

Schwingungsspektroskopische Untersuchungen zu zellulären Altersprozessen von humanen Fibroblastzellen



seit 1558

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. und Dipl.-Troph.

Katharina Eberhardt

geboren am 29.05.1984 in Saalfeld/Saale

Gutachter

1. Prof. Dr. Jürgen Popp, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Stephan Diekmann, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.09.2017

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.*

*Sir Isaac Newton
(1643–1727)*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Motivation und Zielsetzung	1
1.2 Theoretische Grundlagen zellulärer Alterungsprozesse und aktueller Forschungsstand.....	4
1.2.1 Seneszenz.....	4
1.2.2 Seneszenz in dreidimensionalen Hautmodellen.....	7
1.2.3 Quieszenz.....	8
1.2.4 Molekularbiologische Analysemethoden.....	9
1.3 Schwingungsspektroskopie.....	13
1.3.1 Raman-Spektroskopie	13
1.3.2 Raman-Mikroskopie	15
1.3.3 Infrarot-Spektroskopie	15
1.3.4 Infrarot-Mikroskopie.....	16
1.3.5 Einteilung der Wellenzahlbereiche und Vor- und Nachteile der Raman- und Infrarot-Spektroskopie	17
1.4 Chemometrische Datenanalyse	19
1.4.1 Hierarchische Clusteranalyse.....	20
1.4.2 Hauptkomponentenanalyse	21
1.4.3 Partial Least Squares-Regression.....	22
1.4.4 Lineare Diskriminanzanalyse.....	24
1.4.5 Validierung, Sensitivität und Spezifität	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Kultivierung humaner Zellen	27
2.1.1 Humane Fibroblast-Zelllinien.....	27
2.1.2 Dermale Fibroblastzellen	29
2.2 Raman-Spektroskopie	30
2.3 FT-IR-Spektroskopie	31
2.4 Datenanalyse	33
2.4.1 Vorbehandlung der Raman-Spektren.....	33
2.4.2 Vorbehandlung der FT-IR-Spektren	33
2.4.3 Klassifikationsmodelle.....	34

3	Ergebnisse und Diskussion	35
3.1	Unterscheidung der Proliferation und replikativen Seneszenz in primären Fibroblast-Zelllinien	35
3.1.1	Wachstumsverhalten und Beobachtung der zellulären Seneszenz in Fibroblastzellen.....	35
3.1.2	Charakterisierung der Seneszenz mittels Raman-Spektroskopie.....	37
3.1.3	Charakterisierung der Seneszenz mittels FT-IR-Spektroskopie	46
3.1.4	Diskussion der spektroskopischen Ergebnisse zur replikativen Seneszenz.....	54
3.2	Unterscheidung seneszenten Fibroblastzellen in zwei- und dreidimensionalen Zellmodellen.....	58
3.2.1	Voruntersuchungen an Sphäroiden	58
3.2.2	Spektrale Analyse der Raman- und FT-IR-Daten von 2D- und 3D-kultivierten Zellen.....	60
3.2.3	Chemometrische Auswertung zu 2D- und 3D-kultivierten Zellen	64
3.2.4	Diskussion zur Seneszenz in 3D-Hautmodellen	72
3.3	Vergleich der Quieszenz gegen die Proliferation und Seneszenz innerhalb einer Fibroblast-Zelllinie	76
3.3.1	Beobachtungen zu quieszenten Zellen.....	76
3.3.2	Raman- und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen verschiedener Zellzustände.....	77
3.3.3	Diskussion spektroskopisch ermittelter quieszenter Veränderungen im Vergleich zur Proliferation und Seneszenz.....	93
4	Zusammenfassung.....	99
5	Summary	102
6	Literaturverzeichnis.....	105
7	Anhang	115
7.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	115
7.2	Weitere Ergebnisse zur Klassifikation humaner Fibroblast-Zelllinien.....	118
7.3	Wissenschaftliche Beiträge	125
	Selbstständigkeitserklärung	viii
	Danksagung	ix

