die Fokuseinstellungen so gewählt, dass der optische Fokus in der Mitte der zu vermessenden Zelle lag. Während jeder Messung wurde der Laser (~20 µm) auf die Mitte der Zelle gerichtet um vergleichbare Spektren zu erhalten. Die Messzeit betrug 100 s (2x50 s) und pro Schnitt wurden 20-25 Spektren aufgenommen. Die Knochenproben wurden auf den Edelstahlobjektträger gelegt und die Messzeit pro Spektrum betrug 10 s (1x10 s) bei 50% Laserleistung. Pro Probe wurden 10-15 Spektren aufgenommen.

4.3. Auswertung der Raman-Spektren

Bevor die Raman-Spektren multivariat ausgewertet werden konnten, wurden diese anhand mehrerer Schritte vorbehandelt, um technische Variationen wie beispielsweise das Rauschen in den Spektren zu minimieren.

4.3.1. Datenvorbehandlung

Die Bearbeitungsschritte der Spektren waren abhängig von der Probenvorbereitung sowie vom verwendeten Gerät (siehe Abschnitt 4.1.1) und erfolgten mit Hilfe der Softwarepakete von OPUS 4.2 (Bruker Optic GmbH, Ettlingen, D), WIRE 2.0 (Renishaw, Gloucester, UK) sowie The Unscrambler 9.8 und 10.1 (Camo Software AS, Oslo, N).

a) Spektren der vitalen Zellen

Zunächst wurden die Raman-Spektren auf den sogenannten "Fingerprint"-Bereich, der zwischen 600 cm⁻¹ – 1800 cm⁻¹ liegt, zugeschnitten. Innerhalb dieses Wellenzahlenbereichs liegen die für diese Anwendungen ausschlaggebenden Informationen. Der nächste Schritt war die Entfernung von scharfen. informationslosen Peaks ("Spikes"). Diese Spikes entstehen durch kosmische Strahlung, die von der empfindlichen CCD-Kamera detektiert werden. Daran schloss sich die Subtraktion des Referenzspektrums an, da sowohl das Medium als auch der Glasboden des Messgefäßes einen Einfluss auf den Untergrund der Raman-Spektren haben. Im Anschluss an diese Untergrundkorrektur erfolgte die Korrektur der Basislinie durch die Verwendung der "Gummibandmethode" mit 64 Stützpunkten. Ferner wurde das Geräterauschen durch eine Polynomglättung der Raman-Spektren nach dem Savitzky-Golay Algorithmus mit 9 Stützpunkten minimiert. Die Vektornormierung der Raman-Spektren war notwendig um jedes Spektrum auf die Länge 1 zu normieren.

b) Spektren der fixierten Gewebe

Die Vorbehandlung der Raman-Spektren, aus den Messungen des fixierten Gewebes auf Edelstahl, wurde sowohl durch den auflichtmikroskopischen Aufbau des Gerätes als auch durch die Gerätesoftware vereinfacht. Der gewünschte Wellenlängenbereich konnte bereits vor der Aufnahme der Spektren in der Software WiRE eingestellt werden, d.h. das Zuschneiden auf den "Fingerprint"-Bereich entfiel. Außerdem wurden keine Referenzspektren aufgenommen, da der Laserstrahl direkt auf die Probe gelenkt wurde und somit kein Signal von störenden Substanzen in den Spektren enthalten war. Ansonsten fand eine identische Datenvorbehandlung der Spektren statt.

4.3.2. Hauptkomponentenanalyse

Für die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der vorbehandelten Raman-Spektren wurde die Software The Unscrambler genutzt, die grundsätzlich einer Vereinfachung sowie Strukturierung der Daten diente (siehe Kapitel 3.4). Diese multivariate Analyse reduziert den Raman spektroskopischen Datensatz auf wenige Hauptkomponenten, durch die systematische Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen den Spektren gefunden werden sollten. Die Auftragung der reduzierten Daten in Form eines Score Plots (Punktediagramm) wurde verwendet um Trends und Cluster innerhalb der

Datensätze zu finden. Die Analyse der Loadingspektren gab Aufschluss darüber, welche Wellenzahlbereiche die größten Unterschiede zwischen den untersuchten Raman-Spektren darstellten.

4.3.3. ANOVA und Support Vector Machine

Um zu überprüfen, ob die Intensitäten der charakteristischen Raman-Banden der Loadingsspektren zwischen den Proben signifikant unterschiedlich sind, wurden diese mit Fishers ANOVA (<u>Analysis of Variance</u>) und dem Kruskal-Wallis Test unter Verwendung der Software OriginPro 8.1G (OriginLab, Northampton, MA) analysiert. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert.

Die Analyse der Raman-Spektren mittels der SVM erfolgte mit der Software The Unscrambler. Diese Auswertung diente der Klassifizierung der Daten, in dem die eine Hälfte der Datensätze zum Trainieren der SVM genutzt und die andere Hälfte für die Vorhersage verwendet wurde. Diese Ergebnisse wurden dann für die Berechnung der Spezifität und Sensitivität herangezogen.

5. Ergebnisse

Die Raman spektroskopische Analyse verschiedener primärer Zelltypen wurde an Hautzellen sowie an mesenchymalen Knochenmarkstammzellen und Chondrozyten durchgeführt. Ein weiterer Fokus lag auf der Unterscheidung primärer Zellen und Zellen der korrespondierenden Zelllinie. Ein weiteres Ziel war die Raman spektroskopische Analyse extrazellulären Matrix der von Knorpelund Knochenmaterialien anhand von fixierten Proben und Kryoschnitten. Zur Detektion der nur feinen Unterschiede zwischen den Raman-Spektren kam eine multivariate Hauptkomponentenanalyse der spektralen Daten sowie die Signifikanzanalyse ANOVA und die SVM als Regressionsmethode zum Einsatz.

5.1. Unterscheidung verschiedener primärer Zelltypen

Um nach der Isolierung von Zellen zu überprüfen, ob die erhaltenen Zellpopulationen rein und nicht durch andere Zelltypen kontaminiert sind, werden solche primären Zellpopulationen in der Regel mit immun- und biochemischen Methoden analysiert. Eine nicht invasive Methode zur Charakterisierung solcher Zellpopulationen ist die Raman-Spektroskopie, mit der aufgrund der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Zellen ein zelltypischer "Fingerprint" dargestellt werden kann.

5.1.1. Hautzellen

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse aus einem Vergleich der Raman-Spektren dermaler und epidermaler Hautzellen dargestellt.

Phänotypische Unterscheidung von dermalen und epidermalen Hautzellen

Fibroblasten sind in der Dermis der Haut lokalisiert, wobei Keratinozyten in der epidermalen Hautschicht zu finden sind. Wie in Abbildung 5-1 zu sehen ist, unterschieden sich diese beiden Zelltypen morphologisch voneinander. Die dermalen Hautzellen, die sehr vereinzelt wachsen, weisen eine spindelförmige Morphologie auf. Die Keratinozyten wachsen in Kolonien und besitzen eine kubische, kompakte Form.



Abbildung 5-1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Fibroblasten (A) und Keratinozyten (B). Es sind deutliche morphologische Unterschiede erkennbar, da die Fibroblasten eine langgestreckte und spindelförmige und die Keratinozyten eine pflastersteinartige Morphologie aufweisen. Der Maßstabsbalken entspricht in A 200 µm und in B 100 µm.

Die Raman-Mittelwertspektren sowie die Standardabweichungen der primären Fibroblasten und Keratinozyten sind in Abbildung 5-2 gezeigt. Deutliche Unterschiede zwischen den Mittelwertspektren werden in den Loading- und Differenzspektren dargestellt und sind in den Wellenzahlbereichen bei 715 cm⁻¹, 874 cm⁻¹, 955 cm⁻¹, 1042 cm⁻¹, 1079 cm⁻¹ und 1269 cm⁻¹ vorhanden (siehe Tabelle 5-1).



Abbildung 5-2: Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum primärer Fibroblasten ($n_{Messung} = 65$, $n_{Spender} = 3$) und Keratinozyten ($n_{Messung} = 68$, $n_{Spender} = 3$). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Fibroblasten von dem der Keratinozyten erhalten worden. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren werden die spektralen Unterschiede erkenntlich.

Alle detektierten Raman-Banden sind für die Unterscheidung der Fibroblasten und Keratinozyten signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 5-3).

Die Banden bei 955 cm⁻¹ und 1079 cm⁻¹ wurden Lipiden zugeordnet und im Speziellen dem Cholesterol [68, 85]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bande bei 956 cm⁻¹ aus molekularen Schwingungen des Keratins resultiert [86]. Proteine und vor allem Kollagen zeigen Raman-Banden in den Wellenzahlbereichen bei 874 cm⁻¹, 1037 cm⁻¹ und 1268 cm⁻¹ [87-91].



Abbildung 5-3: Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Trennung von primären Fibroblasten und Keratinozyten identifiziert wurden. Alle Raman-Banden sind signifikant unterschiedlich für die analysierten Zelltypen. * p<0,05 (ANOVA)

Für die Raman-Bande bei 715 cm⁻¹ konnte keine Zuordnung in der Literatur gefunden werden. Die Analyse der SVM zeigt für die Keratinozyten eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 77%.

Tabelle 5-1: I	Raman	spektroskopisch	e Unters	chiede	zwische	en primären	Fibroblasten	und
Keratinozyten.	. Die au	fgelisteten Raman	-Banden s	sind die	signifika	ntesten Bande	en in den Diffe	erenz-
und Loadingss	pektren	(siehe Abbildung	5-2) und	die Zuo	ordnung	zu biochemis	chen Verbindu	Ingen
wurde anhand v	von Liter	aturstellen vorgen	ommen.					-

Raman-Bande [cm ⁻¹]	Zue	ordnung	Vorkommen	Literatur
715	keine	Zuordnung	Fibroblasten	
870-874	v₅(C-C) Kollagen		Fibroblasten	90
954-956	v(C-C)	Cholesterol Keratin	Keratinozyten	68, 85
1078-1079	v _s (C-C), v _s (C-O)	Lipid	Keratinozyten	68
1037-1038	Prolin	Kollagen	Fibroblasten	88
1268-1269	Amid III	Kollagen	Fibroblasten	87, 89

In Abbildung 5-4 ist der Score-Plot der primären Fibroblasten und Keratinozyten gezeigt, in dem PC2 gegen PC1 aufgetragen ist. Es sind zwei deutliche Score-Cluster zu erkennen, die jeweils einen Zelltypen enthalten und die über die PC1-Achse getrennt sind. Mittels dieser Auswertung werden 58% der spektralen Varianz erklärt.



Abbildung 5-4: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von primären Fibroblasten ($n_{Messung}$ = 65, $n_{Spender}$ = 3) und Keratinozyten ($n_{Messung}$ = 68, $n_{Spender}$ = 3). Die Scores dieser Zelltypen bilden jeweils ein Cluster und lassen sich über PC1 voneinander trennen. Durch diese Analyse sind 58% der spektralen Varianz erklärt.

5. Ergebnisse

Die Unterscheidung von Fibroblasten und Keratinozyten wurde auch durch immunzytologische Färbungen mit den Antikörpern P4Hbeta und Pan-Cytokeratin gezeigt (siehe Abbildung 5-5). Der P4Hbeta Antikörper wurde verwendet, um Fibroblasten von Keratinozyten zu unterscheiden, da dieser Marker nur von Fibroblasten exprimiert wird (siehe Abbildung 5-5 A, C). P4Hbeta ist ein intrazellulares Enzym, das für die Synthese und Aufbau verschiedener Kollagene benötigt wird [34]. Im Gegensatz dazu, bindet der Pan-Cytokeratin Antikörper spezifisch an die Keratinozyten und nicht an die Fibroblasten (siehe Abbildung 5-5 B, D). Cytokeratine sind Strukturproteine, die in dem Zytoplasma von Epithelzellen lokalisiert sind [31].



Abbildung 5-5: Immunzytologische Färbungen primärer Fibroblasten und Keratinozyten. Fibroblasten zeigen eine intrazellulare P4Hbeta- und keine Pan-Cytokeratin-Färbung (**A**, **B**). Keratinozyten exprimieren kein P4Hbeta, sind allerdings positiv für Pan-Cytokeratin (**C**, **D**). Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Unterscheidung von epidermalen Hautzelltypen

Melanozyten und Keratinozyten sind Zelltypen, die in der Epidermis der Haut vorkommen. Wie in Abbildung 5-6 zu erkennen ist, lassen sich diese beiden Zelltypen morphologisch unterscheiden.



Abbildung 5-6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Melanozyten (A) und Keratinozyten (B). Es sind deutliche morphologische Unterschiede erkennbar, da die Melanozyten eine dendritische und die Keratinozyten eine pflastersteinartige Morphologie aufweisen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Das Ziel war es zu überprüfen, ob sich diese beiden Zelltypen auch anhand ihrer Raman-Spektren unterscheiden lassen. Abbildung 5-7 zeigt die Mittelwertspektren, die von primären Melanozyten und Keratinozyten erhalten wurden sowie die Differenz- und Loadingspektren. Unterschiede in der Grundlinie sind wichtig für die Unterscheidung dieser beiden Zelltypen. Darüber hinaus sind spektrale Unterschiede in den Bereichen bei 854 cm⁻¹, 932 cm⁻¹, 1003 cm⁻¹ und 1380 cm⁻¹ zu finden (Tabelle 5-2).



Abbildung 5-7: Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum primärer Melanozyten ($n_{Messung} = 74$, $n_{Spender} = 3$) und Keratinozyten ($n_{Messung} = 64$, $n_{Spender} = 3$). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Melanozyten von dem der Keratinozyten erhalten worden. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren werden die spektralen Unterschiede erkenntlich.

Wie aus Abbildung 5-8 erkenntlich wird, sind die Unterschiede in den Raman-Banden bei 854 cm⁻¹, 932 cm⁻¹ und 1003 cm⁻¹ signifikant. Die Werte der Raman-Bande bei 1380 cm⁻¹ sind nicht normal verteilt und konnten deswegen nicht mit der einfachen ANOVA ausgewertet werden. Diese Daten wurden daher mit Hilfe der Kruskal-Wallis ANOVA ausgewertet, die für nicht normalverteilte Daten verwendet wird. Diese Analyse hat ergeben, dass auch diese Raman-Bande für Melanozyten und Keratinozyten signifikant unterschiedlich ist.

Für die Vorhersage der Daten mit Hilfe der SVM wurde für die Melanozyten eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 95% erhalten.





Die Ringstruktur der Aminosäure Tyrosin wurde zu der Bande bei 854 cm⁻¹ zugeordnet. Die helikale Struktur von Proteinen wurde der Bande bei 932 cm⁻¹ zugeordnet, wobei die Gesamtproteinkonzentration durch die Bande bei 1003 cm⁻¹ angezeigt wird [90, 92, 93]. Die Bande bei 1380 cm⁻¹ wurde dem Pigment Melanin zugewiesen [94]. Unterschiede in der Grundlinie von Raman-Spektren können durch Unterschiede in der Pigmentierung von Zellen verursacht werden [95, 96].

Tabelle 5-2:	Raman	spekti	roskopisch	ne Un	terschi	ede	zwisch	en	primären	Mela	anozyten	und
Keratinozyte	n. Die au	fgeliste	ten Ramar	n-Band	len sind	l die	signifika	ante	sten Bande	en in	den Diffe	renz-
und Loadings	spektren	(siehe	Abbildung	5-7) ι	und die	Zuc	ordnung	zu	biochemise	chen	Verbindu	ngen
wurde anhand	d von Liter	raturste	llen vorgen	omme	en.							-

Raman-Bande [cm ⁻¹]	Zuc	ordnung	Vorkommen	Literatur
854	Tyrosin	Protein	Keratinozyten	92
932	<i>v</i> (C-C)	Helikale Proteinstruktur	Keratinozyten	93
1003	Phenylalanin	Protein	Keratinozyten	90, 92
1380	v _s (C-C) innerhalb Melanin aromat. Ring		Melanozyten	94
Grundlinie	Pigmentierun	g	Melanozyten	95, 96

Der Score-Plot, der für die Spektren der primären Melanozyten und Keratinozyten berechnet wurde, ist in Abbildung 5-9 dargestellt. Es sind zwei getrennte Score-Cluster zu erkennen, die jeweils die Scores eines Zelltyps enthalten. Für die Trennung dieser Zelltypen waren PC1 und PC2 notwendig und 78% der spektralen Varianz sind durch diese Auftragung erklärt.



Abbildung 5-9: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von primären Melanozyten ($n_{Messung}$ = 74, $n_{Spender}$ = 3) und Keratinozyten ($n_{Messung}$ = 64, $n_{Spender}$ = 3). Die Scores dieser beiden Zelltypen bilden jeweils ein Cluster und lassen sich über PC1 und PC2 voneinander trennen. 78% der spektralen Varianz ist durch diese Analyse erklärt.

Es wurden auch anhand der immunzytologischen Färbungen von Melanozyten und Keratinozyten Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen detektiert (siehe

Abbildung 5-10). Die Melanozyten zeigten ausschließlich für den Melan-A Antikörper eine Färbung (siehe Abbildung 5-10 A, B). Melan-A bindet an das Antigen eines Proteins, das in Melanozyten der Haut und in der Retina gefunden wird [97]. Wie bereits für Abbildung 5-5 beschrieben, sind die Keratinozyten für Pan-Cytokeratin gefärbt und nicht für Melan-A (siehe Abbildung 5-10 C, D). Wie in Abbildung 5-10 B zu sehen, sind Pan-Cytokeratin gefärbte Keratinozyten auch in der Melanozytenpopulation zu finden.



Abbildung 5-10: Immunchemische Färbung der primären Melanozyten und Keratinozyten. Melanozyten exprimieren Melan-A und kein Pan-Cytokeratin (A, B). Die Keratinozyten zeigen keine Färbung für Melan-A, allerdings exprimieren diese Zellen Pan-Cytokeratin (C, D). Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Unterscheidung von dermalen Zelltypen

Fibroblasten und mv Endothelzellen kommen in der dermalen Schicht der Haut vor. Morphologisch sind diese beiden Zelltypen gut voneinander zu trennen (siehe Abbildung 5-11).



Abbildung 5-11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Fibroblasten (A) und mv Endothelzellen (B). Es sind deutliche morphologische Unterschiede erkennbar, da die Fibroblasten eine langgestreckte und spindelförmige und die Endothelzellen eine plastersteinartige Morphologie aufweisen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Die Unterscheidbarkeit dieser beiden Zelltypen mittels Raman spektroskopischer Untersuchungen wurde analysiert. Abbildung 5-12 zeigt die Mittelwertspektren der primären Fibroblasten und mv Endothelzellen sowie die Differenzund spektralen Unterschiede Loadingspektren. Die größten sind in den Wellenzahlbereichen bei 955 cm⁻¹, 980 cm⁻¹ und 1451 cm⁻¹ detektierbar (Tabelle 5-3).



Abbildung 5-12: Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum primärer Fibroblasten ($n_{Messung} = 85$, $n_{Spender} = 3$) und mv Endothelzellen ($n_{Messung} = 83$, $n_{Spender} = 1$, $n_{Passage} = 3$). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der mv Endothelzellen von dem der Fibroblasten erhalten worden. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren werden die spektralen Unterschiede erkenntlich.



Wie aus Abbildung 5-13 ersichtlich, sind die für die Trennung von mv Endothelzellen und Fibroblasten identifizierten Raman-Banden signifikant unterschiedlich.

Abbildung 5-13: Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Trennung von primären Fibroblasten und mv Endothelzellen identifiziert wurden. Alle Raman-Banden sind signifikant unterschiedlich für die analysierten Zelltypen. * p<0,05 (ANOVA)

Ferner hat die Analyse der Daten mit der SVM eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 93% für die mv Endothelzellen ergeben. Lipidstrukturen können anhand der Raman-Banden bei 955 cm⁻¹ und 980 cm⁻¹ detektiert werden [85, 90, 97]. Darüber hinaus sind molekulare Schwingungen von Proteinen bei Wellenzahlen von 980 cm⁻¹ und 1451 cm⁻¹ zu finden [90, 98].

Tabelle 5-3: Raman spektroskopische Unterschiede zwischen primären Fibroblasten und mv Endothelzellen. Die aufgelisteten Raman-Banden sind die signifikantesten Banden in den Differenzund Loadingspektren (siehe Abbildung 5-12) und die Zuordnung zu biochemischen Verbindungen wurde anhand von Literaturstellen vorgenommen.