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. <i>charge-coupled device</i>)
DDR	Reaktion auf DNA-Schäden (engl. <i>DNA damage response</i>)
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ECM	extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i>)
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	fetales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
HCA	hierarchische Clusteranalyse
IR	Infrarot
LASER	Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (engl. <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>)
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LV	latente Variable
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellurid (engl. <i>mercury cadmium telluride</i>)
mTOR	engl. <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Hauptkomponente (engl. <i>principal component</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Populationsverdopplung (engl. <i>population doubling</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PLS	engl. <i>partial least squares</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RS	Raman-Spektroskopie
SA β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp (engl. <i>senescence-associated secretory phenotype</i>)
TIF	Telomerdysfunktions-induzierter Foci (engl. <i>telomere dysfunction-induced foci</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht zu den verschiedenen zellulären Zuständen.	4
Abbildung 2: Jablonski-Diagramm der Rayleigh- und Raman-Streuung sowie Infrarotabsorption.....	14
Abbildung 3: Schwingungen eines dreiatomigen linearen Moleküls.....	15
Abbildung 4: Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Raman-Mikroskops.....	15
Abbildung 5: Schematischer Aufbau und Strahlengang eines konventionellen FT-IR-Mikroskops.	17
Abbildung 6: Ausgangspunkt und Ziele einer multivariaten Datenanalyse.....	19
Abbildung 7: Graphische Darstellung der Hauptkomponenten.	22
Abbildung 8: Schema der PLS und der jeweiligen Matrizen.....	23
Abbildung 9: Wachstumskurven und SA β -Gal-Färbungen von Fibroblast-Zelllinien.	36
Abbildung 10: Raman-Bilder junger proliferierender Fibroblastzellen und einer seneszenten Zelle.	37
Abbildung 11: Raman-Mittelwertspektren zu den Altersgruppen und Fibroblast-Zelllinien.....	39
Abbildung 12: Differenzspektren der mit RS untersuchten Altersgruppen und Fibroblastzellen.....	40
Abbildung 13: RS-Klassifikation einzelner Zelllinien anhand ihrer Altersgruppierung.	41
Abbildung 14: Raman-Mittelwertspektren und Koeffizienten nach Klassifikation der Altersgruppen.	42
Abbildung 15: Vorhersage von Raman-spektroskopisch untersuchten jungen und seneszenten Zellen.	44
Abbildung 16: Klassifikation der Altersgruppen aller Zelllinien als ein gemeinsamer Datensatz.....	45
Abbildung 17: FT-IR-Mittelwertspektren der Altersgruppen und untersuchten Zelllinien.	47
Abbildung 18: FT-IR-Differenzspektren der untersuchten Altersgruppen und Zelllinien.	48
Abbildung 19: FT-IR-spektroskopische Klassifikation einzelner Zelllinien und ihrer Altersgruppen.	49
Abbildung 20: FT-IR-Mittelwertspektren und Koeffizienten nach Klassifikation der Altersgruppen.	50
Abbildung 21: Vorhersage junger und seneszenten Zellen nach FT-IR-Spektroskopie.....	52

Abbildung 22: FT-IR-spektroskopische Klassifikation der Altersgruppen aller Zelllinien.	53
Abbildung 23: Graphische Darstellungen von Sphäroid-Untersuchungen.	58
Abbildung 24: Clusteranalyse eines Sphäroids mittels Raman-Spektren.	59
Abbildung 25: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen 2D- und 3D-kultivierter Zellen.	61
Abbildung 26: Raman-Mittelwertspektren junger und seneszenter 2D- und 3D-kultivierter Zellen.	61
Abbildung 27: FT-IR-Mittelwertspektren junger und seneszenter 2D- und 3D-kultivierter Zellen.	62
Abbildung 28: Raman- und FT-IR-Differenzspektren 2D- und 3D-kultivierter seneszenter Zellen.	63
Abbildung 29: Altersgruppen-unabhängige Klassifikation 2D- gegen 3D-kultivierter Zellen.	65
Abbildung 30: Passagen-abhängige Klassifikation 2D- gegen 3D-kultivierter Zellen.	66
Abbildung 31: Klassifikation seneszenter 2D-kultivierter Zellen.	69
Abbildung 32: Seneszenz-abhängige Klassifikation der 3D-kultivierten Zellen.	71
Abbildung 33: Vorhersage proliferierender und seneszenter 2D-kultivierter Zellen.	72
Abbildung 34: SA β -Gal-Färbungen quieszenter Fibroblastzellen.	77
Abbildung 35: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zellzustände.	78
Abbildung 36: Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren verschiedener Zellzustände.	79
Abbildung 37: Klassifikation quieszenter Zellen gegen proliferierende und seneszente Zellen.	81
Abbildung 38: Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren kurz- und langzeitkultivierter quieszenter Zellen.	83
Abbildung 39: Klassifikation zur Kultivierungsdauer quieszenter Zellen.	85
Abbildung 40: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen quieszenter Zellen.	87
Abbildung 41: Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren erneut proliferierender Zellen.	87
Abbildung 42: Klassifikation von aus der Quieszenz in die Proliferation zurückgewonnener Zellen.	89
Abbildung 43: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen Quieszenz-induzierter Zellen.	90