Raman-Bande [cm ⁻¹]	Z	uordnung	Vorkommen	Literatur
955	v(C-C)	Lipide	mv Endothelzellen	85
980	=CH	Proteine, Lipide	Fibroblasten	98
1451	v _d (CH ₂ CH ₃)	Protein, Kollagen	mv Endothelzellen	90

Die multivariate Auswertung der Spektren der Fibroblasten und mv Endothelzellen ist in Abbildung 5-14 in Form eines Score-Plots dargestellt. Innerhalb dieses Plots sind die Scores der beiden Zelltypen über die PC1-Achse voneinander getrennt. PC1 und PC3 erklären 65% der spektralen Varianz.



Abbildung 5-14: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der primären Fibroblasten ($n_{Messung} = 85$, $n_{Spender} = 3$) und mv Endothelzellen ($n_{Messung} = 83$, $n_{Spender} = 1$, $n_{Passage}=3$). Die Scores dieser Zelltypen bilden jeweils ein Cluster und lassen sich über PC1 voneinander trennen. 78% der spektralen Varianz ist durch diese Analyse erklärt.

5.1.2. Stammzellen

Die Unterscheidbarkeit primärer Stammzellen und Fibroblasten wurde sowohl anhand biologischer Analysemethoden als auch mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Stammzell- und Fibroblastenkultur zeigt sehr ähnliche spindelförmige Morphologien (siehe Abbildung 5-15).



Abbildung 5-15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Stammzellen (A) und Fibroblasten (B). Es sind keine morphologischen Unterschiede erkennbar, da beide Zelltypen spindelförmige Morphologien aufweisen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der beiden Zelltypen kam der Kontrollmarker CD90 zum Einsatz, der sowohl auf Stammzellen als auch auf Fibroblasten nachgewiesen werden sollte. Diese Annahme hat sich, wie in Abbildung 5-16 gezeigt, bestätigt, da 99,6 \pm 0,2% der Stammzellen und 99,7 \pm 0,2% der Fibroblasten positiv für diesen Marker waren. Zur Unterscheidung dieser Zelltypen sollten die in der Literatur beschriebenen Fibroblasten-spezifischen Marker, FSP-1 und P4Hbeta, dienen [99, 100]. Die Analyse der Fibroblasten zeigte, dass 88,6 \pm 5,8% der Zellpopulationen den Oberflächenmarker FSP-1 und 96,1 \pm 1,6% der Zellpopulationen den intrazellulären Marker P4Hbeta trugen. Die Stammzellpopulationen zeigten ähnliche Ergebnisse für die durchflusszytometrische Analyse des Markers FSP-1 (85,1 \pm 6,6%) und des Markers P4Hbeta (90,9 \pm 9%) (siehe Abbildung 5-16). Eine Unterscheidung von Stammzellen und Fibroblasten ist anhand dieser Marker nicht möglich.





Da weder durch die morphologischen Untersuchungen noch durch die durchflusszytometrischen Analysen Unterschiede zwischen den Stammzell- und den Fibroblastenpopulationen erkannt werden wurde ein konnten, in-vitro-Differenzierungsassay angewendet, um diese Zelltypen voneinander zu trennen [67, 101]. Dabei wurden Fibroblasten- und Stammzellpopulation unter spezifischen Bedingungen kultiviert, um dadurch eine adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung zu induzieren. Wie in Abbildung 5-17 gezeigt, war diese Differenzierung im Gegensatz zur Fibroblastenpopulation nur für die Stammzellpopulation erfolgreich.



Abbildung 5-17: *In-vitro*-Differenzierungsassay der Stammzell- und Fibroblastenpopulation. Die erfolgreiche adipogene Differenzierung konnte nur für Stammzellen (A) und nicht für Fibroblasten (D) durch eine Ölrot O-Färbung nachgewiesen werden. Die Matrixproduktion während der osteogenen Differenzierung konnte mit der Alizarin Rot-Färbung für Stammzellen (B) gezeigt werden im Gegensatz zu Fibroblasten (E). Die chondrogene Differenzierung, die durch die Alcian Blau-Färbung nachgewiesen wird, war nur für die Stammzellen (C) erfolgreich und nicht für die Fibroblasten (F). Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Die für die adipogene Differenzierung typischen intrazellulären Lipidtropfen, die durch eine Öl Rot O-Färbung nachgewiesen werden konnten, waren nach einer Kultivierungszeit von zwei Wochen nur in der Stammzell- und nicht in der Fibroblastenkultur vorhanden (siehe Abbildung 5-17 A, D) [67]. Für die osteogen differenzierten Stammzellen konnte das in der synthetisierten extrazellulären Matrix enthaltene Kalzium nach einer Kultivierungsdauer von vier Wochen mit Hilfe der Alizarin Rot-Färbung detektiert werden [102]. Die Fibroblasten ließen sich nicht osteogen differenzieren, was aus der fehlenden Matrixproduktion geschlussfolgert werden konnte (siehe Abbildung 5-17 B, E). Des Weiteren wurden die Zellen für die chondrogene Differenzierung für vier Wochen in einer Pelletkultur kultiviert. Eine positive Alcian Blau-Färbung der typischen Knorpelmatrix konnte nur für die Stammzellpopulation gezeigt werden [103]. Die Synthese der knorpelspezifischen extrazellulären Matrix zeigte sich aufgrund der fehlenden Blaufärbung nicht für die

5. Ergebnisse

Pelletkultur der Fibroblasten (siehe Abbildung 5-17 C, F). Die Zellen von zwei weiteren Spendern zeigten positive Ergebnisse für die osteogene Differenzierung der Fibroblasten aber keine erfolgreiche adipogene und chondrogene Differenzierung (siehe Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich hier um zwei unterschiedliche Zelltypen handelt. Vergleichend zu diesen Ergebnissen Untersuchungen wurden Raman spektroskopische von Stammzellen und Fibroblasten von jeweils vier Spendern durchgeführt. In Abbildung 5-18 sind die Mittelwertspektren und die Standardabweichungen dieser Analyse dargestellt. Wie anhand der Loading- und Differenzspektren erkennbar, liegt der größte Unterschied dieser beiden Zelltypen in der Grundlinie der Raman-Spektren.



Abbildung 5-18 Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum von Stammzellen und Fibroblasten. Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der primären Stammzellen ($n_{Messung} = 122$, $n_{Spender} = 4$) von dem der Fibroblasten ($n_{Messung} = 109$, $n_{Spender} = 4$) berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-19) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Der größte Unterschied dieser Spektren ist die Grundlinie.

Die Auswertung der spektralen Daten mit Hilfe der SVM ergab eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 95% für die Stammzellpopulation. In Abbildung 5-19 ist der Score-Plot der Stammzellen und Fibroblasten dargestellt, welche zwei, über die PC1-Achse voneinander getrennte Cluster zeigt. Jedes Cluster enthält die Scores eines Zelltyps, wodurch die erfolgreiche Trennung dieser Zellen anhand ihrer Raman-Spektren gezeigt werden konnte. Mit dieser multivariaten Analyse, für die PC1 und PC2 notwendig waren, werden 76% der spektralen Varianz erklärt.



Abbildung 5-19: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von primären Stammzellen ($n_{Messung}$ = 122, $n_{Spender}$ = 3) und Fibroblasten ($n_{Messung}$ = 109, $n_{Spender}$ = 3). Die Scores dieser beiden Zelltypen bilden jeweils ein Cluster und lassen sich über die PC1 voneinander trennen. Durch diese Analyse sind 76% der spektralen Varianz erklärt.

5.2. Unterscheidung primärer Zellen von Zellen der korrespondierenden Zelllinie

Die Identifizierung pathologischer Veränderungen von Zellen *in vivo* ist wichtig für die Diagnose von Krankheiten. Die Detektion solcher Modifikationen spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle von *in vitro* kultivierten Zellen, die beispielsweise für die Herstellung von künstlichen Gewebekonstrukten verwendet werden. Hierbei müssen die verwendeten Zellen sehr sorgfältig untersucht werden, um die Implantierung von potentiell pathologisch veränderten Zellen ausschließen zu können.

Da es die unterschiedlichsten zellulären Modifikationen gibt, wurden zur Raman spektroskopischen Analyse verschieden hergestellte Zelllinien verwendet, um somit die Sensitivität dieser physikalischen Analysemethode zu überprüfen. In diesem Kapitel werden *in vitro* modifizierte (HaCaT), aus kanzerogenem Gewebe isolierte (SW1353) sowie transfektierte Zellen (hMEC-1) mit den korrespondierenden primären Zellen verglichen. Grundsätzlich wurden für diese Untersuchungen Hautzellen, Endothelzellen und Zellen des Knorpels als Zellsuspensionen verwendet. Um die Variabilität innerhalb der Zelllinien zu überprüfen, wurden pro Zelllinie verschiedene Passagen untersucht.

84

5.2.1. Hautzellen

Die Untersuchung der lichtmikroskopischen Aufnahmen von Zellen der Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) und primären Keratinozyten zeigte, dass diese beiden Zelltypen sehr ähnliche Morphologien aufweisen (siehe Abbildung 5-20). Eine Unterscheidung dieser beiden Zelltypen anhand ihrer Morphologien ist nicht möglich.



Abbildung 5-20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HaCaT Zellen (A) und primären Keratinozyten (B). Es sind keine morphologischen Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Für die Raman spektroskopischen Untersuchungen der HaCaT Zellen wurden drei verschiedene Passagen verwendet und für die Analyse der primären Keratinozyten drei unterschiedliche Spender. Pro Versuchsansatz wurden 25-30 Zellen in Suspension vermessen und die Spektren anschließend über eine Hauptkomponentenanalyse sowie SVM multivariat ausgewertet. Die Mittelwertspektren die dazugehörigen Standardabweichungen sowie aller Messungen wurden berechnet, um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu analysieren (siehe Abbildung 5-21).



Abbildung 5-21: Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum von HaCaT Zellen und primären Keratinozyten. Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der HaCaT Zellen ($n_{Messung} = 85$, $n_{Passage} = 3$) von dem der primären Keratinozyten ($n_{Messung} = 70$, $n_{Spender} = 3$) berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-23) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren werden die spektralen Unterschiede erkenntlich.

Durch die Berechnung des Differenz- und Loadingspektrums wird deutlich, dass spektrale Unterschiede in den Wellenzahlbereichen bei 727 cm⁻¹, 785 cm⁻¹, 1003 cm⁻¹, 1093 cm⁻¹, 1252 cm⁻¹ und 1660 cm⁻¹ liegen (Tabelle 5-4).

Tabelle 5-4: Raman spektroskopische Unterschiede zwischen HaCaT Zellen und primären Keratinozyten. Die aufgelisteten Raman-Banden sind die signifikantesten Banden in den Differenzund Loadingspektren (siehe Abbildung 5-21) und die Zuordnung zu biochemischen Verbindungen wurde anhand von Literaturstellen vorgenommen.

Raman-Bande [cm ⁻¹]	Zuordn	ung	Vorkommen	Literatur
727	Adenine	DNA/RNA	HaCaT Zellen	90
785	v _s (PO ²⁻), Ringstrukturen in DNA/RNA- Basen	DNA/RNA	HaCaT Zellen	90
1003	Phenylalanin	Protein	HaCaT Zellen	90, 92, 104
1085-1096	v _s (PO ²⁻)	DNA	HaCaT Zellen	90
1252	Guanin, Cytosin	DNA/RNA	HaCaT Zellen	90
1660	Amid I	Protein	HaCaT Zellen	90

Die ANOVA dieser Raman-Banden hat außerdem ergeben, dass diese Unterschiede bis auf die Bande bei 1003 cm⁻¹ signifikant sind (siehe Abbildung 5-22). Die Auswertung der Ergebnisse der SVM ergaben eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 100% für die Keratinozyten.



Abbildung 5-22: Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Trennung von HaCaT Zellen und primären Keratinozyten identifiziert wurden. Alle Raman-Banden sind signifikant unterschiedlich für die analysierten Zelltypen. * p<0,05 (ANOVA)

Raman-Banden, die den molekularen Schwingungen von DNA- und RNA-Basen sowie PO²⁻ Streckschwingungen des DNA-Rückgrats zugeordnet wurden, sind in den Wellenzahlbereichen bei 727 cm⁻¹, 785 cm⁻¹, 1093 cm⁻¹ und 1252 cm⁻¹ zu finden [83, 90]. Spezifische Schwingungen der Aminosäure Phenylalanin, ein typischer Bestandteil von Proteinen, zeigen eine charakteristische Bande bei 1003 cm⁻¹ sowie die Amid I-Bande bei 1660 cm⁻¹, die auch charakteristisch für Proteine ist [90, 92, 104].

Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für die Raman-Spektren der HaCaT Zellen und primären Keratinozyten sind in Abbildung 5-23 dargestellt und zeigen zwei deutliche Cluster, von dem jedes Cluster die Daten eines Zelltyps enthält. Im Gegensatz zu den Scorewerten der Zelllinie zeigen die Werte der primären Zellen eine breitere Streuung, was durch die größere Heterogenität der isolierten Zellen erklärt werden kann. Für diese Analyse sind PC1 und PC4 notwendig, die 41% der spektralen Varianz erklären.



Abbildung 5-23: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von HaCaT Zellen ($n_{Messung} = 85$, $n_{Passage} = 3$) und primären Keratinozyten ($n_{Messung} = 70$, $n_{Spender} = 3$). Die HaCaT Zellen lassen sich über die PC1 und PC4 von den primären Keratinozyten trennen. 41% der spektralen Varianz ist durch diese Analyse erklärt.

5.2.2. Endothelzellen

Der Vergleich von transformierten und primären Zellen wurde anhand von hMEC-1 Zellen und primären mv Endothelzellen angestellt. In Abbildung 5-24 sind lichtmikroskopische Aufnahmen dieser beiden Zelltypen gezeigt, aus denen deutlich wird, dass kaum morphologische Unterschiede zwischen den primären und transformierten Zellen bestehen.



Abbildung 5-24: Lichtmikroskopische Aufnahmen von hMEC-1 Zellen (A) und mv Endothelzellen (B). Es sind nur sehr geringe morphologische Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Pro Versuchsansatz wurden 25-30 Zellen der primären Zellen sowie drei unterschiedliche Passagen der hMEC-1 Zellen vermessen. Die Mittelwertspektren 88



dieser Zellen zeigen bis auf die Raman-Bande bei 980 cm⁻¹ nur geringe Unterschiede (siehe Abbildung 5-25).

Dieser Wellenzahlbereich ist sowohl innerhalb des Differenz- als auch des Loadingspektrums deutlich als Bande erkennbar, wobei die übrigen Teile dieser Spektren strukturell sehr verschieden sind und ein niedriges Signal/Rausch-Verhältnis aufweisen. Wie bereits in Tabelle 5-3 aufgelistet, kann diese Raman-Bande Biomolekülen wie Proteinen und Lipiden zugeordnet werden. Die Trennung transformierter und primärer Zellen durch die multivariate Analyse der Raman-Spektren war nicht erfolgreich, da keine Gruppierungen innerhalb des Scoreplots sichtbar sind (siehe Abbildung 5-26).

Abbildung 5-25: Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum von hMEC-1 Zellen ($n_{Messung} = 88$, $n_{Passage} = 3$) und primären mv Endothelzellen ($n_{Messung} = 84$, $n_{Spender} = 1$, $n_{Passage} = 3$). Das Loadingspektrum ist für die PC6 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-26) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren ist deutlich erkennbar, dass der größte spektrale Unterschied im Wellenzahlbereich um 980 cm⁻¹ liegt.


Abbildung 5-26: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von hMEC-1 Zellen ($n_{Messung} = 88$, $n_{Passage} = 3$) und primären mv Endothelzellen ($n_{Messung} = 84$, $n_{Spender} = 1$, $n_{Passage} = 3$). Diese beiden Zelltypen lassen sich weder über PC1 noch über PC2-PC6 trennen. Durch diese Analyse lassen sich 52% der spektralen Varianz erklären.

Die Berechnung der Scorewerte für die charakteristische Bande bei 980 cm⁻¹ zeigt, dass eine Gruppierung der beiden Zelltypen möglich ist (siehe Abbildung 5-27).



Abbildung 5-27: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse unter ausschließlicher Verwendung der Raman-Bande bei 980 cm⁻¹ der Spektren von hMEC-1 Zellen ($n_{Messung}$ = 88, $n_{Passage}$ = 3) und primären mv Endothelzellen ($n_{Messung}$ = 84, $n_{Spender}$ = 1, $n_{Passage}$ = 3). Eine Trennung dieser Zellen ist über die Auswahl des spezifischen Spektrenbereichs erfolgreich über PC2. Diese Analyse erklärt 91% der spektralen Varianz.

Die Gruppierung der Daten erfolgt hauptsächlich über PC2 und mit dieser Analyse werden 91% der spektralen Varianz erklärt.

5.2.3. Chondrozyten

Die Detektion möglicher kanzerogener Veränderungen primärer Zellen während der *in-vitro*-Kultivierung soll durch den Vergleich primärer Chondrozyten und Zellen der Chondrosarkomzelllinie SW1353 analysiert werden. Da es schwierig ist, Biopsien gesunder Knorpelgewebe zu erhalten, wurden für diese Studie primäre, kommerziell erhältliche Chondrozyten verwendet. Wie in Abbildung 5-28 zu erkennen ist, sind die Zellen der Zelllinie und die primären Chondrozyten morphologisch nur sehr schwer voneinander unterscheidbar.



Abbildung 5-28 Lichtmikroskopische Aufnahmen von SW1353 Zellen (A) und primären Chondrozyten (B). Es sind keine morphologischen Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen zu erkennen. Die Aufnahme der SW1353-Zellen wurde von der Cell Lines Service (CLS, Eppelheim) zur Verfügung gestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Raman spektroskopische Untersuchungen sind von vier unterschiedlichen Passagen der SW1353 Zellen und drei verschiedenen Passagen der primären Chondrozyten durchgeführt worden. Pro Messreihe sind 25-30 Zellen vermessen worden. Die Analyse der Mittelwertspektren sowie der Differenz- und Loadingspektren zeigt, dass die spektralen Unterschiede der beiden Zelltypen minimal sind und sich die Spektren nur in der Grundlinie unterscheiden (siehe Abbildung 5-29).



Abbildung 5-29: Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum von SW1353 Zellen ($n_{Messung} = 121$, $n_{Passage} = 4$) und primären Chondrozyten ($n_{Messung} = 82$, $n_{Spender} = 1$, $n_{Passage} = 3$). Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-30) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren ist erkenntlich, dass der größte Unterschied dieser Spektren in der Grundlinie liegt.

Die Analyse der Spektren mit der SVM hat für die Chondrozyten eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 97% ergeben.

Die Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von primären Chondrozyten und SW1353 Zellen zeigt eine klare Trennung der beiden Zelltypen über die PC1-Achse im Scoreplot (siehe Abbildung 5-30). Wie bereits für den Vergleich von Keratinozyten und HaCaT Zellen gezeigt, streuen die Werte der Scores der primären Zellen deutlich mehr, als die der SW1353 Zellen. Durch diese Analyse, die PC1 und PC3 verwendet, werden 82% der spektralen Varianz erklärt.



Abbildung 5-30: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von SW1353 Zellen ($n_{Messung} = 120$, $n_{Passage} = 4$) und primären Chondrozyten ($n_{Messung} = 85$, $n_{Spender} = 1$, $n_{Passage} = 3$). Die SW1353 Zellen lassen sich über die PC1 deutlich von den humanen Chondrozyten trennen. Durch diese Analyse können 82% der spektralen Varianz erklärt werden.

6.3. Charakterisierung von Knorpel und Knochen

Die Behandlung von Knorpeldefekten mit *in vitro* kultivierten Knorpeltransplantaten ist eine mögliche Strategie und war eine der ersten Tissue Engineering Anwendungen, die klinisch getestet wurden [105, 106]. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den einzigen im Knorpel vorkommenden Zelltyp, die Chondrozyten, genauer zu charakterisieren. Dafür sollten Unterschiede innerhalb der Raman-Spektren von vitalen Chondrozyten und Stammzellen detektiert sowie der Differenzierungszustand von Chondrozyten anhand der Raman-Spektren identifiziert werden. Neben der Analyse von vitalen Zellen lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Charakterisierung von fixiertem Gewebe und histologischen Schnitten mittels Raman-Spektroskopie. Diese Untersuchungen erfolgten anhand der extrazellulären Matrix von fixiertem Knorpel- und Knochengewebe. Dabei lag der Fokus der Analyse auf der zonalen Struktur des Knorpels und auf dem Vergleich einer von osteogen differenzierten Osteoblasten *in vitro* synthetisierten Matrix mit einer von undifferenzierten Osteoblasten produzierten Kontrollmatrix.