Abbildung 44: Mittelwertspektren kontaktinhibierter und serumentzogener quieszenter Zellen.	91
Abbildung 45: Klassifikation kontaktinhibierter und serumentzogener quieszenter Zellen.	92
Abbildung 46: Raman-spektroskopische Klassifikation der Zelllinien innerhalb einzelner Altersgruppen.	118
Abbildung 47: Raman-Koeffizienten nach Klassifikation der Zelllinien.	119
Abbildung 48: Mikroskop-Aufnahmen junger Fibroblastzellen und einer seneszenten Zelle.	119
Abbildung 49: FT-IR-spektroskopische Klassifikation der Zelllinien innerhalb einzelner Altersgruppen.	120
Abbildung 50: FT-IR-Koeffizienten nach Klassifikation der Zelllinien.	121
Abbildung 51: ROC-Kurven anhand der für die Zellzustände getesteten Batches.	123
Abbildung 52: ROC-Kurven anhand der getesteten Batches zur quieszenten Kultivierungsdauer.	123
Abbildung 53: ROC-Kurven auf Basis der aus der Quieszenz zurückgewonnenen proliferierenden Zell-Batches.	123
Abbildung 54: ROC-Kurven basierend auf den getesteten Batches zur quieszenten Induktion.	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Schema einer Zuordnungsmatrix mit zwei Klassen.....	26
Tabelle 2:	Übersicht verwendeter Fibroblast-Zelllinien.	27
Tabelle 3:	Übersicht über die Anzahl der mit bildgebender RS analysierten Zellen.	31
Tabelle 4:	Übersicht über die Anzahl der mit FT-IR-Spektroskopie analysierten Zellen.	32
Tabelle 5:	Ausgewählte Raman-Banden untersuchter Fibroblastzellen.	38
Tabelle 6:	Kreuzvalidierung zu den Altersgruppen in den einzelnen Zelllinien.	43
Tabelle 7:	Kreuzvalidierung und Vorhersage aller RS untersuchten seneszenten Zelllinien.	44
Tabelle 8:	Ausgewählte FT-IR-Banden untersuchter Fibroblastzellen.....	46
Tabelle 9:	Kreuzvalidierung der FT-IR-Daten zu den Altersgruppen.	51
Tabelle 10:	Kreuzvalidierung und Vorhersage der FT-IR-Daten für alle Zelllinien.	51
Tabelle 11:	Kreuzvalidierung zu den untersuchten Zellzuständen.	82
Tabelle 12:	Validierung zu den verschiedenen Kultivierungszeitpunkten quieszenter Zellen.	86
Tabelle 13:	Kreuzvalidierung der zurückgewonnenen und nicht zurückgewonnenen quieszenten Zellen.	90
Tabelle 14:	Kreuzvalidierung der kontaktinhibierten und serumentzogenen quieszenten Zellen.....	93
Tabelle 15:	Verwendete Geräte.....	115
Tabelle 16:	Verwendete Materialien.	115
Tabelle 17:	Verwendete Chemikalien.....	116
Tabelle 18:	Verwendete Programme.....	117
Tabelle 19:	Überblick ausgeprägter Raman-Banden der PLS-LD1 für die separate und gemeinsame Klassifikation der Altersgruppen.	118
Tabelle 20:	Überblick ausgeprägter FT-IR-Banden der PLS-LD1 für die separate und gemeinsame Klassifikation der Altersgruppen.	120
Tabelle 21:	Zuordnung ausgewählter Raman- und FT-IR-Banden zur biomolekularen Klassifikation.	122