6.3.1. Charakterisierung der Chondrozyten

Für die Analyse der primären Chondrozyten und Stammzellen wurden, im Gegensatz zu vorherigen Experimenten, nicht humane sondern porcine Zellen verwendet. Pro Messreihe wurden 20-30 Zellen vermessen und insgesamt Zellen von drei Spendertieren verwendet.

In Abbildung 5-31 sind die Raman-Mittelwertspektren sowie die Loadings- und Differenzspektren der porcinen Stammzellen und Chondrozyten gezeigt. Die größten spektralen Unterschiede zwischen diesen beiden Zelltypen sind in den Wellenzahlbereichen bei 1003 cm⁻¹, 1090 cm⁻¹, 1295 cm⁻¹, 1437 cm⁻¹ und 1657 cm⁻¹ zu finden (Tabelle 5-5).



Abbildung 5-31: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum von porcinen Stammzellen ($n_{Messung} = 78$, $n_{Spender} = 3$) und porcinen Chondrozyten ($n_{Messung} = 60$, $n_{Spender} = 3$). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums Stammzellen von dem der Chondrozyten berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-33) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren werden die spektralen Unterschiede erkenntlich.

Alle genannten Raman-Banden zeigen für die beiden Zelltypen signifikante Unterschiede in den Intensitäten (siehe Abbildung 5-32). Die Intensitäten der Raman-Banden bei 1295 cm⁻¹ und 1437 cm⁻¹ sind nicht normal verteilt und wurden daher mittels der Kruskal-Wallis ANOVA ausgewertet.



Abbildung 5-32: Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Trennung von primären, porcinen Stammzellen und Chondrozyten identifiziert wurden. Alle Raman-Banden sind signifikant unterschiedlich für die analysierten Zelltypen. * p<0,05 (ANOVA)

Für die spektralen Daten wurden eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 98% für die Chondrozyten erhalten.

Wie bereits in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, kann die Raman-Bande bei 1003 cm⁻¹ den Schwingungen des Phenylalanins und somit dem Gesamtproteingehalt zugeordnet werden [90, 92]. Kohlenwasserstoffbindungen und Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen können durch Raman-Banden bei 1090 cm⁻¹, 1295 cm⁻¹ und 1437 cm⁻¹ identifiziert werden und resultieren aus molekularen Schwingungen von Lipidstrukturen [90, 107]. Die Raman-Bande bei 1657 cm⁻¹ wurde sowohl einer Amid-Schwingung als auch Kohlenstoffverbindungen und somit zwei unterschiedlichen Stoffklassen, den Proteinen (Kollagen) und den Lipiden zugewiesen [90, 108].

Tabelle 5-5 Raman spektroskopische Unterschiede zwischen porcinen Stammzellen und Chondrozyten. Die aufgelisteten Raman-Banden sind die signifikantesten Banden in den Differenzund Loadingspektren (siehe Abbildung 5-31) und die Zuordnung zu biochemischen Verbindungen wurde anhand von Literaturstellen vorgenommen.

Raman-Bande [cm ⁻¹]	Zuordnung		Vorkommen	Literatur
1001-1005	Phenylalanin	Proteine	Stammzellen	90, 92
1087-1090	v _s (C-C)	Lipide	Chondrozyten	90
1295-1300	v _t (CH ₂)	Lipide	Chondrozyten	107
1437-1442	v _d (CH ₂)	Lipide	Chondrozyten	90
1657-1670	Amid I, v(C=C)	Protein, Lipide	Chondrozyten	90, 108

Der Score-Plot, der für die spektralen Daten der porcinen Stammzellen und Chondrozyten erhalten wurde, ist in Abbildung 5-33 dargstellt. Für diese Analyse sind PC2 gegen PC1 aufgetragen und 77% der spektralen Varianz erklärt. Die zwei Zelltypen sind über die PC1-Achse voneinander getrennt.



Abbildung 5-33: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von porcinen Stammzellen ($n_{Messung} = 68$, $n_{Spender} = 3$) und Chondrozyten ($n_{Messung} = 60$, $n_{Spender} = 3$). Diese beiden Zelltypen lassen sich über die PC1-Achse voneinander trennen. Durch diese Analyse werden 77% der spektralen Varianz erklärt.

Neben der Untersuchung der Unterscheidbarkeit von porcinen Chondrozyten und Stammzellen lag ein weiterer Fokus auf der Analyse des Differenzierungszustandes der Chondrozyten. Grundsätzlich synthetisieren differenzierte Chondrozyten des hyalinen Knorpels, Matrixbestandteile wie Glykosaminoglykane aber auch Kollagen

5. Ergebnisse

Typ 2 [61, 109]. Im Gegensatz dazu synthetisieren dedifferenzierte Chondrozyten nicht mehr die gewebespezifischen Matrixbestandteile des hyalinen Knorpels sondern Proteine wie beispielsweise Kollagen Typ 1. Ferner wird die Synthese der Proteoglykane wie beispielsweise Aggrekan stark reduziert bzw. ganz beendet [17]. Um diese beiden Differenzierungszustände untersuchen zu können, wurden die Chondrozyten über einen Zeitraum von drei Wochen im Monolayer kultiviert und wöchentlich sowohl Raman spektroskopisch als auch immunzytologisch analysiert. In Abbildung 5-34 sind die Mittelwertspektren der frisch isolierten (Tag 0) sowie die Spektren der für eine, zwei und drei Wochen kultivierten Chondrozyten dargestellt.



Abbildung 5-34: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen sowie das Loadingspektrum von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 26$), für eine ($n_{Messung} = 30$), zwei ($n_{Messung} = 30$) oder drei ($n_{Messung} = 30$) Wochen kultiviert wurden. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-36) gezeigt. Anhand des Loadingspektrums werden die spektralen Unterschiede deutlich.

Wie anhand des Loadingspektrums erkennbar wird, ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem Spektrum der frisch isolierten Zellen und den übrigen drei Mittelwertspektren in den Wellenzahlbereichen bei 1066 cm⁻¹, 1078 cm⁻¹, 1266 cm⁻¹, 1300 cm⁻¹, 1437 cm⁻¹ und 1657 cm⁻¹ zu beobachten (siehe Tabelle 5-6).

Alle untersuchten Raman-Banden der frisch isolierten Chondrozyten sind in ihrer Intensität signifikant höher als die der kultivierten Chondrozyten (siehe Abbildung 5-35). Die Raman-Banden der kultivierten Chondrozyten unterscheiden sich nicht signifikant in ihren Intensitäten. Sowohl Abbildung 5-34 als auch Abbildung 5-35 enthalten der Übersichtlichkeit halber nur die Daten für einen Spender, für zwei weitere Spender ergaben sich vergleichbare Ergebnisse (siehe Anhang).



Abbildung 5-35: Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Analyse des Differenzierungsstatus porciner Chondrozyten identifiziert wurden. Alle Raman-Banden sind signifikant für Tag 0 gegenüber Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Es konnte keine Signifikanz zwischen den Raman-Banden von Tag 7, Tag 14 und Tag 21 detektiert werden * p<0,05 (ANOVA)

Die Raman-Bande bei 1066 cm⁻¹ kann den Schwingungen der SO₃⁻-Molekülgruppen und somit Glykosaminoglykanen zugeordnet werden [110, 111]. Phosphat und Phospholipide zeigen eine Raman-Bande im Wellenzahlbereich bei 1078 cm⁻¹ [90]. Die Raman-Bande bei 1266 cm⁻¹ wurde der Amid III-Bande zugeordnet und unter anderem auch den molekularen Schwingungen von Kollagen Typ 2 [90, 111]. Protein- und Lipidmoleküle zeigen Raman-Banden in den Wellenzahlbereichen bei 1300 cm⁻¹, 1437 cm⁻¹ und 1657 cm⁻¹ [56, 90, 108]. **Tabelle 5-6: Raman spektroskopische Unterschiede zwischen frisch isolierten und kultivierten Chondrozyten.** Die aufgelisteten Raman-Banden sind die signifikantesten Banden in den Mittelwertund Loadingspektren (siehe Abbildung 5-34) und die Zuordnung zu biochemischen Verbindungen wurde anhand von Literaturstellen vorgenommen.

Raman-Bande [cm ⁻¹]	Z	Literatur	
1065-1069	v _s (SO ³⁻)	Glykosaminoglykane, Chondroitin-6-Sulfat	110, 111
1078-1080	v _s (C-C), v _s (C-O), v _s (PO ²⁻)	Phosphat, Phospholipide, Lipide	60,90
1266-1270	Amid III	Kollagen, Protein	90, 111
1300	v _t (CH ₂)	Lipide	56, 90, 108
1437-1442	Amid I, v _d (CH ₂)	Proteine, Lipide	90, 107
1657-1660	Amid I, v(C=C)	Proteine, Lipide	90

In Abbildung 5-36 ist der Score-Plot für die frisch isolierten sowie kultivierten Chondrozyten aufgetragen, deren Trennung über die PC1-Achse erfolgreich ist.



Abbildung 5-36: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 26$), für eine ($n_{Messung} = 30$), zwei ($n_{Messung} = 30$) oder drei ($n_{Messung} = 30$) Wochen kultiviert wurden. Eine Trennung der frisch isolierten von den kultivierten Chondrozyten ist über die PC1-Achse möglich. Durch diese Analyse werden 80% der spektralen Varianz erklärt.

Die Scores der frisch isolierten Chondrozyten zeigen überwiegend positive PC1-Werte und die Zellen, die für eine, zwei und drei Wochen kultiviert wurden, gruppieren überwiegend auf der Seite der negativen PC1-Werte. Durch diese Analyse konnten 80% der spektralen Varianz erklärt werden.

Eine getrennte Auftragung der Scores der unterschiedlichen Kultivierungsdauern ist in Abbildung 5-37 dargestellt. Anhand dieser Darstellung wird deutlich, dass der prozentuale Anteil der Scores mit negativen Werten für PC1 von Tag 0 über Tag 7, Tag 14 bis hin zu Tag 21 stetig zunimmt.



Abbildung 5-37: Einzelne Score-Plots der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von Chondrozyten, die gar nicht (n_{Messung} = 26), für eine (n_{Messung} = 30), zwei (n_{Messung} = 30) oder drei (n_{Messung} = 30) Wochen kultiviert wurden. Die Trennung der Score-Werte der unterschiedlich lang kultivierten Chondrozyten ist über die PC1-Achse möglich. Je höher der Kultivierungszeitraum der Chondrozyten, desto größer der Anteil der Scores mit negativen Werten für PC1.

Um den Differenzierungszustand anhand einer Standardmethode zu bestimmen, wurden immunzytologische Färbungen der Zellen durchgeführt. Diese Analyse der frisch isolierten sowie kultivierten Chondrozyten auf Kollagen Typ 1, Kollagen Typ 2 und Aggrekan ist in Abbildung 5-38 dargestellt. Für die frisch isolierten Chondrozyten konnte Kollagen Typ 2 und Aggrekan aber kein Kollagen Typ 1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-38 A, E, I). Nach einer Kultivierungsdauer von einer Woche haben die Chondrozyten sowohl Kollagen Typ 1 als auch Kollagen Typ 2 und Aggrekan synthetisiert. Allerdings zeigten nach sieben Tagen deutlich weniger Zellen eine positive Färbung für die gelenkknorpelspezifischen Matrixbestandteile (Kollagen Typ 2 und Aggrekan) als direkt nach der Isolation (siehe Abbildung 5-38, B, F, J). Bereits nach zwei Wochen konnten kaum noch Kollagen Typ 2 und Aggrekan detektiert werden, wobei die Kollagen Typ 1-Synthese zugenommen hatte (siehe Abbildung 5-38 C, G, K). Für die Chondrozyten, die über einen Zeitraum von drei Wochen im Monolayer kultiviert wurden, konnte in der immunzytologischen Analyse nur noch sehr vereinzelt Kollagen Typ 2 bzw. Aggrekan nachgewiesen und eine weitere Zunahme der Kollagen Typ 1-Synthese detektiert werden (siehe Abbildung 5-38, D, H, L).



Abbildung 5-38: Immunzytologische Färbungen der frisch isolierten Chondrozyten sowie von Chondrozyten, die für eine, zwei und drei Wochen im Monolayer kultiviert wurden. Es wurden Antikörper gegen Kollagen Typ 1, Kollagen Typ 2 und Aggrekan verwendet. Eine Zunahme der Kollagen Typ 1-Synthese (A-D) sowie eine Abnahme der Kollagen Typ 2- (E-H) und Aggrekan- (I-L) Synthese über die Kultivierungsdauer konnte beobachtet werden.

6.3.2. Charakterisierung der extrazellulären Matrix des Knorpels

Die zonale Struktur des hyalinen Knorpels wurde anhand von Kryoschnitten analysiert. Die Knorpelbiopsien wurden während Knieimplantationsoperationen von Osteoarthritis-Patienten erhalten. Im Folgenden werden die Ergebnisse eines Spenders vorgestellt, wobei ähnliche Ergebnisse für zwei weitere Spender erhalten wurden und die dazugehörigen Abbildungen im Anhang zu finden sind.

Der Vergleich der Raman-Mittelwertspektren von der Superfizial- und der Radiärzone des hyalinen Knorpels ist in Abbildung 5-39 dargestellt. Außerdem sind die Loadingsund Differenzspektren aufgetragen, um die größten spektralen Unterschiede der beiden Zonen zu identifizieren, die in den Wellenzahlbereichen bei 817 cm⁻¹, 852 cm⁻¹, 920 cm⁻¹, 1064 cm⁻¹-1069 cm⁻¹ und 1341 cm⁻¹ liegen (siehe Tabelle 5-7).



Abbildung 5-39: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum der Superfizial- (n_{Messung} = 17) und Radiärzone (n_{Messung} = 18) des hyalinen Knorpels. Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Radiärzone von dem der Superfizialzone berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-41) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren werden die spektralen Unterschiede erkenntlich.

Die Unterschiede zwischen allen beschriebenen Raman-Banden sind signifikant (siehe Abbildung 5-40).



Abbildung 5-40 Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Trennung der Superfizial- und Radiärzone des hyalinen Knorpels identifiziert wurden. Alle Raman-Banden sind signifikant unterschiedlich für die analysierten Knorpelzonen. * p<0,05 (ANOVA)

Die Raman-Banden bei 817 cm⁻¹, 852 cm⁻¹ und 920 cm⁻¹ sind den molekularen Schwingungen der Aminosäure Prolin zugeordnet worden [87, 112, 113]. Da Kollagen zu einem Großteil aus Prolin besteht, wurde vermutet, dass die genannten Raman-Banden aus molekularen Schwingungen dieses Proteins resultieren [114]. Der Wellenzahlbereich bei 1064 cm⁻¹ steht für eine Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung und wurde dem Proteoglykan Aggrekan zugeordnet [110]. Da Chondroitinsulfate unter anderem SO₃⁻-Molekülgruppen tragen, die im Raman-Spektrum bei einer Wellenzahl zwischen 1065 -1069 cm⁻¹ gefunden wurden, ist dieser Wellenzahlbereich diesem Glykosaminoglykan zugeordnet worden [110, 111]. Weitere molekulare Schwingungen von Glykosaminoglykanen wurden in dem Wellenzahlbereich zwischen 1330 cm⁻¹ – 1341 cm⁻¹ gefunden [110, 111].

Tabelle 5-7: Raman spektroskopische Unterschiede zwischen der Superfizial- und Radiärzone des hyalinen Knorpels. Die aufgelisteten Raman-Banden sind die signifikantesten Banden in den Differenz- und Loadingspektren (siehe Abbildung 5-39) und die Zuordnung zu biochemischen Verbindungen wurde anhand von Literaturstellen vorgenommen.

Raman Bande [cm ⁻¹]	Zuordnung		Vorkommen	Literatur
815-818	Prolin	Kollagen	Superfizialzone	87, 112, 113
852-856	Prolin	Kollagen	Superfizialzone	112
918-920	Prolin	Kollagen	Superfizialzone	112, 113
1064	v _s (C-C)	Aggrekan	Radiärzone	110
1065-1069	$V_{s}(SO_{3})$	Chondroitinsulfat	Radiärzone	110, 111
1330-1341	<i>v</i> (C-H), Amid III	Glykosaminoglykan	Radiärzone	110, 111

In Abbildung 5-41 ist der Score-Plot für die Analyse der Superfizial- und der Radiärzone des Knorpels gezeigt, in dem PC5 gegen PC1 aufgetragen ist. Es sind zwei Score-Cluster erkennbar, die über die PC1- und PC5-Achse getrennt sind und die jeweils die Scores einer Knorpelzone enthalten. Durch diese Analyse sind 51 % der spektralen Varianz erklärt.



Abbildung 5-41: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der Superfizialzone ($n_{Messung}$ = 17) und Radiärzone ($n_{Messung}$ = 18) des hyalinen Knorpels. Diese beiden Zonen lassen sich über die PC1 und PC5 trennen. Durch diese Analyse werden 51 % der spektralen Varianz erklärt.

Im Anschluss an die Raman spektroskopische Analyse des Kryoschnittes wurde eine Safranin O/ Fast Green-Färbung angefertigt, um die unterschiedliche Zusammensetzung der Radiär- und der Superfizialzone biochemisch nachzuweisen [115]. Wie in Abbildung 5-42 zu sehen, zeigt die Radiärzone eine deutliche Orangefärbung im Gegensatz zur grün-blau gefärbten Superfizialzone.



Abbildung 5-42: Safranin O-Färbung histolo-Knorpelschnitte und gischer vor nach enzymatischer Behandlung. Glykosaminoglykane konnten durch eine Orangefärbung im unbehandelten Schnitt (A) detektiert werden. Nach der enzymatischen Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase (B) konnten keine Glykosaminoglykane mehr nachgewiesen werden. In grün-blau sind die Kollagenstrukturen angefärbt.

Durch diese histologische Färbung konnten die Glykosaminoglykane in der Radiärzone und Kollagenverbindungen in der Superfizialzone nachgewiesen werden.

5. Ergebnisse

Um die Zuordnung der Raman-Banden zu den molekularen Schwingungen der Glykosaminoglykane und Proteoglykane zu überprüfen, wurde der Kryoschnitt mit Chondroitinase behandelt, einem Enzym, das Glykosaminoglykane abbaut [116]. Anschließend wurde der behandelte Schnitt erneut Raman spektroskopisch vermessen sowie durch eine Safranin O/ Fast Green-Färbung analysiert. In Abbildung 5-42 (B) wird durch die fehlende Orangefärbung deutlich, dass der Abbau der Glykosaminoglykane/ Proteoglykane durch das Enzym erfolgreich war. Der Vergleich der Raman-Mittelwertspektren der Radiärzone, die vor und nach der enzymatischen Behandlung erhalten wurden, ist in Abbildung 5-43 dargestellt.



Abbildung 5-43: Raman-Mittelwertspektren und Standardabweichungen der Radiärzone des Knorpels vor ($n_{Messung} = 19$) und nach ($n_{Messung} = 19$) enzymatischer Behandlung. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Es ist erkenntlich, dass die Intensität der Raman-Banden in den Wellenzahlenbereichen bei 1064 cm⁻¹ nach der enzymatischen Behandlung abgenommen haben. Außerdem ist die Standardabweichung für die enzymatisch behandelte Probe deutlich größer.

Es ist zu erkennen, dass die Intensitäten der Raman-Banden der enzymbehandelten Radiärzone, im Vergleich zur unbehandelten Probe, in den Wellenzahlbereichen bei 1064 cm⁻¹ abgenommen haben. Auch die Berechnung der ANOVA der zonenspezifischen Raman-Banden (siehe Abbildung 5-44) hat ergeben, dass nur die Raman-Bande bei 1064 cm⁻¹ signifikant abgenommen hat im Gegensatz zu den Banden bei 817 cm⁻¹, 852 cm⁻¹ und 920 cm⁻¹ und 1341 cm⁻¹. Wie bereits in Tabelle 5-7 aufgelistet, konnte die Raman-Bande bei 1064 cm⁻¹ dem Chondroitinsulfat zugeordnet werden.