1 Einleitung

1.1 Motivation und Zielsetzung

Mit steigender Lebenserwartung, aufgrund besserer medizinischer Versorgung und Ernährung sowie höheren Hygienestandards als noch vor einhundert Jahren, wird die Überalterung der Gesellschaft und der demographische Wandel in Deutschland und anderen Ländern zu einer großen gesellschaftlichen und finanziellen Herausforderung. In Deutschland 2015 geborene Kinder haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von ca. 80 Jahren (Jungen 78 Jahre und Mädchen 83 Jahre)¹. Bekannt ist, dass im Alter die Regeneration und Selbsterneuerung des Gewebes abnimmt, was die Funktion des Gewebes beeinträchtigt². Auch die Akkumulation von geschädigten Molekülen in den Zellen ist von zentraler Bedeutung. Um die Gesundheit bis ins hohe Alter zu gewährleisten, sind die altersassozierten Fehlfunktionen und Erkrankungen von Interesse. Ziel der Altersforschung ist es, die Mechanismen, die zu diesen Fehlfunktionen führen, zu identifizieren und dadurch Ansatzpunkte zu gewinnen, die den Zustand des „gesunden“ Alterns verlängern.

Humane Zellen können verschiedene Zellzustände im Gewebe einnehmen. Neben der Zellteilung und dem Wachstum, der sogenannten Proliferation, können Zellen im Zellzyklus arretieren. Ursächlich sind exogene und endogene Stressoren, die z. B. zu Akkumulationen von DNA-Schäden aufgrund von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) führen³. Geschädigte Zellen werden somit an der Zellteilung und an der Bildung von Tumoren gehindert. Unterschieden werden der irreversible und reversible Zellzyklusarrest. Die zelluläre Seneszenz ist durch den irreversiblen Zellzyklusarrest bei bestehender metabolischer Aktivität der Zellen charakterisiert. Dabei stellt die Seneszenz eine Endphase der Zellen dar und ist mit der Alterung assoziiert⁴, da diese zum Verlust der Integrität und Funktion in den Geweben führt. Durch diese Dysfunktionen wird der menschliche Organismus für altersassozierte Erkrankungen anfällig. Die Entfernung seneszenten Zellen aus dem Gewebe kann zur Verjüngung bzw. zur Verzögerung altersassoziierter Fehlfunktionen beitragen⁵.

Die meisten Erkenntnisse zu zellulären Veränderungen, wie zur Seneszenz, wurden anhand von 2D-Zellkultivierungen gewonnen, da diese ein hervorragendes homogenes Untersuchungsmaterial bilden. In Monoschichten gewachsene Zellen *in vitro* spiegeln jedoch nicht die Komplexität der in Mikroumgebungen gewachsenen Zellen wider⁶. Werden Zellen dagegen in einem 3D-Modell kultiviert, imitieren diese das Verhalten von Zellen unter natürlichen Umgebungsbedingungen⁷. Aufgrund der Interaktion zwischen den Zellen untereinander und einer spezifischen Matrix, können sich bekannte molekulare Veränderungen, wie z. B. beim Übergang in die Seneszenz, in 3D-Modellen anders auswirken als mittels 2D-Zellkultivierungen.

Im Unterschied zur Seneszenz können quieszente Zellen zur erneuten Proliferation aktiviert werden, da diese sich im reversiblen Zellzyklusarrest befinden. Wie auch seneszente Zellen, sind quieszente Zellen an der Gewebemhomöostase

beteiligt⁸. Die Quieszenz dient als vorbeugender Schutz vor Übergängen in andere Zellzustände, wie z. B. der terminalen Differenzierung, der Seneszenz oder der Tumorbildung. Nach dem Konzept der Telomerverkürzung kann die Quieszenz zur Verlängerung der Lebensspanne beitragen⁹. Allerdings wurde beobachtet, dass langzeitkultivierte quieszente Zellen in die Seneszenz übergehen¹⁰, ungeachtet der zu vernachlässigenden Telomerverkürzungen.

Quieszente und seneszente Zellen sind durch den Zellzyklusarrest gekennzeichnet und weisen ähnliche Signalwege aufgrund allgemeiner Funktionen bestimmter Gene auf. Dadurch treten gemeinsame Merkmale in quieszenten und seneszenten Zellen auf. Die Detektion der Zellzyklus-arretierten Zellen, v. a. der seneszenten Zellen, beruht auf charakteristischen Biomarkern. Diese werden jedoch nicht einheitlich exprimiert und variieren deutlich zwischen verschiedenen Zellen oder Geweben. Bisherige Marker sind zudem nicht ausreichend spezifisch und können seneszente Zellen nicht eindeutig gegen andere Zellzustände, wie die Quieszenz, abgrenzen¹¹. Insgesamt fehlt ein universeller und spezifischer Marker um die zelluläre Seneszenz zu detektieren. Obwohl Kombinationen verschiedener Marker erfolgreich mittels molekularbiologischer Analysen, wie z. B. durch Western Blot oder Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), eingesetzt werden, werden die biologischen Proben meist aufgrund der invasiven Untersuchungstechniken zerstört. Nachfolgende Analysen sind kaum bis nicht möglich und auch die in der Fluoreszenzmikroskopie spezifisch eingesetzten seneszenten Fluoreszenzmarker sind *in vivo* nur begrenzt anwendbar. Alternative Identifizierungsmethoden, die markierungsfrei, nicht-invasiv und *in vivo* einsetzbar sind, werden daher für die Altersforschung benötigt.