Abbildung 5-44: Vergleich der Intensitäten der Raman-Banden, die für die Unterscheidung der Radiärzone des hyalinen Knorpels vor und nach der enzymatischen Behandlung analysiert wurden. Es ist nur die Raman-Bande bei 1064 cm⁻¹ signifikant unterschiedlich. * p<0,05 (ANOVA)

Zudem wird aus beiden Analysen deutlich, dass die Raman-Spektren der enzymbehandelten Probe deutlich höhere Standardabweichungen zeigen als die Spektren der unbehandelten Probe

6.3.3. Charakterisierung der Knochenmatrix

Neben der Verwendung von Transplantaten spielt in der Regenerativen Medizin die Herstellung von *in-vitro*-Testsystemen eine wichtige Rolle [117]. Um beispielsweise die Vorgänge, die bei der Metastasierung von Krebszellen in Knochengewebe ablaufen, analysieren zu können, werden Knochenmodelle verwendet [118]. Um bestimmen zu können, wie gut die Eigenschaften der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix mit den Merkmalen der nativen Knochenmatrix übereinstimmen, wurden beide Proben vermessen und miteinander verglichen.

Dafür wurden Messungen von fixiertem primärem Knochengewebe als auch von einer *in vitro* produzierten Knochenmatrix durchgeführt. In Abbildung 5-45 sind die Raman-Mittelwertspektren der primären Knochenmatrizes von drei verschiedenen Spendern dargestellt. Diese Spektren sind sehr ähnlich strukturiert und zeigen Raman-Banden in den Wellenzahlbereichen bei 856 cm⁻¹, 961 cm⁻¹, 1072 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹ (Tabelle 5-8).



Abbildung 5-45: Raman-Mittelwertspektren und Standardabweichungen primärer Knochenmatrizes (n_{Messung/Spender} = 10). Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Die charakteristischsten Intensitätsachse Raman-Banden verschoben. sind in den Wellenzahlbereichen bei 856 cm⁻¹, 961 cm⁻¹, 1072 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹ zu finden.

Die charakteristische Raman-Bande bei 961 cm⁻¹ wird den molekularen Schwingungen des Phosphats, einem Bestandteil des Hydroxylapatites, zugeordnet [119, 120]. Die Raman-Banden bei 856 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹ wurden den Schwingungen des Prolins und Kohlenwasserstoffbindungen zugeordnet und daher dem Protein Kollagen [111, 119]. Die Carbonatschwingung wird durch die Raman-Bande bei 1072 cm⁻¹ identifiziert und kann der Substanz (Hydroxyl)Apatit zugeordnet werden [90, 119-126].

Tabelle 5-8: Raman-Banden primärer Knochenproben. Die aufgelistete	en Raman-Banden sind die			
charakteristischen Banden in den Mittelwertspektren (siehe Abbildung 5-	45) und die Zuordnung zu			
biochemischen Verbindungen wurde anhand von Literaturstellen vorgenommen.				

Raman Bande [cm ⁻¹]	Zuordnung		Literatur
856	Prolin	Kollagen	119
958-961	<i>v</i> s(PO ₄ ³⁻)	Hydroxylapatit	90, 119-126
1072	<i>v</i> (CO ₃ ²⁻)	Apatit	90, 119-126
1453-1458	v _K (CH ₂)	Kollagen	120, 124, 125

Die Analyse der *in vitro* synthetisierten Matrizes ist hier nur für einen Spender gezeigt. Ähnliche Ergebnisse, die für zwei weitere Spender erhalten wurden, sind im Anhang zu finden. Für diese Analyse wurden humane Osteoblasten einerseits durch Zugabe von Differenzierungsmedium osteogen differenziert und andererseits als Kontrolle mit Expansionsmedium kultiviert. In Abbildung 5-46 sind die Raman-Mittelwertspektren der von Osteoblasten *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix sowie die der Kontrollmatrix dargestellt.



Abbildung 5-46: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix ($n_{Messung} = 15$) sowie der dazugehörigen Kontrollmatrix ($n_{Messung} = 15$). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der osteogen differenzierten Matrix von dem der undifferenzierten Matrix berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-47) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Anhand der Differenz- und Loadingspektren ist deutlich erkennbar, dass der größte spektrale Unterschied in dem Raman-Peak bei 961 cm⁻¹ liegt.

Wie anhand der Loading- und Differenzspektren deutlich wird, liegt der größte Unterschied der beiden Mittelwertspektren im Wellenzahlbereich bei 961 cm⁻¹. Diese Raman-Bande wird nur im Spektrum der Matrix der osteogen differenzierten Zellen gefunden und nicht im Spektrum der Kontrollmatrix. Genau diese Raman-Bande wurde bereits im oberen Abschnitt für die Messungen der primären Knochenmatrix beschrieben und kann dem Hydroxylapatit zugeordnet werden.

Der Score-Plot für die Raman-Spektren der Kontrollmatrix und der Matrix der osteogen differenzierten Osteoblasten ist in Abbildung 5-47 gezeigt. Es sind zwei

deutlich voneinander getrennte Gruppen zu erkennen, die jeweils die Scores einer Matrix enthalten und über die PC1-Achse getrennt werden. Für PC1 und PC2 sind 88% der spektralen Varianz erklärt. Ferner ist erkenntlich, dass die Scores für die Kontrollmatrix deutlich weniger streuen als die der Matrix der osteogen differenzierten Zellen.



Abbildung 5-47: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix (n_{Messung} = 15) und der Kontrollmatrix (n_{Messung} = 15). Eine Trennung dieser beiden Matrizes ist über die PC1-Achse möglich. Durch diese Analyse konnten 88% der spektralen Varianz erklärt werden.

6. Diskussion der Ergebnisse

Eine markerfreie, nicht invasive Analysemethode von Zellen, Geweben oder Organen würde sowohl in der klinischen Diagnostik als auch im Bereich der Regenerativen Medizin einen zeitlichen und ökonomischen Vorteil bringen. Gerade in der klinischen Diagnostik, wo es darauf ankommt, möglichst schnell das Ergebnis einer Analyse zu bekommen, stellt die Etablierung einer zerstörungs- und markerfreien Technologie einen deutlichen Fortschritt dar.

Für die Herstellung von Produkten für die Regenerative Medizin müssen Zellen isoliert werden, die dann in Form von beispielsweise Transplantaten, Zellsuspensionen oder in-vitro-Testsystemen genutzt werden [105, 127]. Um gewährleisten zu können, dass diese Zellpopulationen eine einheitliche Qualität besitzen, ist die Charakterisierung dieser Zellen ein wichtiger Schritt in der Qualitätssicherung solcher Produkte [128]. Des Weiteren ist die Analyse des fertigen Produktes sowie die Charakterisierung des Konstrukts während und nach einer Testung/ Implantierung unabdingbar, um dessen Funktionalität und Qualität evaluieren zu können. Die bisher angewendeten, traditionellen Methoden zur Charakterisierung der Zellsuspensionen und der Konstrukte, wie die Histologie, die Immunchemie oder die Molekularbiochemie sind invasiv, d.h. sie bedingen die Zerstörung bzw. Veränderung des Konstrukts und der Einzelzellen. Für die Herstellung von Tissue Engineering Produkten bedeutet das die Herstellung eines zusätzlichen, identischen Konstrukts, das ausschließlich der Charakterisierung dient oder eine schädigende Probennahme [129]. Nicht invasive Analysemethoden wie beispielsweise die OCT, die NMR oder die Multiphotonenspektroskopie erlauben die zerstörungsfreie Analyse solcher Konstrukte. Allerdings handelt es sich bei dabei entweder nur um reine bildgebende Verfahren oder um Geräte mit sehr hohen Anschaffungskosten, weshalb diese Analysemethoden in der Qualitätskontrolle von Tissue Engineering Konstrukten bisher nicht etabliert wurden.

Die Raman-Spektroskopie ist eine etablierte Methode, um Zellen und extrazelluläre Matrizen nicht invasiv zu charakterisieren [39, 130]. Diese zelluläre Analyse basiert auf der unterschiedlichen und zellspezifischen biochemischen Zusammensetzung verschiedener Zelltypen und Gewebe. Detektiert werden diese Unterschiede in Form von Raman-Banden innerhalb eines Spektrums. Um diese sehr feinen zellulären Unterschiede identifizieren zu können, werden die spektralen Daten herkömmlicherweise mit Hilfe einer multivariaten Analyse ausgewertet [131]. Immer mehr Arbeitsgruppen verwenden zusätzlich die Support Vector Machine für die Klassifikations- und Regressionsanalysen der spektralen Daten [132-134].

Die Raman-Spektroskopie wurde bereits für die Charakterisierung verschiedenster Zelltypen, Gewebearten und Organe beschrieben wie beispielsweise für Blutzellen, bronchiales oder kolorektales Gewebe [135-140]. Außerdem ist dieses Verfahren als diagnostisches Werkzeug für ein breites Spektrum von Krankheiten wie Krebs, Alzheimer und koronare Herzerkrankungen sowie Erkrankungen der Mundhöhle beschrieben worden [67-69, 74, 141-144]. Grundsätzlich wurden sowohl vitale Zellen als auch histologische Schnitte der unterschiedlichen Gewebeproben sowie Zellsuspensionen analysiert [71, 137, 145]. Obwohl die Anzahl der Publikationen, in denen die Raman spektroskopische Charakterisierung von biologischen Materialien beschrieben werden, in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat, verwenden die meisten Autoren fixierte Proben sowie Zelllinien und nicht vitales primäres Material [70].

Die Unterscheidung von verschiedenen Zelltypen spielt gerade in dem Bereich der Regenerativen Medizin eine große Rolle, wo häufig sowohl die Biopsie als auch das gezüchtete Transplantat aus mehreren Zelltypen besteht. Daher liegt ein Fokus dieser Arbeit darauf, verschiedene primäre Zelltypen vital anhand ihrer Raman-Spektren voneinander zu unterscheiden. Ferner ist es sowohl für die klinische Diagnostik als auch für die Qualitätssicherung in Tissue Engineering Prozessen wichtig, potentielle pathologische Veränderungen der Zellen detektieren zu können. Aus diesem Grund wurden die Raman-Spektren von primären Zellen mit denen von modifizierten Zellen verglichen.

Die Untersuchung der zelltypischen extrazellulären Matrix gibt neben der Charakterisierung der Einzelzellen Hinweise auf die Funktionalität der Zellen. Bei der Überprüfung der Qualität von Tissue Engineering Transplantaten wie beispielsweise Knorpeltransplantaten spielt die richtige Zusammensetzung der Matrix eine wichtige Rolle, um die Funktionalität dieser Konstrukte gewährleisten zu können [146, 147]. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der extrazellulären Matrix des Knorpels sowie die Identifizierung des Differenzierungsstatus der Chondrozyten, der einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix hat [147].

Ferner wurden die Raman-Spektren von *in vitro* kultivierten Knochenmatrizes mit denen primärer Knochenbiopsien verglichen, um die chemische Zusammensetzung der *in vitro* synthetisierten mit der nativen Matrix vergleichen zu können.

Grundsätzlich wurden bei allen Analysen spezifische Raman-Banden und Unterschiede in den Intensitäten der Raman-Banden detektiert. Die spektralen Daten wurden multivariat mit einer Hauptkomponentenanalyse ausgewertet, um die unterschiedlichen Zelltypen erfolgreich voneinander zu trennen sowie die Unterschiede innerhalb und zwischen den extrazellulären Matrizes detektieren zu können. Um die Spezifität und Sensitivität der Daten zu überprüfen, wurden die Spektren zusätzlich mit Hilfe der SVM analysiert.

Es muss vorab angemerkt werden, dass die Zuordnungen der Raman-Banden zu den jeweiligen molekularen Schwingungen und den teilweise sehr spezifischen Biomolekülen in der Literatur kontrovers diskutiert werden. Es kann dadurch zu Mehrfachzuordnungen einzelner Banden kommen und die im Folgenden diskutierten Ergebnisse geben nur die in der Literatur beschriebenen Zuordnungen wieder.

6.1. Charakterisierung von Hautzellen

Die Detektion pathologischer Veränderungen sowie die Analyse der molekularen und strukturellen Zusammensetzung der Haut ist mittels Raman spektroskopischer Untersuchungen möglich [62, 148-151]. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Raman-Spektroskopie ein geeignetes Diagnostikwerkzeug für Hautkrebs ist [63, 89, 94, 152, 153]. Ferner ist diese Methode verwendet worden, um die Reaktion der Haut auf Kontrastmittel, Nanopartikel und toxische Substanzen zu analysieren [154-156]. Obwohl bereits Hautzellen nicht invasiv charakterisiert wurden, indem verschiedene Kultivierungssubstrate verwendet oder unterschiedliche Zelllinien und Zellorganellen analysiert wurden, sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen bisher noch nicht unbehandelt Raman spektroskopisch analysiert worden [104, 157-160]. Unterschiede zwischen den verschiedenen primären Hautzelltypen konnten anhand spezifischer Raman-Banden und unterschiedlicher Intensitäten der Raman-Banden detektiert werden. Durch die multivariate Analyse der Raman-Spektren konnte erfolgreich zwischen den unterschiedlichen Hautzelltypen unterschieden werden.

Die spektroskopische Unterscheidung von primären Fibroblasten und Keratinozyten basiert auf den signifikanten Unterschieden der Raman-Banden bei 715 cm⁻¹, 870 cm⁻¹, 955 cm⁻¹, 1037 cm⁻¹, 1079 cm⁻¹ und 1269 cm⁻¹. Der deutlichste Unterschied

konnte in der Raman-Bande bei 955 cm⁻¹ detektiert und Lipidstrukturen bzw. Cholesterol zugeordnet werden [85]. Da diese Bande in den Spektren der Keratinozyten vorherrschend ist, kann angenommen werden, dass die Lipid- bzw. Cholesterolkonzentration in Keratinozyten höher ist als in Fibroblasten. Gleiche Beobachtungen wurden durch die Analyse des Lipidgehaltes von Keratinozyten und Fibroblasten durch Extraktion gemacht [161]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten zehnmal mehr Cholesterol pro mg Zellprotein synthetisieren als Fibroblasten. Des Weiteren kann der höhere Lipidgehalt der Keratinozyten, die in der epidermalen Hautschicht lokalisiert sind, durch die Funktionen der Epidermis erklärt werden. Diese Hautschicht schützt den Körper durch die von Keratinozyten synthetisierte hydrophobe Permeabilitätsbarriere aus Lipiden bestehend vor dem Verlust aber auch vor dem unerwünschten Eindringen von Wasser [162]. Die in der dermalen Hautschicht lokalisierten Fibroblasten haben im Gegensatz dazu keine Notwendigkeit zur Lipidproduktion, da diese Hautschicht eher eine Schutzfunktion vor Scher-, Zug- oder Druckkräften hat [162, 163]. Neben der Zuordnung der Raman-Bande bei 955-956 cm⁻¹ zu Cholesterol bzw. Lipidstrukturen wurde diese Bande molekularen Schwingungen des Keratins zugewiesen [86]. Diese Zuordnung wurde durch die Raman spektroskopische Untersuchung von bovinen Hufen gemacht. Keratin ist ein Strukturprotein, das in den Zellen der Epidermis wie beispielsweise in den Keratinozyten vorkommt [164]. Dieses wasserunlösliche Protein schützt die Haut mechanischem Stress und macht die äußerste Schicht vor der Haut wasserundurchlässig [165]. Daher kann angenommen werden, dass die Unterschiede der Raman-Spektren von Keratinozyten und Fibroblasten auch auf die molekularen Schwingungen des Keratins zurückzuführen sind.

Raman-Banden, die aus den Messungen der Fibroblasten resultieren, sind in den Wellenzahlbereichen bei 870 cm⁻¹, 1037 cm⁻¹ und 1269 cm⁻¹ zu finden. Ähnliche Raman-Banden durch spektroskopische Untersuchungen sind auch von Gewebeschnitten der Haut und der Brust sowie für Kollagenfasern von Rattenschwänzen und bovinen Sehnen gefunden worden und wurden dem Protein Kollagen zugewiesen [87-89, 91]. Außerdem wurde in einer anderen Studie beschrieben, dass die Raman-Spektren der Dermis große Übereinstimmungen mit den Raman-Spektren von Kollagen zeigen, da die dermale Hautschicht zu einem großen Teil aus verschiedenen Kollagenen besteht [62]. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die signifikant höheren Raman-Banden bei 870 cm⁻¹, 1037 cm⁻¹

und 1269 cm⁻¹ in den Spektren von Fibroblasten auf die Fähigkeit dieser Zellen, im Gegensatz zu Keratinozyten, Kollagene zu synthetisieren, zurückzuführen ist. Da das gemessene Kollagen in der Zelle lokalisiert ist und noch nicht durch Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben wurde, wird angenommen, dass es sich hierbei um die Vorstufe Prokollagen handelt. Diese Vorstufe des Kollagens unterscheidet sich allerdings nur unwesentlich von dem Kollagen im extrazellulären Raum.

Obwohl eine Kontamination der Keratinozytenpopulation mit Fibroblasten während der Zellisolierung aufgrund der Isolierungsmethode unwahrscheinlich ist, muss trotzdem vor der Verwendung dieser Zellen für Tissue Engineering Anwendungen sichergestellt werden, dass es sich um eine reine, definierte Keratinozytenpopulation handelt. Die berechnete Sensitivität von 100% für die Kertinozytenpopulation zeigt, dass alle Spektren der Keratinozyten richtig vorhergesagt worden sind und nicht fälschlicherweise als Fibroblasten erkannt wurde. Eine Spezifität von 77% bedeutete, dass 23% der Fibroblasten fälschlicherweise als Keratinozyten vorhergesagt worden sind und somit ein Restrisiko besteht, eine potentielle Kontamination mit Fibroblasten nicht zu detektieren.

Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der dermalen und epidermalen Hautschicht ist die Pigmentierung der Haut, die durch das Pigment Melanin verursacht wird, ein wichtiges Charakteristikum. Dieses Pigment ist verantwortlich für die Hautfarbe und wichtig für den Schutz der Haut vor UV-Strahlung [12]. Melanin wird von Melanozyten synthetisiert, verteilt und zu den umliegenden Keratinozyten transferiert und eingelagert [166]. Somit besteht ein großer Unterschied dieser beiden Zelltypen, die beide in der Epidermis lokalisiert sind, in der Fähigkeit Melanin zu synthetisieren.

Die Raman spektroskopischen Untersuchungen der Melanozyten und Keratinozyten haben gezeigt, dass sich die Spektren sowohl in der Grundlinie als auch in den Wellenzahlbereichen bei 854 cm⁻¹, 932 cm⁻¹, 1003 cm⁻¹ und 1380 cm⁻¹ signifikant unterscheiden. *In vivo* Messungen von Hautproben mit unterschiedlichen Melaningehalten belegen eine positive Korrelation zwischen der Pigmentierung von Zellen und der Grundlinie von Raman-Spektren [95]. Ferner wurde eine positive Korrelation zwischen der Autofluoreszenz, der Pigmentierung von Zellen und der Grundlinie von Raman-Spektren [96]. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Raman-Spektren humaner Haut sowie von natürlichem und synthetischem Melanin, eine deutliche Raman-Bande bei 1380 cm⁻¹ aufweisen [94]. Einerseits

wurde der höhere Gesamtproteingehalt anhand der molekularen Schwingungen des Tyrosins, die der Raman-Bande bei 854 cm⁻¹ zugewiesen wurde, sowie des Proteinrückgrats, die der Raman-Bande bei 932 cm⁻¹ durch Untersuchungen von humanen Zehennägeln zugeordnet wurden, detektiert. Andererseits wurde eine höhere Proteinkonzentration in Keratinozyten als in Melanozyten durch die Raman-Bande bei 1003 cm⁻¹ identifiziert [68, 92, 93]. Es wird angenommen, dass der spektrale Unterschied zwischen Melanozyten und Keratinozyten hauptsächlich durch das Pigment Melanin begründet werden kann, das ausschließlich von Melanozyten synthetisiert wird. Untersuchungen des Proteingehaltes und der -zusammensetzung von Keratinozyten und Melanozyten wären hilfreich, um die Unterschiede der Proteinbanden erklären zu können.

Da beide Zelltypen aus der Epidermis isoliert werden, ist eine Kontamination der Melanozytenpopulation mit Keratinozyten möglich (siehe Abbildung 5-38), die vor der Herstellung von beispielsweise pigmentierten Hautmodellen ausgeschlossen werden muss. Um solche Herstellprozesse standardisieren und somit gleichbleibende Qualitäten gewährleisten zu können, müssen die verwendeten Zellpopulationen festgelegten Spezifikationen entsprechen. Anhand der Raman-Spektren wurde für die Melanozytenpopulation eine Sensitivität von 90% erreicht, so dass nur 10% der Spektren fälschlicherweise als Keratinozyt vorhergesagt wurde. Eine Spezifikät von 95% bedeutet für diese Analyse, dass die Wahrscheinlichkeit eine potentielle Kontamination mit Keratinozyten nicht zu detektieren, bei 5% liegt.

Zur Überprüfung, ob molekulare, potentiell pathologische Veränderungen von primären Keratinozyten nicht invasiv detektiert werden können, sind Raman spektroskopische Untersuchungen von primären und *in vitro* modifizierten Keratinozyten (HaCaT) durchgeführt worden. Es sind keine Unterschiede in den Wellenzahlbereichen der Raman-Spektren von primären Keratinozyten und HaCaT Zellen detektiert worden, die typischerweise Lipidstrukturen zugeordnet werden wie beispielsweise Raman-Banden bei 1079 cm⁻¹ und 1300 cm⁻¹ [87, 90]. Gleiche Ergebnisse sind auch für die Analyse des Gesamtlipidgehaltes von primären Keratinozyten und HaCaT Zellen durch Lipidextraktion beschrieben worden [167]. Im Gegensatz dazu zeigten die Raman-Spektren dieser beiden Zelltypen Unterschiede in den Wellenzahlbereichen bei 727 cm⁻¹, 785 cm⁻¹, 1003 cm⁻¹, 1093 cm⁻¹, 1252 cm⁻¹ und 1660 cm⁻¹, die molekularen Schwingungen von Proteinen und Nukleinsäuren zugeordnet worden sind. Diese Raman-Banden zeigen höhere Intensitäten in den

Spektren der HaCaT Zellen als in den Spektren der primären Keratinozyten. Die Zuordnungen der Raman-Banden zu Nukleinsäuren und Proteinen sind durch die Analysen verschiedener Zelltypen sowie wässriger RNA- und DNA-Lösungen gemacht worden [90, 92, 104]. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse können die biochemischen Unterschiede zwischen primären und in vitro modifizierten Keratinozyten auf verschiedene Protein- und Nukleinsäuregehalte aufgrund eines veränderten Proliferationspotentials der HaCaT Zellen zurückgeführt werden. Der Proliferationsverhaltens von Zellen auf den Einfluss des biochemischen Fingerabdruck des Raman-Spektrums ist bereits für die Analyse von primären und kanzerogenen Zervikalzellen sowie für gesunde und transformierte Brustepithelzellen gezeigt worden [153, 168].

Die berechnete Sensitivität von 87% für die Keratinozytenpopulation zeigt, dass ein geringer Anteil der primären Keratinozyten fälschlicherweise als HaCaT-Zellen hervorgesagt wurde. Allerdings zeigt der für diese Analyse wichtigere Wert der Spezifität von 100%, dass alle HaCaT-Zellen richtig zugeordnet worden sind. Somit hat diese Raman spektroskopische Untersuchung gezeigt, dass eine potentiell pathologische Veränderung von Keratinozyten mit großer Wahrscheinlichkeit detektiert werden würde.

Aufgrund dieser Ergebnisse für die Raman spektroskopische Analyse unterschiedlicher Hautzellen, konnte gezeigt werden, dass sich sowohl dermale von epidermalen Zellen als auch verschiedene epidermale Zellen voneinander unterscheiden lassen. Darüber hinaus ist die Trennung von *in vitro* modifizierten von primären, gesunden Keratinozyten anhand ihrer Raman-Spektren möglich. Daher scheint diese nicht invasive, d.h. berührungs-, marker- und zerstörungsfreie Methode ein geeignetes Werkzeug für die Charakterisierung und Qualitätskontrolle von Hautzellpopulationen zu sein.

6.2. Charakterisierung von Endothelzellen

Eine große Herausforderung bei der Implantation autologer Transplantate, die häufig aus mehrschichtigen Gewebestrukturen bestehen, ist die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff [169, 170]. Eine mögliche Strategie ist die Entwicklung von vaskularisierten Implantaten, die sogar an den Blutkreislauf des Patienten angeschlossen werden können. Um solche Blutgefäßstrukturen aufbauen zu können, müssen Endothelzellen des Patienten isoliert und mit dem Konstrukt kultiviert werden, damit diese die Blutgefäße auskleiden [169]. Allerdings wird die Isolierung und Kultivierung reiner Endothelzellpopulationen durch die häufigen Kontaminationen mit Fibroblasten, das anspruchsvolle *in-vitro*-Kultivierungsverhalten sowie die geringe Lebensdauer erschwert [18]. Die frühzeitige Detektion potentieller Kontaminationen mit Fibroblasten könnte Aufschluss über die Qualität der Endothelzellpopulation geben.

Die Raman spektroskopische Analyse dieser beiden Zelltypen hat ergeben, dass signifikante Unterschiede in den Raman-Banden bei 955 cm⁻¹, 980 cm⁻¹ und 1451 cm⁻¹ zu finden sind. In den Spektren der mv Endothelzellen sind die Banden bei 955 cm⁻¹ und 1451 cm⁻¹ vorherrschend, die Lipiden und Proteinen und speziell Kollagenen zugeordnet wurden. Die Raman-Bande bei 980 cm⁻¹, die in den Spektren der Fibroblasten dominiert, kann denselben Stoffklassen zugeordnet werden.

Auch die hohen Werte der Sensitivität (98%) und Spezifität (93%) für die Endothelzellpopulation lassen Rückschlüsse auf eine zuverlässige Zuordnung der Spektren zu. Anhand der erfolgreichen Trennung dieser beiden Zelltypen könnte direkt nach der Isolierung der Endothelzellen eine Kontamination mit Fibroblasten nicht invasiv detektiert werden und die Qualität der Zellpopulation bestimmt werden. Werden die Spezifikationen eingehalten, so können diese Zellen für die Endothelialisierung von Tissue Engineering Produkten weiterverwendet werden.

Um zusätzlich zu überprüfen, ob durch verlängerte *in-vitro*-Kultivierungszeiten verursachte pathologische Veränderungen der mv Endothelzellen anhand von Raman spektroskopischen Untersuchungen detektiert werden können, wurden diese mit einem Plasmid transfiziert und so erfolgreich immortalisierten mv Endothelzellen (hMEC-1 Zellen) analysiert [18]. Diese so entwickelten hMEC-1 Zellen sind den primären mv Endothelzellen sowohl morphologisch als auch funktionell sehr ähnlich [18]. Allerdings konnte ein Unterschied zwischen den transformierten und primären Endothelzellen in der Wachstumsrate, die für die modifizierten Zellen deutlich höher ist, beobachtet werden [18].

Wird für die Raman spektroskopische Unterscheidung von immortalisierten und primären Endothelzellen das Gesamtspektrum von 600 cm⁻¹ - 1800 cm⁻¹ für die Trennung dieser beiden Zelltypen verwendet, so ist keine Gruppierung der Scores im Score-Plot zu beobachten und somit auch keine Unterscheidbarkeit der Spektren gegeben. Die Differenz- und Loadingspektren weisen eher ein niedrigeres Signal/Rausch-Verhältnis auf als wichtige spektrale Informationen. Wird allerdings

117

nur die Raman-Bande bei 980 cm⁻¹ für die Analyse verwendet, die molekularen Schwingungen (C-H und C-C-Bindungen) von Proteinen und Lipiden zugeordnet werden kann, so ist eine Trennung der Scores der beiden Zelltypen erfolgreich [90, 97]. Folglich lässt sich erstens die bereits oben beschriebene Ähnlichkeit der hMEC-1 Zellen und der primären mv Endothelzellen anhand der Raman-Spektren bestätigen, zweitens kann gezeigt werden, dass bei der Betrachtung eines ganz spezifischen Spektrenbereiches (Raman-Bande bei 980 cm⁻¹) eine Trennung möglich ist und somit davon ausgegangen werden kann, dass eine molekulare Veränderung detektierbar ist.

6.3. Charakterisierung von Stammzellen

Stammzellen sind eine ideale Zellquelle für Anwendungen in der Regenerativen Medizin, da sie das Potential besitzen sich in verschiedene Richtungen zu entwickeln, wie beispielsweise zu Knorpel und Knochen. Aus diesem Grund spielen Stammzellen gerade in der Behandlung von Knorpel- und Knochendefekten eine wichtige Rolle [105, 171, 172]. Obwohl die Isolierung und in-vitro-Kultivierung von Stammzellen aus dem Knochenmark einfach durchzuführen ist, besteht auch hier wie bereits in Abschnitt 6.1 und 6.2 für die Keratinozyten- und Endothelzellpopulationen beschrieben, die Gefahr der Kontamination mit Fibroblasten oder anderen undefinierten Zelltypen [19, 20]. Um solche Kontaminationen möglichst frühzeitig detektieren zu können, muss die Stammzellpopulation vor der Verwendung analysiert werden. Allerdings ist die Unterscheidung von Stammzellen und Fibroblasten aufgrund ähnlicher Morphologien sowie identischer Oberflächenmarker schwierig [173]. Anhand von durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die in der Literatur beschriebenen Fibroblasten-spezifischen Marker für die Trennung von Stammzellen und Fibroblasten nicht geeignet sind, da diese Marker auch für über 85% der Stammzellpopulation detektiert wurden. Eine geeignete Methode für die Unterscheidung von Stammzellen und Fibroblasten ist die Durchführung eines invitro-Differenzierungsassays, da wie gezeigt, nur die Stammzellen und nicht die Fibroblasten die Fähigkeit besitzen in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren. Allerdings sind die Nachteile dieser Methode die lange Kultivierungsdauer von bis zu vier Wochen und die hohe Zellzahl, die für diesen Nachweis benötigt wird. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass Fibroblasten auch das Potential besitzen in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren [152, 173]. Bisherige Raman spektroskopische Untersuchungen von Stammzellen haben sich mit dem Differenzierungsnachweis dieser Zellen, der Analyse von Stammzellkolonien sowie mit Vitalitätsstudien von Stammzellen aus der Nabelschnur beschäftigt [97, 174-178]. Es wurden keine Studien gefunden, die die Unterscheidung von Stammzellen und einem anderen primären Zelltyp mittels Raman spektroskopischer Untersuchungen beschreibt.

Der Vergleich der Raman-Spektren der Fibroblasten- und Stammzellpopulationen hat mit Hilfe der multivariaten Analyse gezeigt, dass sich diese beiden Zelltypen voneinander trennen lassen. Es sind keine signifikanten Raman-Banden für diese Trennung verantwortlich, sondern die spektrale Grundlinie dieser Raman-Spektren ist ausschlaggebend für die Unterscheidung. Unterschiede in der Grundlinie von Spektren können aufgrund verschiedener endogener Autofluoreszenzen verursacht werden [96]. Grundsätzlich zeigen Zellen, die stark pigmentiert sind oder eine hohe metabolische Aktivität haben, erhöhte Autofluoreszenzsignale und Tumorgewebe niedrigere Autofluoreszenzsignale als gesunde Gewebe [96, 179]. Auch mit Hilfe von Multiphotonenspektroskopie Analysen der konnte belegt werden, dass ausdifferenzierte Stammzellen ein niedrigeres Autofluoreszenzsignal zeigen als undifferenzierte Stammzellen. Dieses Phänomen wurde durch die Abnahme der reduzierten Form des NAD(P)H im Vergleich zur oxidierten Form während der Differenzierung von Stammzellen begründet und dadurch auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch geschlossen [103]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme des Verhältnisses von NAD(P)H/NAD⁺ einen erhöhten Metabolismus von Zellen anzeigt [180]. Daher wird angenommen, dass die spektralen Unterschiede auf die erhöhte Autofluoreszenz der Stammzellen im Gegensatz zu den Fibroblasten zurückzuführen ist.

Aufgrund der erfolgreichen Trennung der beiden Zelltypen durch die Hauptkomponentenanalyse wie auch durch die hohen Werte für die Sensitivität (97%) und Spezifität (95%) konnte gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie eine vielversprechende Analysemethode für die Detektion von Kontaminationen von Stammzellsuspensionen mit Fibroblasten ist.

6.4. Charakterisierung von Knorpelgewebe und -zellen

Die erfolgreiche Therapie von Gelenkknorpeldefekten stellt bisher eine große Herausforderung dar. Eine mögliche Behandlungsstrategie ist der Einsatz von autologen Knorpeltransplantaten [175]. Für die Herstellung solcher Transplantate werden die Chondrozyten zunächst in vitro kultiviert bevor sie dann in Form eines Konstrukts oder als Zellsuspension dem Patienten implantiert werden [105]. Der Erfolg dieser Behandlungsmethode ist in den letzten 15 Jahren trotz großer Forschungsanstrengungen allerdings ausgeblieben, da die einheitliche Zusammensetzung der verwendeten Matrix nicht der in vivo Situation entspricht. Der Gelenkknorpel besitzt eine Zonierung, die bei der Herstellung der Transplantate bisher nicht berücksichtigt worden ist. Innerhalb des Gelenkknorpels wird zwischen der Superfizial-, Tangential- und Radiärzone unterschieden, in denen die Chondrozyten, je nach Zone, unterschiedliche Matrixbestandteile exprimieren [181]. Einige Studien haben die erfolgreiche Adaption der in vitro kultivierten Knorpeltransplantate an die in vivo Situation gezeigt [182]. Überprüft werden die Eigenschaften dieser Konstrukte typischerweise quantitativ mittels der Bestimmung des Glykosaminoglykan- und Kollagengehaltes oder durch die Genexpression von Aggrekan und Kollagen Typ 2. Qualitativ wird die Zonierung durch histologische Färbungen wie beispielsweise Safranin O bestimmt [147]. Allerdings bedingen alle genannten Methoden die Zerstörung des Konstrukts. Daher wurde eine Raman spektroskopische Analyse der Zonierung des Knorpelgewebes durchgeführt. Ferner ist die Charakterisierung der Chondrozyten, die für die Herstellung solcher Konstrukte verwendet werden, sehr wichtig, wodurch die Untersuchung der Zellpopulation auf potentiell pathologische Veränderungen sowie die Analyse der Unterscheidbarkeit von Chondrozyten und Stammzellen motiviert war. Darüber hinaus ist die Bestimmung des Differenzierungszustandes ein wichtiges Merkmal für die Charakterisierung der verwendeten Zellpopulation.

Bisher wurden erst wenige Raman spektroskopische Analysen von Knorpelmaterialien durchgeführt und keine Studie zur Untersuchung von vitalen Chondrozyten gefunden. Es konnte bisher gezeigt werden, dass die Detektion kristalliner Ablagerungen in Chondrozyten und in der extrazellulären Matrix des Knorpels (Kaninchen) nach laser-assistierter Knorpel-Neuformung anhand Raman spektroskopischer Analysen möglich ist [183]. Außerdem wurde die Raman-Spektroskopie als eine geeignete Methode getestet, um Knorpelschäden frühzeitig zu detektieren, indem porcine Knorpelgewebeproben zunächst komprimiert und dann spektroskopisch untersucht wurden [184]. Des Weiteren ist humaner Knorpel als Bestandteil des Bronchialgewebes Raman spektroskopisch untersucht worden, um

120

diesen von den übrigen Bestandteilen zu unterscheiden [137]. Die Zonierung boviner und porciner Knorpelschnitten konnte mittels IR- und Raman-Spektroskopie detektiert werden [185, 186]. Ferner wurde die Detektion molekularer Veränderungen des Knorpels und der Synovialflüssigkeit aufgrund von Osteoarthritis mit Hilfe der Raman-Spektroskopie untersucht [121].

Die Trennung von porcinen Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen mittels Raman spektroskopischer Analysen war motiviert durch die Identifikation von Zellklonen mit Stammzelleigenschaften im Gelenkknorpel, die die Homogenität der Chondrozytenpopulation beeinträchtigen [187]. Für die Herstellung von in vitro kultivierten Knorpeltransplantaten muss der Einsatz von definierten, reinen Zellpopulationen gewährleistet werden. Die erfolgreiche Unterscheidung dieser beiden Zelltypen aufgrund ihrer Raman-Spektren innerhalb des Scoreplots ist auf die Wellenzahlbereiche bei 1003 cm⁻¹, 1090 cm⁻¹, 1295 cm⁻¹, 1437 cm⁻¹ und 1657 cm⁻¹ zurückzuführen. Die Raman-Bande bei 1003 cm⁻¹ wurde der Stoffklasse der Proteine zugeordnet und zeigt für diese Analyse eine höhere Intensität in den Spektren der Stammzellen als in den Spektren der Chondrozyten. Da die Intensität der Phenylalanin-Bande ein Indikator für die Proteinkonzentration einer Zelle ist, kann aus diesem Ergebnis geschlussfolgert werden, dass die Stammzellen einen höheren Proteingehalt aufweisen als die Chondrozyten [136]. Es wird angenommen, dass die metabolische Aktivität von Stammzellen im Gegensatz zu höhere den stoffwechselträgen Chondrozyten den Unterschied des Proteingehalts verursacht [188]. Die übrigen Raman-Banden bei 1090 cm⁻¹, 1295 cm⁻¹, 1437 cm⁻¹ und 1657 cm⁻¹, die für die Trennung von Stammzellen und Chondrozvten identifiziert wurden, sind unter anderem molekularen Schwingungen von Lipiden zugeordnet worden. Die Raman-Banden bei 1090 cm⁻¹ und 1295 cm⁻¹ sind nur in den Spektren der Chondrozyten deutlich als Bande erkennbar, wobei die Banden bei 1437 cm⁻¹ und 1660 cm⁻¹ höhere Intensitäten in den Spektren der Chondrozyten als in den Spektren der Stammzellen zeigen. Daher kann vermutet werden, dass der Lipidgehalt in Chondrozyten höher ist als in Stammzellen. Der erhöhte Lipidgehalt in Chondrozyten kann durch ihren trägen Metabolismus und die dadurch gebildeten Lipidvesikel erklärt werden, die die Stammzellen aufgrund ihrer höheren Stoffwechselaktivität nicht bilden [188]. Die Spektren der Chondrozytenpopulation wurden zu 98% richtig zugeordnet und die Spektren der Stammzellen zu 91%.

Um zu überprüfen, ob potentiell pathologische Veränderungen der Chondrozyten mit Hilfe der Raman-Spektroskopie detektiert werden können, wurden die Raman-Spektren von primären Zellen und Zellen der Chondrosarkom-Zelllinie (SW1353) verglichen. Die Unterscheidung dieser beiden Zelltypen, die in einem Scoreplot deutlich gezeigt werden konnte, ist durch Unterschiede in der Grundlinie der Raman-Spektren zu erklären. Wie bereits in Abschnitt 6.3 beschrieben worden ist, können Unterschiede in der Grundlinie durch Unterschiede in der Autofluoreszenz erklärt werden. Für verschiedene Gewebearten wurde gezeigt, dass kanzerogene im Gegensatz zu gesunden Zellen wegen einer verringerten Fluoreszenz des Tryptophans oder NADP(H)s eine deutlich geringere Autofluoreszenz haben [189, 190]. Aufgrund der Sensitivität der Messungen der Chondrozytenpopulation von 91% konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Teil der Spektren falsch zugeordnet wurde. Der für diese Anwendung viel wichtigere Wert der Spezifität (97%) besagt, dass nur 3% der Spektren fälschlicherweise nicht als kanzerogen eingestuft werden. Dadurch besteht nur ein geringes Restrisiko, potentiell pathologisch veränderte Zellen nicht zu detektieren und die Zellpopulation für die Verwendung freizugeben.