Schwingungsspektroskopische Techniken ermöglichen nicht-invasive Untersuchungen von Proben bei gleichzeitig minimal erforderlicher Probenvorbehandlung. Zu diesen Techniken zählt die Raman-Spektroskopie (RS) und Infrarot (IR) -Spektroskopie, welche zur markierungsfreien Charakterisierung von Molekülen angewendet werden. Spektrale Informationen stellen einzigartige molekulare Fingerabdrücke komplexer biologischer Proben dar, welche im Falle der RS unter natürlichen Umgebungsbedingungen gemessen werden können^{12,13}. In Verbindung mit einem Mikroskop hat sich die Schwingungsspektroskopie als leistungsstarkes bildgebendes Verfahren zur Charakterisierung von biologischem Material etabliert, bei der neben Gewebeanalysen Einzelzelluntersuchungen möglich sind¹⁴⁻¹⁷. Anhand chemometrischer Methoden können die spektralen Informationen aufgrund der chemischen Gesamtzusammensetzung der Probe interpretiert werden. Daher können Veränderungen in der Zusammensetzung beobachtet und mit Zustandsänderungen assoziiert werden.

Mittels RS können Einzelzellen^{18,19} sowie zelluläre Phänotypen^{20,21} und, bezogen auf den Zellzyklus und die Proliferation, biochemische Unterschiede charakterisiert werden²²⁻²⁴. Auch subzelluläre Kompartimente, wie Nuklei und Nukleoli^{25,26} sowie lipidreiche Strukturen^{27,28}, können mittels RS unter Ausnutzung der hohen räumlichen Auflösung abgebildet und spektroskopisch analysiert werden.

Gegenüber RS bietet IR-Spektroskopie einige Vorteile. Unter anderem können Einzelspektren ungefähr 100-mal schneller mit einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden. Besonders in zellulären Strukturen können Kohlenhydrate und Proteine einfacher unterschieden werden. Die IR-Spektroskopie besitzt ein hohes Potential zur Bestimmung verschiedener biochemischer Veränderungen während der zellulären Wachstumsphase²⁹⁻³¹, bei der zellulären Differenzierung^{32,33} und während des Zelltods³⁴⁻³⁶. Nachteilig sind das geringere räumliche Auflösungsvermögen und die starken Absorptionsbanden von Wasser, v. a. im Hinblick auf wasserhaltige biologische Proben. Durch die Kombination beider Schwingungstechniken können komplementäre Informationen gewonnen werden, welche die Aussagekraft der spektroskopischen Ergebnisse steigern³⁷⁻⁴¹.

Ziel dieser Arbeit ist es, seneszente Fibroblastzellen mittels potentiell nicht-invasiver, zerstörungs- und markierungsfreier Techniken auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Daher wird die RS und IR-Spektroskopie als Analysetechnik eingesetzt, um seneszente Zellen gegenüber proliferierenden Zellen abzugrenzen. Gleichzeitig wird mittels einer Referenzmethode die Seneszenz über einen Biomarker detektiert und als Grundlage für die Eingruppierung der Altersgruppen verwendet. Durch langfristige Zellkultivierung wird der Übergang in die Seneszenz in verschiedenen Fibroblast-Zelllinien verfolgt, um charakteristische Änderungen in jungen, mittelalten und seneszenten Zellen zu ermitteln. Eine Fragestellung dabei ist, ob sich für seneszente Zellen einzigartige spektrale Merkmale charakterisieren lassen. Neben der herkömmlichen 2D-Zellkultivierung wird der Übergang in die Seneszenz in 3D-Hautmodellen untersucht, um molekulare Veränderungen aufgrund der komplexeren Umgebung und der damit einhergehenden zellulären Interaktionen zu identifizieren. Zudem werden quieszente Zellen gegenüber seneszenten Zellen abgegrenzt und identifiziert. Da beide Zellzustände durch den Zellzyklusarrest und ähnliche Signalwege charakterisiert sind, sind spektrale Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen diesen Zellen von zentraler Bedeutung. Insbesondere langzeitkultivierte quieszente Zellen sind von Interesse, um die erneute Proliferationsfähigkeit aber auch einen möglichen Übergang in die Seneszenz zu untersuchen. Mit Hilfe multivariater Datenanalysen werden Muster in den umfangreichen Datenmengen sowie feine Unterschiede in den Spektren sichtbar gemacht. Gleichzeitig wird die Qualität der chemometrischen Modelle überprüft. Ferner soll diese Arbeit das Potential der markierungsfreien RS und IR-Spektroskopie für die Altersforschung demonstrieren.