Zusätzlich zur Detektion potentiell pathologischer Veränderungen sowie der Unterscheidbarkeit von Stammzellen und Chondrozyten ist die Analyse des Differenzierungsstatus wichtig für die Charakterisierung der Zellpopulation. Der zu, Differenzierungsstatus lässt Aussagen darüber ob die Zellen ihre zelltypspezifischen Eigenschaften wie die Morphologie und das Genexpressionsmuster zeigen [191]. Werden die Chondrozyten aus ihrer natürlichen Umgebung für die *in-vitro*-Kultivierung herausgelöst, so verändert sich der Phänotyp dieser Zellen, in dem andere, für das Gewebe untypische, Matrixbestandteile synthetisiert werden und die Zellen eine fibroblastäre Morphologie annehmen [191]. Daher wurde dieser Differenzierungsstatus von vitalen Chondrozyten Raman spektroskopisch untersucht parallel dazu immunzytologisch überprüft. Die Raman-Spektren und der unterschiedlich lang kultivierten porcinen Chondrozyten (0, 7, 14 und 21 Tage) unterscheiden sich in den Wellenzahlbereichen bei 1066 cm⁻¹, 1078 cm⁻¹, 1266 cm⁻¹, 1300 cm⁻¹, 1437 cm⁻¹ und 1657 cm⁻¹. Die Intensitäten dieser Raman-Banden nimmt über die Kultivierungsdauer kontinuierlich ab, wobei ein signifikanter Unterschied nur zwischen den Raman-Spektren der unkultivierten und kultivierten Zellen detektiert wird. Die Raman-Banden bei 1066 cm⁻¹ und 1266 cm⁻¹ wurden extrazellulären Matrixkomponenten des Gelenkknorpels, wie Glykosaminoglykanen und Kollagenen zugeordnet [17, 90, 192]. Da die Intensität einer Raman-Bande mit der Konzentration einer Substanz korreliert (siehe Formel 6.1), kann aufgrund dieser Untersuchung angenommen werden, dass die Konzentration der von den Chondrozyten synthetisierten Glykosaminoglykanen und Kollagenen über die Kultivierungsdauer von drei Wochen abnimmt. Die immunzytologischen Analysen der Chondrozyten über die Kultivierungsdauer von drei Wochen bestätigt eine stetige Abnahme der Aggrekan- und Kollagen Typ 2-Synthese [191, 193]. Allerdings wurde eine Zunahme Typ 1-Synthese beobachtet, der Kollagen was nicht mit den Raman spektroskopischen aber mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt.

Des Weiteren haben die Intensitäten der Raman-Banden bei 1078 cm⁻¹, 1300 cm⁻¹ 1440 cm⁻¹, die Kohlenwasserstoff- oder Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen und zugeordnet wurden, über die Kultivierungsdauer abgenommen [56, 90, 121]. Da die meisten Lipide einen langkettigen Kohlenwasserstoffrest besitzen, wurden diese Raman-Banden unter anderem dieser Stoffklasse zugewiesen. Ferner konnten in anderen Studien die Lipidzuordnungen durch das Abrastern verschiedener Zelltypen mit dem Raman-Spektrometer gemacht werden [107]. Daher wird vermutet, dass dedifferenzierte im Gegensatz zu frisch isolierten Chondrozyten einen geringeren Lipidgehalt besitzen. Es wird angenommen, dass die dedifferenzierten Chondrozyten eines erhöhten Stoffwechsels ihre Lipideinlagerungen aufgrund über die Kultivierungsdauer abbauen und die Abnahme der Intensitäten der Lipidbanden in den Raman-Spektren dadurch begründet werden kann. Ähnliche Unterschiede in den Intensitäten der Lipidbanden konnten, wie oben beschrieben, auch für den Vergleich von frisch isolierten Chondrozyten und Stammzellen gezeigt werden. In einigen Studien ist beschrieben, dass dedifferenzierte Chondrozyten einen stammzellartigen Phänotypen annehmen, d.h. vor allem entsprechende Oberflächenmarker exprimieren (CD10, CD90, CD105, CD166) und eine ähnliche Morphologie annehmen [194]. Die Ähnlichkeiten der Lipidbanden in den Raman-Spektren bestätigen diese Gleichartigkeit von dedifferenzierten Chondrozyten und Stammzellen.

Neben der Charakterisierung der Zellen spielt die Analyse der extrazellulären Matrix sowohl für die Beurteilung der Qualität von Tissue Engineering Konstrukten als auch in der medizinischen Diagnostik eine große Rolle. Die Untersuchung der zonalen Struktur von Knorpelgeweben erfolgte anhand von histologischen Schnitten. Es

123

wurde gezeigt, dass sich die Superfizial- und Radiärzone des Knorpels in den Wellenzahlbereichen bei 818 cm⁻¹, 856 cm⁻¹, 920 cm⁻¹, 1065 cm⁻¹, 1069 cm⁻¹ und 1340 cm⁻¹ unterscheiden. Die Raman-Banden bei 818 cm⁻¹, 856 cm⁻¹ und 920 cm⁻¹, deren Intensitäten in den Raman-Spektren der Superfizialzone höher sind als in den Spektren der Radiärzone, wurden molekularen Schwingungen der Aminosäure Prolin zugeordnet. Da Kollagen zu einem großen Anteil aus (Hydroxy)-Prolin besteht, fand eine Zuordnung dieser Raman-Banden zu diesem Protein statt [91, 195, 196]. Durch die Raman spektroskopische Analyse von humanem Bronchialknorpel sowie kommerziell erhältlichem Kollagenpulver wurden ähnliche Raman-Banden gefunden, wurden [121, 137]. die den Kollagenen zugeordnet Anhand dieser Intensitätsunterschiede in den Raman-Spektren der unterschiedlichen Zonen des Gelenkknorpels kann angenommen werden, dass der Kollagengehalt in der Superfizialzone höher ist als in der Radiärzone. Die immunhistologische und biochemische Analyse des Gesamtkollagengehalts von bovinen Knorpelgewebeproben haben ergeben, dass dieser in der Superfizialzone am höchsten ist [146]. Zusätzlich zu den Unterschieden des Kollagengehaltes sind die Wellenzahlbereiche bei 1065 cm⁻¹, 1069 cm⁻¹ und 1340 cm⁻¹ wichtig für die Trennung der Superfizial- und Radiärzone des hyalinen Knorpels. Diese Raman-Banden wurden typischen extrazellulären Matrixbestandteilen wie Glykosaminoglykanen und speziell den Molekülen Aggrekan und Chondroitinsulfat durch die Analyse der jeweiligen Reinstoffe zugeordnet [111, 192]. Außerdem zeigten die Raman spektroskopischen Analysen des Bronchialknorpels ähnliche Raman-Banden und Zuordnungen zu sulfatierten Glykosaminoglykanen [137]. Aufgrund der höheren Intensitäten dieser Raman-Banden in den Spektren der Radiärzone, kann angenommen werden, dass der Glykosaminoglykangehalt in der Radiärzone höher ist als in der Superfizialzone des Knorpels. Diese Ergebnisse wurden durch die Safranin O-Färbung bestätigt, die Glykosaminoglykanstrukturen orange anfärbt. Darüber hinaus zeigten biochemische und histologische Analysen von bovinen Knorpelproben einen Anstieg des Glykosaminoglykangehaltes des Trockengewichtes von der Superfizial- bis hin zur Radiärzone [146]. Auch die Raman spektroskopische Untersuchung von porcinen Knorpelgewebeschnitten hat gezeigt, dass das Proteoglykan/Kollagen-Verhältnis in der Superfizialzone geringer ist als in der Radiärzone. Deutlich höhere Intensitäten in den Spektren der Radiär- als in der Superfizialzone wurden für die Raman-Banden bei 1068 cm⁻¹ und 1342 cm⁻¹ detektiert [185].

Um die Zuordnung der Raman-Banden zu den Glykosaminoglykanen zu überprüfen, sind die Kryoschnitte der Knorpelbiopsien nach der Raman spektroskopischen Analyse enzymatisch behandelt worden. Das Enzym Chondroitinase baut mit Hilfe von Wasser Chondroitinsulfate zu ungesättigten Disacchariden ab [99]. Die Untersuchungen des behandelten Schnittes haben gezeigt, dass die Intensitäten der Raman-Bande bei 1065-1069 cm⁻¹ im Vergleich zu den unbehandelten Schnitten signifikant abgenommen haben. Ferner war für die Safranin O-Färbung des Schnittes nach der enzymatischen Behandlung keine Orangefärbung der Radiärzone mehr zu erkennen. Der Abbau von Chondroitinsulfaten durch das Enzym Chondroitinase ist bereits für verschiedene andere Gewebe beschrieben worden [116, 197]. Diese Ergebnisse bestätigen sowohl die Zuordnung der Raman-Bande bei 1065-1069 cm⁻¹ zu Chondroitinsulfat als auch die Möglichkeit die zonale Struktur anhand von Raman spektroskopischer Untersuchungen detektieren zu können.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich sowohl frisch isolierte Chondrozyten von Stammzellen als auch von Zellen der Chondrosarkomzelllinie anhand Raman spektroskopischer Unterschiede trennen lassen. Ferner lässt sich der Differenzierungsstatus von Chondrozyten durch eine Abnahme der Raman-Bandenintensität detektieren. Durch die zusätzliche Charakterisierung der extrazellulären Matrix der unterschiedlichen Zonen des Gelenkknorpels mittels der Raman-Spektroskopie wurde belegt, dass dieses laserbasierte Verfahren ein vielversprechendes Werkzeug für die Analyse von *in vitro* kultivierten Chondrozyten sowie der Knorpeltransplantate ist.

6.5. Charakterisierung von Knochenmatrizen

Die Mikrostruktur sowie die chemische Zusammensetzung des Knochens sind wichtige Charakteristika, um die Knochenqualität, Frakturrisiken sowie krankhafte Veränderungen zu analysieren. Ferner sind diese Eigenschaften wichtig für die Beurteilung von *in vitro* synthetisierten Knochenmatrizes, die beispielsweise als Testmodelle für die Interaktion von Krebszellen mit Knochengewebe verwendet werden. Die Raman spektroskopische Untersuchung von Knochenmatrizes bietet die Möglichkeit, Aussagen über die chemische und molekulare Komposition der untersuchten Materialien zu machen. Bisherige Raman spektroskopische Analysen haben die chemische Zusammensetzung sowie die Struktur verschiedener Knochenproben betrachtet [120, 124, 198, 199]. Ferner wurden Knochengewebe, die
unterschiedlich mineralisiert waren sowie kranke und gealterte mit gesunden Knochenproben Raman spektroskopisch miteinander verglichen [200]. Die Reaktion der Knochenmatrix auf verschiedene mechanische Belastungen sowie die Einschätzung der Knochengualität und des daraus resultierenden Frakturrisikos wurden Raman spektroskopisch analysiert [98, 122]. Zusätzlich zur Knochenmatrix wurden Knochenzellen mit dem Raman-Spektrometer vermessen, wobei der Fokus unterschiedlicher Kultivierungssubstrate auf der Analyse sowie auf der Unterscheidung primärer Zellen von Zelllinien lag [56, 201, 202]. Obwohl bereits in vitro synthetisierte Knochenmatrizes spektroskopisch untersucht wurden, indem embryonale und adulte Stammzellen sowie Osteoblasten der Maus Verwendung fanden, ist die von primären, humanen Osteoblasten synthetisierte Matrix bisher noch nicht Raman spektroskopisch analysiert worden und war daher Gegenstand dieser Arbeit.

Um Vorgänge, die während der Metastasierung von Prostatakrebszellen in Knochengewebe ablaufen sowie die Interaktion von Krebszellen und der Knochennische untersuchen zu können, wird eine artifizielle Knochenmatrix benötigt, die möglichst gut die native Situation widerspiegelt. Diese Modellmatrix kann von primären osteogen differenzierten Osteoblasten *in vitro* synthetisiert werden und wurde bereits mit den verschiedensten Methoden charakterisiert, wie beispielsweise Rasterelektronenmikroskopie, Röntgenphotoelektronenspektroskopie oder Immunchemie [118]. Zur Überprüfung der molekularen Zusammensetzung dieser *in vitro* synthetisierten Matrix mit der von nativem Knochen wurden Raman spektroskopische Untersuchungen von beiden Materialien durchgeführt. Die extrazelluläre Matrix, die von primären und mit Expansionsmedium kultivierten Osteoblasten synthetisiert wurde, diente als Kontrolle.

Zum Vergleich der Raman-Spektren dieser *in vitro* synthetisierten Matrix mit denen des nativen Knochengewebes wurde zunächst das primäre Gewebe analysiert. Die charakteristischsten Raman-Banden sind in den Wellenzahlbereichen bei 856 cm⁻¹, 961 cm⁻¹, 1072 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹ zu finden. Molekulare Schwingungen des Kollagens sind den Raman-Banden bei 856 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹ zugeordnet worden, indem bovine Sehnen (Kollagen Typ 1) und der Knorpel vom Huhn (Kollagen Typ 2) vermessen wurden [119]. Da die extrazelluläre Matrix des Knochens überwiegend aus Kollagen Typ 1 besteht, fand eine Zuordnung dieser Proteinbanden zu Kollagen Typ 1 statt [119]. Die charakteristischste Raman-Bande des Knochenmaterials ist bei

darstellt.

961 cm⁻¹ zu finden und kann der Phosphat-Gruppe des Hydroxylapatits zugeordnet werden. Ferner war eine Raman-Bande des nativen Knochenmaterials bei 1072 cm⁻¹ zu finden, die der Karbonatgruppe des Apatits zugeordnet wurde. Diese Zuordnungen erfolgten durch Messungen verschiedenster Knochenproben [119]. Die Raman-Spektren der in vitro synthetisierten Knochenmatrix zeigt exakt die gleichen Banden bei 856 cm⁻¹, 961 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹, die bereits für die Messungen des nativen Knochenmaterials beschrieben worden sind. Ferner ist eine deutliche Raman-Bande bei 1003 cm⁻¹ vorhanden. Im Gegensatz dazu können in dem Raman-Spektrum der Kontrollmatrix nur Banden bei 1003 cm⁻¹ und 1453 cm⁻¹ detektiert werden, die zuvor molekularen Proteinschwingungen (Kollagen) zugeordnet worden sind. Der signifikanteste Unterschied zwischen den Spektren der Kontrollmatrix und der differenzierten Matrix ist die Raman-Bande des Hydroxylapatits, die nur im Spektrum der differenzierten Matrix detektiert werden konnte. Die in den Spektren der nativen Knochengewebe identifizierte Karbonatbande (1072 cm⁻¹) ist in der synthetisierten Matrix nicht vorhanden. Daher kann angenommen werden, dass keine Substitution der in dem Hydroxylapatit vorkommenden OH⁻-oder PO₄³⁻-Gruppe durch die Karbonatgruppe stattgefunden hat, wie es im nativen Knochen der Fall ist [119]. Anhand dieser Analyse wird deutlich, dass nur die osteogen differenzierten Osteoblasten das für die Knochenmatrix charakteristische Hydroxylapatit synthetisiert haben und in der Kontrollmatrix keine Mineralisierung beobachtet werden konnte. Die Trennung dieser beiden Matrizes ist auch im Score Plot sehr gut detektierbar. Auffällig ist im Gegensatz zur Kontrollmatrix die starke Streuung der Scores der Matrix, die von den differenzierten Zellen synthetisiert worden ist. Dadurch kann auf eine höhere Homogenität der Kontrollmatrix geschlossen werden. Vermutlich liegt dieser Unterschied in der unterschiedlich starken Mineralisierung der Modellmatrix, die in den Raman-Spektren sichtbar wird. Die Kontrollmatrix ist gar nicht oder nur sehr gering mineralisiert, wodurch einheitlichere Raman-Spektren erhalten werden. Durch die Ähnlichkeit der Raman-Spektren von der in vitro synthetisierten Matrix sowie des nativen Knochengewebe kann angenommen werden, dass diese von den primären Osteoblasten synthetisierte Matrix ein gutes Modell für die Analyse der Metastatisierung und der Interaktion von Krebszellen und der Knochennische

7. Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Raman-Spektroskopie für die Analyse von vitalen Zellen als auch der extrazellulären Matrix von Knorpel und Knochengeweben eignet. Sowohl verschiedene primäre Hautzellen als auch Endothel- und Stammzellen sowie Chondrozyten konnten erfolgreich charakterisiert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Unterscheidung von primären und modifizierten Zellen anhand ihrer Raman-Spektren möglich ist. Diese Unterscheidbarkeit basiert auf den unterschiedlichsten zellulären Eigenschaften und Zusammensetzungen der extrazellulären Matrizes.

Damit die Raman-Spektroskopie als nicht invasive Analysemethode sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Qualitätskontrolle von artifiziellen Geweben und Organen eingesetzt werden kann, sollte ein automatisiertes Gerät entwickelt werden indem der Auswertevorgang der Spektren bereits integriert ist. Die einfache Handhabbarkeit des Gerätes sowie eine leicht verständliche Darstellung der Messergebnisse sind bei der Entwicklung anzustreben. Ein weiteres Ziel ist die Verkürzung der Messzeiten, die mit einer aktuellen Integrationszeit von 100 s für eine Zelle relativ lange sind. Durch die Verwendung eines Lasers mit geringerer Wellenlänge oder höherer Laserleistungen sollten Messzeiten im Sekundenbereich erreicht werden können.

Um einen möglichst großen Anteil der Probe analysieren zu können und somit eine möglichst zuverlässige Aussage treffen zu können, sollte diese optimalerweise mit einem Laser abgerastert und nicht nur stichprobenweise einzelne Spots innerhalb der Probe vermessen werden. Des Weiteren ist die Erstellung einer Datenbank, die Referenzspektren jeglicher Gewebe- und Zelltypen enthält, wichtig, um eine einheitliche Basis für die Analyse von biologischen Proben realisieren zu können.

Für die Implementierung dieses Analyseverfahrens in die Qualitätskontrolle von Tissue Engineering Konstrukten sollte ein weiterer Fokus auf der Charakterisierung von Gewebestrukturen liegen. Erste Ergebnisse haben gezeigt, dass sich Zellen eingebettet in unterschiedliche Matrizes (z.B. Alginat, Kollagen, Gelatine) gut vermessen lassen.

8. Literaturverzeichnis

- [1] <u>http://www.ema.europa.eu/</u>.
- [2] Glotzbach JP, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. In Brief: Regenerative Medicine. Curr Prob Surg. 2011;48:142-6.
- [3] Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. Zukunftstechnologie Tissue Engineering. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2003.
- [4] Nehrer S. Regenerative Medizin und Tissue Engineering am Bewegungsapparat von der Zelle zum Gewebe. Sports Orthopaedics and Traumatology. 2008;24:65-8.
- [5] Williams DF. Tissue-biomaterial interactions. J Mater Sci. 1987;22:3421-45.
- [6] Atala A. Engineering tissues, organs and cells. J Tissue Eng Regen M. 2007;1:83-96.
- [7] Gage FH. Cell therapy. Nature. 1998;30:18-24.
- [8] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. New Engl J Me. 1994;331:889-95.
- [9] Cardoso AA, Veiga JP, Ghia P, Afonso HM, Haining WN, Sallan SE, et al. Adoptive T-Cell Therapy for B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Preclinical Studies. Blood. 1999;94:3531-40.
- [10] Choi Y-H, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Cell Therapy. Hum Gene Ther. 2011;22:3-17.
- [11] Wintermantel E, Suk-Woo H. Medizintechnik Life Science Engineering. Berlin: Springer-Verlag; 2008.
- [12] Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering In vivo and in vitro applications. Adv Drug Deliv Rev. 2011.
- [13] Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. Curr Opin Rheumatol. 2006;18:64-73.
- [14] Schanz JE. Etablierung einer biologischen vaskularisierten Matrix als Grundlage für ein in vitro Lebertestsystem. Stuttgart: Universität Stuttgart; 2008.
- [15] Pusch J. Etablierung einer 3D-Darmgewebekultur zur in-vitro-Untersuchung der Resorption potentieller Wirkstoffe auf Basis einer natürlichen Kollagenmatrix. Konstanz: Universität Konstanz; 2009.
- [16] Fuchs JR, Nasseri BA, Vacanti JP. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. Ann Thorac Surg. 2001;72:577-91.
- [17] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell. 1982;30:215-24.
- [18] Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, et al. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. J Investig Dermatol. 1992;99:683-90.
- [19] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. Cells Tissues Organs. 2003;174:101-9.
- [20] Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, et al. Characterization of Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone. Stem Cells. 2003;21:681-93.
- [21] <u>http://www.tissue-factory.com/en/Home/.</u>
- [22] Flenker H, Stein KH. Basiswissen Histologie und Zytologie. Hoppenstedt Publishing: 2004.

- [23] Linß W, Fanghänel J. Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. Berlin: de Gruyter GmbH & Co.; 1998.
- [24] Europe Co. European Pharmacopoeia. In: Europe Co, editor. Sixth Edition: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2007.
- [25] Sack U, Tarnok A, Rothe G. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: S. Karger AG; 2007.
- [26] Bunse A. Praktikum der Molekulargenetik. Berlin: Springer-Verlag; 2005.
- [27] Clark D, Pazdernik, N., Held, A., Jarosch, B. Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
- [28] Geckeler KE, Eckstein H. Bioanalytische und biochemische Labormethoden. Braunschweig/ Wiesbaden: Vieweg; 1998.
- [29] Skoog DA, Leary JJ. Instrumentelle Analytik. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1996.
- [30] Zeeck A, Grond, S., Papstavrou, I., Zeeck, C. Chemie für Mediziner. München: Elsevier GmbH; 2010.
- [31] Dreher W. Beiträge zu methodischen Entwicklungen und in-vivo-Anwendungen der lokalisierten 1H-NMR-Spektroskopie und spektroskopischen Bildgebung. Göttingen: Cuvillier Verlag; 2007.
- [32] Pfützner H. Angewandte Biophysik. Wien: Springer; 2003.
- [33] Bücheler E, Lackner K-J, Thelen M. Einführung in die Radiologie: Diagnostik und Interventionen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006.
- [34] Gross M. Sonographie: Schritt für Schritt zur Diagnose. München: Elsevier GmbH; 2007.
- [35] Schaudig U. Optische Kohärenztomographie. Der Ophthalmologe. 2001;98:26-34.
- [36] Raman CV, Krishnan KS. A New Type of Secondary Radiation. Nature 1928;121:2.
- [37] Swain RJ, and Stevens MM. Raman microspectroscopy for non-invasive biochemical analysis of single cells. Biochem Soc T. 2007;35:6.
- [38] Motz JT, Gandhi SJ, Scepanovic OR, Haka AS, and DRR, Feld MS. Real-time Raman system for in vivo disease diagnosis. J Biomed Opt. 2005;10:031113
- [39] Notingher I. Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. Sensors. 2007;7:1343-58.
- [40] Utzinger U, Heintzelmann DL, Mahadevan-Jansen A, Malpica A, Follen Ma, Rlichards-Kortum R. Near-Infrared Raman Spectroscopy for in Vivo Detection of Cervical Precancers. Appl Spectrosc. 2001;55.
- [41] Wachsmann-Hogiu S, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy--from single cells to humans. Curr Opin Biotech. 2009;20:63-73.
- [42] Hesse M, Meier, H., Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.
- [43] Kuchling H. Taschenbuch der Physik. München Wien: Carl Hanser Verlag; 2004.
- [44] Rodriguez LG, Lockett SJ, Holtom GR. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: A biological review. Cytometry Part A. 2006;69A:779-91.
- [45] Kneipp J, Kneipp H, Kneipp K. ChemInform Abstract: SERS A Single-Molecule and Nanoscale Tool for Bioanalytics. ChemInform. 2008;39.
- [46] Vo-Dinh T, Yan F, Wabuyele MB. Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging. J Raman Spectrosc. 2005;36:640-7.

- [47] Kitagawa T. Investigation of higher order structures of proteins by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. Prog Biophys Mol Bio. 1992;58:1-18.
- [48] Puppels GJ, de Mul FFM, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ, et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. Nature. 1990;347:301-3.
- [49] Koch S. Evaluierung der Raman Spektroskopie für die marker- und zerstörungsfreie Qualitätskontrolle im Tissue Engineering. Stuttgart: Universität Stuttgart; 2010.
- [50] Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L-P, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, et al. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. J Clin Microbiol. 2003;41:324-9.
- [51] Rosch P, Harz M, Schmitt M, Peschke K-D, Ronneberger O, Burkhardt H, et al. Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological Contaminations. Appl Environ Microbiol. 2005;71:1626-37.
- [52] Notingher I, Verrier S, Haque S, Polak JM, Hench LL. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells. Biopolymers. 2003;72:230-40.
- [53] Swain RJ, Jell G, Stevens MM. Non-invasive analysis of cell cycle dynamics in single living cells with Raman micro-spectroscopy. J Cell Biochem. 2008;104:1427-38.
- [54] Kunapareddy N, Freyer JP, Mourant J. Raman spectroscopic characterization of necrotic cell death. J Biomed Opt. 2008;13.
- [55] Verrier S, Notingher I, Polak JM, Hench LL. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy. Biopolymers. 2004;74:157-62.
- [56] Krafft C. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. Vib Spectrosc. 2003;32:75-83.
- [57] Krafft C, Sobottka SB, Schackert G, Salzer R. Raman and infrared spectroscopic mapping of human primary intracranial tumors: a comparative study. J Raman Spectrosc. 2006;37:367-75.
- [58] Uzunbajakava N, Lenferink A, Kraan Y, Volokhina E, Vrensen G, Greve J, et al. Nonresonant Confocal Raman Imaging of DNA and Protein Distribution in Apoptotic Cells. Biophys J. 2003;84:3968-81.
- [59] Yao H, Tao Z, Ai M, Peng L, Wang G, He B, et al. Raman spectroscopic analysis of apoptosis of single human gastric cancer cells. Vib Spectrosc. 2009;50:193-7.
- [60] Walsh MJ, German MJ, Singh M, Pollock HM, Hammiche A, Kyrgiou M, et al. IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening. Cancer Lett. 2007;246:1-11.
- [61] Shafer-Peltier KE, Haka AS, Fitzmaurice M, Crowe J, Myles J, Dasari RR, et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. J Raman Spectrosc. 2002;33:552-63.
- [62] Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MH, et al. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. J Invest Dermatol. 2002;119:64-9.
- [63] Lieber CA, Majumder SK, Ellis DL, Billheimer DD, Mahadevan-Jansen A. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy. Lasers Surg Med. 2008;40:461-7.

- [64] Li Y, Wen Z-N, Li L-J, Li M-L, Gao N, Guo Y-Z. Research on the Raman spectral character and diagnostic value of squamous cell carcinoma of oral mucosa. J Raman Spectrosc. 2010;41:142-7.
- [65] Krishna CM, Sockalingum GD, Kegelaer G, Rubin S, Kartha VB, Manfait M. Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. Vib Spectrosc. 2005;38:95-100.
- [66] Koide H, Ichikawa I. Progression of chronic renal diseases. Basel: S. Karger AG; 1996.
- [67] Kalyan Kumar K, Anand A, Chowdary MVP, Keerthi, Kurien J, Murali Krishna C, et al. Discrimination of normal and malignant stomach mucosal tissues by Raman spectroscopy: A pilot study. Vib Spectrosc. 2007;44:382-7.
- [68] Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. Int J Cancer. 2003;107:1047-52.
- [69] Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. P Natl Acad Sci USA 2005;102:12371-6.
- [70] Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. Analyst. 2006;131:875.
- [71] Dejong B, Schut T, Coppens J, Wolffenbuttel K, Kok D, Puppels G. Raman spectroscopic detection of changes in molecular composition of bladder muscle tissue caused by outlet obstruction. Vib Spectrosc. 2003;32:57-65.
- [72] Crow P, Barrass B, Kendall C, Hart-Prieto M, Wright M, Persad R, et al. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. Brit J Cancer. 2005;92:2166-70.
- [73] Chowdary MVP, Kumar KK, Thakur K, Anand A, Kurien J, Krishna CM, et al. Discrimination of Normal and Malignant Mucosal Tissues of the Colon by Raman Spectroscopy. Photomed Laser Surg. 2007;25:269-74.
- [74] Chen P, Shen A, Zhao W, Baek S, Yuan H, Hu J. Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis. Appl Opt. 2009 20:4743-8.
- [75] Bi X, Walsh A, Mahadevan-Jansen A, Herline A. Development of Spectral Markers for the Discrimination of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Using Raman Spectroscopy. Dis Colon Rectum. 2011;54:48-53
- [76] Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. Biochem Biophy Res Co. 2009;382:370-4.
- [77] Schrader B, Dippel B, Fendel S, Keller S, Liichte L, Riedl M, et al. NIR FT Raman spectroscopy-a new tool in medical diagnostics. J Mol Struct. 1997;408/409.
- [78] Wang H, Le T, Cheng J. Label-free imaging of arterial cells and extracellular matrix using a multimodal CARS microscope. Opt Commun. 2008;281:1813-22.
- [79] Wang Y-N, Galiotis C, Bader DL. Determination of molecular changes in soft tissues under strain using laser Raman microscopy. J Biomech. 1999;33:483-6.
- [80] Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal Component Analysis. Chemometr Intell Lab. 1987;2:37-52.
- [81] Kessler W. Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.

- [82] Ben-Hur A, Soon Ong C, Sonnenburg S, Schölkopf B, Rätsch G. Support Vector Machines and Kernels for Computational Biology. PLoS Computational Biology. 2008;4:1-10.
- [83] Bullinger H. Technologieführer: Grundlagen, Anwendungen, Trends Berlin: Springer; 2007.
- [84] Roulet J-F, Zimmer S. Prophylaxe und Präventivzahnmedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
- [85] Singh GP, Creely CM, Volpe G, Grotsch H, Petrov D. Real-time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy. Anal Chem. 2005;77:2564-8.
- [86] Gotter B, Faubel W, Neubert RH. Optical methods for measurements of skin penetration. Skin Pharmacol Physiol. 2008;21:156-65.
- [87] Frank CJ, McCreery RL, Redd DC. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. Anal Chem. 1995;67:777-83.
- [88] Frushour BG, Koenig JL. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. Biopolymers. 1975;14:379-91.
- [89] Larraona-Puy M, Ghita A, Zoladek A, Perkins W, Varma S, Leach IH, et al. Development of Raman microspectroscopy for automated detection and imaging of basal cell carcinoma. J Biomed Opt. 2009;14:054031-10.
- [90] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. Appl Spectrosc Rev. 2007;42:493-541.
- [91] Walton A, Deveney M, Koenig J. Raman spectroscopy of calcified tissue. Calcified Tissue Int. 1970;6:162-7.
- [92] Notingher I, Green C, Dyer C, Perkins E, Hopkins N, Lindsay C, et al. Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. J R Soc Interface. 2004;1:79-90.
- [93] Wessel S, Gniadecka M, Jemec GB, Wulf HC. Hydration of human nails investigated by NIR-FT-Raman spectroscopy. Biochim Biophys Acta. 1999;1433:210-6.
- [94] Huang Z, Lui H, Chen XK, Alajlan A, McLean DI, Zeng H. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. J Biomed Opt. 2004;9:1198-205.
- [95] Knudsen L, Johansson CK, Philipsen PA, Gniadecka M, Wulf HC. Natural variations and reproducibility of in vivo near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of normal human skin. J Raman Spectrosc. 2002;33:574–9.
- [96] Lieber CA, Kabeer MH. Characterization of pediatric Wilms' tumor using Raman and fluorescence spectroscopies. J Pediatr Surg. 2010;45:549-54.
- [97] Bai H, Chen P, Fang H, Lin L, Tang GQ, Mu GG, et al. Detecting viability transitions of umbilical cord mesenchymal stem cells by Raman micro-spectroscopy. Laser Phys Lett. 2011;8:78-84.
- [98] Draper ERC, Morris MD, Camacho NP, Matousek P, Towrie M, Parker AW, et al. Novel Assessment of Bone Using Time-Resolved Transcutaneous Raman Spectroscopy. J Bone Miner Res. 2005;20:1968-72.
- [99] von Bruchhausen F, Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1998.
- [100] Podlasek CA, Meroz CL, Tang Y, McKenna KE, McVary KT. Regulation of Cavernous Nerve Injury-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. Biol Reprod. 2006;76:19-28.
- [101] Caplan A. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991;9:641-50.
- [102] Łaczka-Osyczka A, Łaczka M, Kasugai S, Ohya K. Behavior of bone marrow cells cultured on three different coatings of gel-derived bioactive glass-

ceramics at early stages of cell differentiation. J Biomed Mater Res. 1998;42:433-42.

- [103] König K, Uchugonova A, Gorjup E. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of 3D-stem cell spheroids during differentiation. Microsc Res Techniq. 2011;74:9-17.
- [104] Gao X, Butler IS, Kremer R. A near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of epidermal keratinocytes: changes in the protein-DNA structure following malignant transformation. Spectrochim Acta A 2005;61:27-35.
- [105] Lanza R, Langer, R., Vacanti, J. Principles of Tissue Engineering: Academic Press; 2007.
- [106] Stock U, Vacanti J. Tissue engineering: current state and prospects. Annu Rev Med. 2001;52:443-51.
- [107] Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RHW, Salzer R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. Vib Spectrosc. 2003;32:75-83.
- [108] Notingher I, Hench LL. Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro. Expert Rev Med Devices. 2006;3:215-34.
- [109] Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. Cell. 1978;15:1313-21.
- [110] Ellis R, Green, E., Winlove, C.P. Structural Analysis of Glycosaminoglycans and Proteoglycans by Means of Raman Microspectrometry. Connective Tissue Research. 2009;50:29-36.
- [111] Esmonde-White K. Raman spectroscopy detection of molecular changes associated with osteoarthritis. Ann Abor: University of Michigan; 2009.
- [112] Cheng W-T, Liu M-T, Liu H-N, Lin S-Y. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. Microsc Res Techniq. 2005;68:75-9.
- [113] Dong R, Yan X, Pang X, Liu S. Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA. Spectrochim Acta A. 2004;60:557-61.
- [114] Winchester M, Winchester L, Chou N. Application of Raman scattering to the measurement of ligament tension. EEE Eng Med Biol Soc2008. p. 3434-7.
- [115] Shepard N, Mitchell N. The localization of proteoglycan by light and electron microscopy using Safranin O: A study of epiphyseal cartilage. J Ultrastruct R. 1976;54:451-60.
- [116] Smits NC, Robbesom AA, Versteeg EMM, van de Westerlo EMA, Dekhuijzen PNR, van Kuppevelt TH. Heterogeneity of Heparan Sulfates in Human Lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004;30:166-73.
- [117] Ponec M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. Adv Drug Deliv Rev. 2002;54:19-30.
- [118] Reichert JC, Quent VMC, Burke LJ, Stansfield SH, Clements JA, Hutmacher DW. Mineralized human primary osteoblast matrices as a model system to analyse interactions of prostate cancer cells with the bone microenvironment. Biomaterials. 2010;31:7928-36.
- [119] Gentleman E, Swain RJ, Evans ND, Boonrungsiman S, Jell G, Ball MD, et al. Comparative materials differences revealed in engineered bone as a function of cell-specific differentiation. Nat Mater. 2009;8:763-70.

- [120] Kazanci M, Roschger P, Paschalis EP, Klaushofer K, Fratzl P. Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: Orientation–composition. J Struct Biol. 2006;156:489-96.
- [121] Esmonde-White KA, Mandair GS, Raaii F, Jacobson JA, Miller BS, Urquhart AG, et al. Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis. J Biomed Opt. 2009;14:034013.
- [122] Carden A, Rajachar RM, Morris MD, Kohn DH. Ultrastructural Changes Accompanying the Mechanical Deformation of Bone Tissue: A Raman Imaging Study. Calcified Tissue Int. 2003;72:166-75.
- [123] Chiang HK, Peng F-Y, Hung S-C, Feng Y-C. In situ Raman spectroscopic monitoring of hydroxyapatite as human mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts. J Raman Spectrosc. 2009;40:546-9.
- [124] Gamsjaeger S, Masic A, Roschger P, Kazanci M, Dunlop JWC, Klaushofer K, et al. Cortical bone composition and orientation as a function of animal and tissue age in mice by Raman spectroscopy. Bone. 2010;47:392-9.
- [125] Goodyear SR, Gibson IR, Skakle JMS, Wells RPK, Aspden RM. A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. Bone. 2009;44:899-907.
- [126] Kazanci M, Wagner HD, Manjubala NI, Gupta HS, Paschalis E, Roschger P, et al. Raman imaging of two orthogonal planes within cortical bone. Bone. 2007;41:456-61.
- [127] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993;260:920-6.
- [128] Takagi M. Noninvasive quality estimation of adherent mammalian cells for transplantation. Biotechnol Bioproc E. 2010;15:54-60.
- [129] Pudlas M, Koch S, Bolwien C, Walles H. Raman spectroscopy as a tool for quality and sterility analysis for tissue engineering applications like cartilage transplants. Int J Artif Organs. 2010;33:228-37.
- [130] Baena JR, Lendl B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. Curr Opin Chem Biol. 2004;8:534-9.
- [131] Notingher I, Jell G, Notingher PL, Bisson I, Tsigkou O, Polak JM, et al. Multivariate analysis of Raman spectra for in vitro non-invasive studies of living cells. J Mol Struct. 2005;744-747:179-85.
- [132] Sattlecker M, Bessant C, Smith J, Stone N. Investigation of support vector machines and Raman spectroscopy for lymph node diagnostics. Analyst. 2010;135:895-901.
- [133] Schmid U. Entwicklung chemometrischer Methoden für die Klassifikation von Bakterien mittels Mikro-Raman-Spektroskopie. Braunschweig: Technischen Universität Carolo-Wilhelmina; 2009.
- [134] Widjaja E, Zheng W, Huang Z. Classification of colonic tissues using nearinfrared Raman spectroscopy and support vector machines. Int J Oncol. 2008;32:653-62.
- [135] Andrade P, Bitar R, Yassoyama K, Martinho H, Santo A, Bruno P, et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy. Anal Bioanal Chem. 2007;387:1643-8.
- [136] Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. Biophys J. 2006;90:648-56.
- [137] Koljenovic S, Bakker Schut TC, van Meerbeeck JP, Maat APWM, Burgers SA, Zondervan PE, et al. Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue. J Biomed Opt. 2004;9:1187-97.

- [138] Krafft C, Ramoji AA, Bielecki C, Vogler N, Meyer T, Akimov D, et al. A comparative Raman and CARS imaging study of colon tissue. J Biophotonics. 2009;2:303-12.
- [139] Molckovsky A, Song L-MWK, Shim MG, Marcon NE, Wilson BC. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: Differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. Gastrointest Endosc. 2003;57:396-402.
- [140] Noh MS, Jun B-H, Kim S, Kang H, Woo M-A, Minai-Tehrani A, et al. Magnetic surface-enhanced Raman spectroscopic (M-SERS) dots for the identification of bronchioalveolar stem cells in normal and lung cancer mice. Biomaterials. 2009;30:3915-25.
- [141] Buschman HP, Deinum G, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, van der Laarse A, et al. Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: Biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ. Cardiovasc Pathol. 2001;10:69-82.
- [142] Guze K, Short M, Sonis S, Karimbux N, Chan J, and Zeng H. Parameters defining the potential applicability of Raman spectroscopy as a diagnostic tool for oral disease. J Biomed Opt. 2009;14:014016-1-9.
- [143] Hawi SR, Campbell WB, Kajdacsy-Balla A, Murphy R, Adar F, Nithipatikom K. Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy. Cancer Lett. 1996;110:35-40.
- [144] Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujamf N, Malpica A, Thomsen S, Utzinger U, et al. Near-Infrared Raman Spectroscopy for In Vitro Detection of Cervical Precancers. Photochem Photobiol. 1998;68:123-32.
- [145] Krafft C, Codrich D, Pelizzo G, Sergo V. Raman mapping and FTIR imaging of lung tissue: congenital cystic adenomatoid malformation. The Analyst. 2008;133:361.
- [146] Kim TK, Sharma B, Williams CG, Ruffner MA, Malik A, McFarland EG, et al. Experimental Model for Cartilage Tissue Engineering to Regenerate the Zonal Organization of Articular Cartilage. Osteoarthr Cartilage. 2003;11:653-64.
- [147] Klein TJ, Rizzi SC, Reichert JC, Georgi N, Malda J, Schuurman W, et al. Strategies for Zonal Cartilage Repair using Hydrogels. Macromol Biosci. 2009;9:1049-58.
- [148] Bernard G, Auger M, Soucy J, Pouliot R. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. BBA Gen Subjects. 2007;1770:1317-23.
- [149] Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Puppels GJ. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles. 2001;116:434-42.
- [150] El Ghalbzouri A, Commandeur S, Rietveld MH, Mulder AA, Willemze R. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. Biomaterials. 2009;30:71-8.
- [151] Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Christensen DH, et al. Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue. J Investig Dermatol. 2004;122:443-9.
- [152] Lysy PA, Smets F, Sibille C, Najimi M, Sokal EM. Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. Hepatology. 2007;46:1574-85.

- [153] Yu C, Gestl E, Eckert K, Allara D, Irudayaraj J. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. Cancer Detect Prev. 2006;30:515-22.
- [154] Patlolla RR, Desai PR, Belay K, Singh MS. Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. Biomaterials. 2010;31:5598-607.
- [155] Perna G, Lastella M, Lasalvia M, Mezzenga E, Capozzi V. Raman spectroscopy and atomic force microscopy study of cellular damage in human keratinocytes treated with HgCl2. J Mol Struct. 2007;834-836:182-7.
- [156] Qian J, Jiang L, Cai F, Wang D, He S. Fluorescence-surface enhanced Raman scattering co-functionalized gold nanorods as near-infrared probes for purely optical in vivo imaging. Biomaterials. 2011;32:1601-10.
- [157] Bonnier F, Meade AD, Merzha S, Knief P, Bhattacharya K, Lyng FM, et al. Three dimensional collagen gels as a cell culture matrix for the study of live cells by Raman spectroscopy. Analyst. 2010;135:1697-703.
- [158] Donfack P, Rehders M, Brix K, Boukamp P, Materny A. Micro Raman spectroscopy for monitoring alterations between human skin keratinocytes HaCaT and their tumorigenic derivatives A5RT3—toward a Raman characterization of a skin carcinoma model. J Raman Spectrosc. 2010;41:16-26.
- [159] Jess PR, Garces-Chavez V, Smith D, Mazilu M, Paterson L, Riches A, et al. Dual beam fibre trap for Raman micro-spectroscopy of single cells. Opt Express. 2006;14:5779-91.
- [160] Meade A, Lyng F, Knief P, Byrne H. Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in–vitro cultured human keratinocytes. Anal Bioanal Chem. 2007;387:1717-28.
- [161] Ponec M, Havekes L, Kempenaar J, Vermeer BJ. Cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: differences in the regulation of cholesterol synthesis. J Invest Dermatol. 1983;81:125-30.
- [162] Schurer NY, Stremmel W, Grundmann JU, Schliep V, Kleinert H, Bass NM, et al. Evidence for a novel keratinocyte fatty acid uptake mechanism with preference for linoleic acid: comparison of oleic and linoleic acid uptake by cultured human keratinocytes, fibroblasts and a human hepatoma cell line. Biochim Biophys Acta. 1994;1211:51-60.
- [163] Yannas I. Tissue and Organ Regeneration in Adults. New York: Springer-Verlag; 2001.
- [164] Van Muijen GNP, Warnaar SO, Ponec M. Differentiation-related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and in fetal, newborn, and adult epidermis. Exp Cell Res. 1987;171:331-45.
- [165] Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. Nat Cell Biol. 2004;6:699-706.
- [166] Quevedo WC. Epidermal Melanin Units Melanocyte-Keratinocyte Interactions. Am Zool. 1972;12:35-41.
- [167] Schurer N, Kohne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G. Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. Exp Dermatol. 1993;2:179-85.
- [168] Lyng FM, Faolain EO, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B, et al. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. Exp Mol Pathol. 2007;82:121-9.

- [169] Mertsching H, Schanz J, Steger V, Schandar M, Schenk M, Hansmann J, et al. Generation and Transplantation of an Autologous Vascularized Bioartificial Human Tissue. Transplantation. 2009;88:203-10.
- [170] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. Trends Biotechnol. 2008;26:434-41.
- [171] Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. Yonsei Med J. 2004;30:41-7.
- [172] Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am. 1994;76:579-92.
- [173] Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? Haematologica. 2008;94:258-63.
- [174] Azrad E, Zahor D, Vago R, Nevo Z, Doron R, Robinson D, et al. Probing the effect of an extract of elk velvet antler powder on mesenchymal stem cells using Raman microspectroscopy: enhanced differentiation toward osteogenic fate. J Raman Spectrosc. 2006;37:480-6.
- [175] Chiang H, Jiang C-C. Repair of Articular Cartilage Defects: Review and Perspectives. J Formos Med Assoc. 2009;108:87-101.
- [176] Downes A, Mouras R, Elfick A. Optical Spectroscopy for Noninvasive Monitoring of Stem Cell Differentiation. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:1-11.
- [177] Pascut FC, Goh HT, Welch N, Buttery LD, Denning C, Notingher I. Noninvasive Detection and Imaging of Molecular Markers in Live Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells. Biophys J. 2011;100:251-9.
- [178] Zuser E, Chernenko T, Newmark J, Miljković M, Diem M. Confocal Raman microspectral imaging (CRMI) of murine stem cell colonies. Analyst. 2010;135:3030-3.
- [179] Mahadevan-Jamen A, Richards-Kortum R. Raman Spectroscopy For Cancer Detectiob: A Review. IEEE/EMBS. Chicago, IL1997.
- [180] Guo HW, Chen CT, Wei YH, Lee OK, Gukassyan V, Kao FJ, et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence lifetime separates human mesenchymal stem cells from differentiated progenies. J Biomed Opt. 2008;13:050505-1-3.
- [181] Meyer U, Meyer, T., Handschel, J., Wisemann, HP. Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2009.
- [182] Meyer U, Wiesmann, HP. Bone and cartilage engineering. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2006.
- [183] Heger M, Mordon S, Leroy Gr, Fleurisse L, Creusy C. Raman microspectrometry of laser-reshaped rabbit auricular cartilage: preliminary study on laser-induced cartilage mineralization. J Biomed Opt. 2006;11:024003-1-8.
- [184] Lim NSJ, Hamed Z, Yeow CH, Chan C, Huang Z. Early detection of biomolecular changes in disrupted porcine cartilage using polarized Raman spectroscopy. J Biomed Opt. 2011;16:017003-1-10.
- [185] Bonifacio A, Beleites C, Vittur F, Marsich E, Semeraro S, Paoletti S, et al. Chemical imaging of articular cartilage sections with Raman mapping, employing uni- and multi-variate methods for data analysis. The Analyst. 2010;135:3193-204.

- [186] Potter K, Kidder LH, Levin IW, Lewis EN, Spencer RGS. Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections using Fourier transform infrared spectral imaging. Arthritis Rheum. 2001;44:846-55.
- [187] Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. Arthritis Rheum. 2003;48:1315-25.
- [188] Moll K. Anatomie. München: Elsevier, Urban&Fischer; 2005.
- [189] Grossman N, Ilovitz E, Chaims O, Salman A, Jagannathan R, Mark S, et al. Fluorescence spectroscopy for detection of malignancy: H-ras overexpressing fibroblasts as a model. J Biochem Bioph Meth. 2001;50:53-63.
- [190] Palmer GM, Keely PJ, Breslin TM, Ramanujam N. Autofluorescence Spectroscopy of Normal and Malignant Human Breast Cell Lines. Photochem Photobiol. 2003;78:462-9.
- [191] Erggelet C, Steinwachs, M. Gelenkknorpeldefekte. Darmstadt: Steinkopff-Verlag; 2001.
- [192] Ellis R, Green E, Winlove CP. Structural Analysis of Glycosaminoglycans and Proteoglycans by Means of Raman Microspectrometry. Connect Tissue Res. 2009;50:29-36.
- [193] Schulze-Tanzil G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. Ann Anat. 2009;191:325-38.
- [194] Karlsen TA, Shahdadfar A, Brinchmann JE. Human Primary Articular Chondrocytes, Chondroblasts-Like Cells, and Dedifferentiated Chondrocytes: Differences in Gene, MicroRNA, and Protein Expression and Phenotype. Tissue Eng Pt C. 2011;17:219-27.
- [195] Kadler K. Matrix loading: Assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis. Birth Defects Res C Embryo Today. 2004;72:1-11.
- [196] NHI. <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28430/</u>.
- [197] van de Westerlo EMA, Smetsers TFCM, Dennissen MABA, Linhardt RJ, Veerkamp JH, van Muijen GNP, et al. Human single chain antibodies against heparin: selection, characterization, and effect on coagulation. Blood. 2002;99:2427-33.
- [198] Penel G, Delfosse C, Descamps M, Leroy G. Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. Bone. 2005;36:893-901.
- [199] Timlin JA, Carden A, Morris MD. Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects. Appl Spectrosc. 1999;53:1429-35.
- [200] Carden A, and Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). J Biomed Opt. 2000;5:259-68.
- [201] Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. J Biomed Mater Res A. 2004;68A:640-50.
- [202] Notingher I, Jell G, Lohbauer U, Salih V, Hench LL. In situ non-invasive spectral discrimination between bone cell phenotypes used in tissue engineering. J Cell Biochem. 2004;92:1180-92.

9. Anhang

Unterscheidung von mesenchymalen Stammzellen und Fibroblasten

Versuch 2



Abbildung 6-1: *In-vitro*-Differenzierungsassay der Stammzell- und Fibroblastenpopulation. Die erfolgreiche adipogene Differenzierung konnte nur für Stammzellen(A) und nicht für Fibroblasten (D) durch eine Ölrot O-Färbung nachgewiesen werden. Die Matrixproduktion während der osteogenen Differenzierung konnte mit der Alizarin Rot-Färbung für Stammzellen(B) und Fibroblasten (E) gezeigt werden. Die chondrogene Differenzierung, die durch die Alcian Blau-Färbung nachgewiesen wird, war nur für die Stammzellen (C) erfolgreich und nicht für die Fibroblasten (F).

Versuch 3



Abbildung 6-2: *In-vitro*-Differenzierungsassay der Stammzell- und Fibroblastenpopulation. Die erfolgreiche adipogene Differenzierung konnte nur für Stammzellen(A) und nicht für Fibroblasten (B) durch eine Ölrot O-Färbung nachgewiesen werden. Die Matrixproduktion während der osteogenen Differenzierung konnte mit der Alizarin Rot-Färbung für Stammzellen(C) und Fibroblasten (D) gezeigt werden. Die chondrogene Differenzierung, die durch die Alcian Blau-Färbung nachgewiesen wird, war nur für die Stammzellen (E) erfolgreich und nicht für die Fibroblasten (F).



Bestimmung des Differenzierungszustandes der Chondrozyten

Versuch 2

Abbildung 6-3: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen sowie das Loadingspektrum von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 26$), für eine ($n_{Messung} = 29$), zwei ($n_{Messung} = 28$) oder drei ($n_{Messung} = 23$) Wochen kultiviert wurden. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-36) gezeigt.



Abbildung 6-4: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 26$), für eine ($n_{Messung} = 29$), zwei ($n_{Messung} = 28$) oder drei ($n_{Messung} = 23$) Wochen kultiviert wurden. Eine Trennung der frisch isolierten von den kultivierten Chondrozyten ist über die PC1-Achse möglich.



Abbildung 6-5: Einzelne Score-Plots der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 26$), für eine ($n_{Messung} = 29$), zwei ($n_{Messung} = 28$) oder drei ($n_{Messung} = 23$) Wochen kultiviert wurden.



Abbildung 6-6: Immunzytologische Färbungen der frisch isolierten Chondrozyten sowie von Chondrozyten, die für eine, zwei und drei Wochen im Monolayer kultiviert wurden. Es wurden Antikörper gegen Kollagen Typ 1, Kollagen Typ 2 und Aggrekan verwendet. Eine Zunahme der Kollagen Typ 1-Synthese (A-D) sowie eine Abnahme der Kollagen Typ 2- (E-H) und Aggrekan- (I-L) Synthese über die Kultivierungsdauer konnte beobachtet werden.

Versuch 3



Abbildung 6-7: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen sowie das Loadingspektrum von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 28$), für eine ($n_{Messung} = 28$), zwei ($n_{Messung} = 30$) oder drei ($n_{Messung} = 30$) Wochen kultiviert wurden. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 5-36) gezeigt.



Abbildung 6-8: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 28$), für eine ($n_{Messung} = 28$), zwei ($n_{Messung} = 30$) oder drei ($n_{Messung} = 30$) Wochen kultiviert wurden. Eine Trennung der frisch isolierten von den kultivierten Chondrozyten ist über die PC1-Achse möglich.



Abbildung 6-9: Einzelne Score-Plots der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren von Chondrozyten, die gar nicht ($n_{Messung} = 28$), für eine ($n_{Messung} = 28$), zwei ($n_{Messung} = 30$) oder drei ($n_{Messung} = 30$) Wochen kultiviert wurden.



Abbildung 6-10: Immunzytologische Färbungen der frisch isolierten Chondrozyten sowie von Chondrozyten, die für eine, zwei und drei Wochen im Monolayer kultiviert wurden. Es wurden Antikörper gegen Kollagen Typ 1, Kollagen Typ 2 und Aggrekan verwendet. Eine Zunahme der Kollagen Typ 1-Synthese (A-D) sowie eine Abnahme der Kollagen Typ 2- (E-H) und Aggrekan- (I-L) Synthese über die Kultivierungsdauer konnte beobachtet werden.



Charakterisierung der extrazellulären Matrix des Knorpels

Abbildung 6-11: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum der Superfizial- ($n_{Messung} = 19$) und Radiärzone ($n_{Messung} = 20$) des hyalinen Knorpels. Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Radiärzone von dem der Superfizialzone berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 6-12) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben.



Abbildung 6-12: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der Superfizialzone ($n_{Messung}$ = 17) und Radiärzone ($n_{Messung}$ = 18) des hyalinen Knorpels. Diese beiden Zonen lassen sich über die PC1 und PC5 trennen. Durch diese Analyse werden 72 % der spektralen Varianz erklärt.



Abbildung 6-13: Safranin O-Färbung histologischer Knorpelschnitte vor und nach enzymatischer Behandlung. Glykosaminoglykane konnten durch eine Orangefärbung im unbehandelten Schnitt (A) detektiert werden. Nach der enzymatischen Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase (B) konnten keine Glykosaminoglykane mehr nachgewiesen werden. In grün-blau sind die Kollagenstrukturen angefärbt.





Abbildung 6-14: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum der Superfizial- ($n_{Messung} = 16$) und Radiärzone ($n_{Messung} = 15$) des hyalinen Knorpels. Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Radiärzone von dem der Superfizialzone berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 6-15) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben.



Abbildung 6-15: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der Superfizialzone ($n_{Messung}$ = 15) und Radiärzone ($n_{Messung}$ = 16) des hyalinen Knorpels. Diese beiden Zonen lassen sich über die PC1 und PC5 trennen. Durch diese Analyse werden 61 % der spektralen Varianz erklärt.



Abbildung 6-16: Safranin O-Färbung histologischer Knorpelschnitte vor und nach enzymatischer Behandlung. Glykosaminoglykane konnten durch eine Orangefärbung im unbehandelten Schnitt (A) detektiert werden. Nach der enzymatischen Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase (B) konnten keine Glykosaminoglykane mehr nachgewiesen werden. In grün-blau sind die Kollagenstrukturen angefärbt.

Charakterisierung der Knochenmatrix

Versuch 2



Abbildung 6-17: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix (n_{Messung} = 15) sowie der dazugehörigen Kontrollmatrix (n_{Messung} = 15). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Matrix, osteogen differenziert von dem der Matrix, undifferenziert berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 6-18) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben.



Abbildung 6-18: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix (n_{Messung} = 15) und der Kontrollmatrix (n_{Messung} = 15). Eine Trennung dieser beiden Matrizes ist über die PC1-Achse möglich. Durch diese Analyse konnten 88% der spektralen Varianz erklärt werden





Abbildung 6-19: Raman-Mittelwertspektren, Standardabweichungen, Differenzspektrum und Loadingspektrum der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix (n_{Messung} = 14) sowie der dazugehörigen Kontrollmatrix (n_{Messung} = 10). Das Differenzspektrum ist durch die Subtraktion des Mittelwertspektrums der Matrix, osteogen differenziert von dem der Matrix, undifferenziert berechnet worden. Das Loadingspektrum ist für die PC1 der Hauptkomponentenanalyse (siehe Abbildung 6-20) gezeigt. Die Spektren sind der Anschaulichkeit halber entlang der Intensitätsachse verschoben.



Abbildung 6-20: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Raman-Spektren der *in vitro* synthetisierten Knochenmatrix (n_{Messungen} = 14) und der Kontrollmatrix (n_{Messungen} = 10). Eine Trennung dieser beiden Matrizes ist über die PC1-Achse möglich. Durch diese Analyse konnten 88% der spektralen Varianz erklärt werden.

Wissenschaftliche Beiträge

Teilaspekte dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht und in Form von Postern und Vorträgen auf Konferenzen präsentiert.

Publikationen

Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C., Walles, H. (2010) "Raman spectroscopy as a tool for quality and sterility analysis for tissue engineering applications like cartilage transplants." *International Journal of Artificial Organs* 33(3): 228

Pudlas, M., Berrio, D.A.C, Thude, S., Walles, H., Schenke-Layland, K. (2011) "Noncontact discrimination of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and fibroblasts using Raman spectroscopy." *Medical Laser Application*, 26(3): 119

Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C., Hirth, T., Walles, H., Schenke-Layland, K. (2011) "Raman spectroscopy - A Non-Invasive Analysis Tool For The Discrimination of Human Skin Cells." *Tissue Engineering Part C*, 17(19): 1027

Votteler, M., Berrio, D.A.C., **Pudlas, M.,** Schenke-Layland, K. (2012) "Raman spectroscopy enables the non-contact, label-free monitoring of cells and extracellular matrix." *Journal of Visualized Experiments,* in press

Poster

Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C., Walles, H., Schenke-Layland, K. "Raman Spectroscopy - A Non-Invasive Technology For the Characterization of Human Skin Cells." *FLIM 2010*, Saarbrücken, 14. bis 16. Juni 2010

Pudlas, M., Schrobback, K., Rintoul, L., Hutmacher, D., Hirth, T., Walles, H., Klein, T. "Zonal characteristics of articular cartilage and chondrocytes by Raman microspectroscopy." *5th Australian Health and Medical Research Congress*, Melbourne (Australien), 14. bis 18. November 2010

Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C., Hirth, T., Walles, H., Schenke-Layland, K. "Raman spectroscopy – A powerful tool for the non-contact discrimination of bone-marrow mesenchymal stem cells and fibroblasts." *SPIE Photonics West*, San Francisco (USA), 21. bis 26. Januar 2011

Pudlas, M., Koch, S., Walles, H., Hirth, T., Klein, T., Hutmacher, D., Schenke-Layland, K. "Detection of different cartilage characteristics by Raman microspectroscopy." *15th Annual Hilton Head Workshop*, Hilton Head (USA), 16. bis 19. März 2011

Pudlas, M., Koch, S., Walles, H., Hirth, T., Klein, T., Hutmacher, D., Schenke-Layland, K. "Non-invasive characterization of cartilage extracellular matrix by raman micro-spectroscopy." *World Conference on Regenerative Medicine*, Leipzig, 2. bis 4. November 2011.

<u>Vorträge</u>

Dreiling, M., Koch, S., Bolwien, C., Mertsching, H. "Raman spectroscopy as a noninvasive tool for quality and sterility analysis of tissue engineering products." *XXXVI Annual meeting European Society for Artificial Organs (ESAO)*, Compiègne (Frankreich), 2. bis 5. September 2009.

Pudlas, M., Koch, S., Bolwien, C., Walles, H. "Raman spectroscopy: A non-invasive analysis tool for studies of living cells." *World Conference on Regenerative Medicine*, Leipzig, 29. bis 31. Oktober 2009.

Pudlas, M., Koch, S., Mertsching, H. "Raman spectroscopy as a non-invasive analysis tool for living cells." *SPIE Photonics West*, San Francisco (USA), 23. bis 28. Januar 2010.

Pudlas, M., Schrobback, K., Rintoul, L., Hutmacher, D., Hirth, T., Walles, H., Klein, T., "Identification of different articular cartilage zones by Raman Microspectroscopy." *IHBI Inspires*, Gold Coast (Australien), 25. bis 26. November 2010

Das übergeordnete Ziel der Regenerativen Medizin ist die Rekonstruktion und der Ersatz von fehlendem oder geschädigtem Gewebe durch die Verwendung von Zellsuspensionen, Biomaterialien oder Tissue Engineering Produkten. Ein weiteres Anwendungsgebiet solcher artifiziellen Gewebe sind in-vitro-Testsysteme, die für die Testung der Biokompatibilität verschiedener kosmetischer und pharmazeutischer Materialien Verwendung finden. Die nicht invasive Überprüfung solcher Konstrukte während der invitro-Reifung oder nach der Implantation in vivo ist sehr wichtig, um deren Eigenschaften evaluieren zu können. Allerdings bedingen traditionelle Analysemethoden eine invasive Veränderung des Konstrukts, die in dessen Zerstörung resultiert. Die Raman-Spektroskopie ist ein optisches Verfahren, das auf der unelastischen Streuung von Laserphotonen durch molekulare Schwingungen basiert und die Möglichkeit bietet, lebende Zellen nicht invasiv in situ oder in vivo zu analysieren. Diese Technik ermöglicht die nicht invasive Unterscheidung verschiedener primärer Zelltypen sowie die Detektion wichtiger zellulärer Eigenschaften wie beispielsweise des Differenzierungszustands und pathologischer Veränderungen aufgrund langer in vitro Kultivierungszeiten. Außerdem ist die Charakterisierung der extrazellulären Matrix des Knorpels und des Knochens möglich.