1.2 Theoretische Grundlagen zellulärer Alterungsprozesse und aktueller Forschungsstand

Menschliche diploide Zellen nehmen verschiedene zelluläre Zustände ein (siehe Abbildung 1). Die Proliferation von Zellen unterliegt genauen homöostatischen Kontrollmechanismen. Dabei wird die Zellzahl durch die Proliferation (Zellteilung und Zellwachstum) und die Apoptose (programmierter Zelltod) reguliert⁴². Während der Phasen des Zellzyklus können DNA-Schäden auftreten, die in Abhängigkeit des Schweregrades repariert werden können, Apoptose auslösen oder zu einer erhöhten Zellteilungsrate führen, mit oder ohne blockiertem Zelluntergang. Unkontrolliert proliferierende Zellen mit progressiver Zunahme der Zellteilung führen zu Tumoren. Gleichzeitig wird im neoplastischen Gewebe die Differenzierung von Zellen verhindert. In der G₀-Phase (Ruhephase) befinden sich die Zellen in einem reversiblen Zellzyklusarrest. Dieser inaktive Zustand des Zellzyklus wird als Quieszenz bezeichnet. Zellen in diesem Zustand sind Progenitorzellen (Vorläuferzellen) und können in einen Zustand der endgültigen (terminalen) Differenzierung übergehen. Durch spezifische Induktion, z. B. durch Wachstumsfaktoren oder Zellkontakte, erfolgt die Differenzierung und Reifung in spezialisierte, nicht teilungsfähige Zellen. Zelluläre Seneszenz ist der irreversible Zellzyklusarrest nach einer endlichen Anzahl an Zellteilungen bei bestehender metabolischer Aktivität. Zudem können seneszente Zellen die Tumorgenese aufgrund eines seneszenten sekretorischen Phänotyps begünstigen. Insgesamt ist die Balance zwischen der Zellteilung und den antiproliferativen Zuständen entscheidend für den Erhalt der Gewebekomöostase. Der Zellzyklusarrest und die Seneszenz, welche vielschichtige und komplizierte Prozesse sind, spielen eine entscheidende Rolle am lebenslangen Schicksal der Zellen, einschließlich der Alterung.

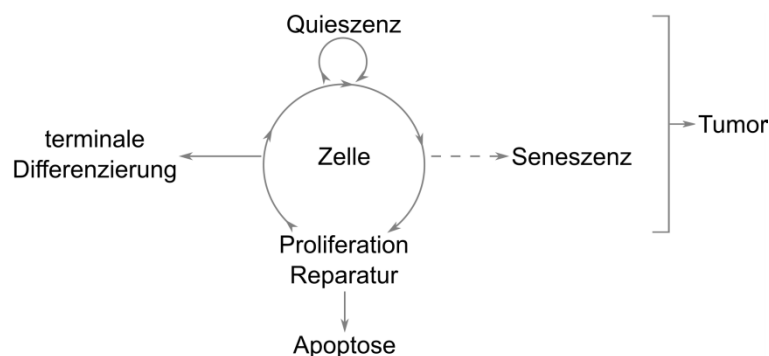


Abbildung 1: Übersicht zu den verschiedenen zellulären Zuständen.

1.2.1 Seneszenz

Nach zahlreichen Zellteilungen werden menschliche Primärzellen seneszent. Dieser Zellzustand, der eine Endphase von Zellen darstellt, wird mit dem Altern assoziiert⁴³⁻⁴⁶. Die Erschöpfung der Zellteilungskapazität – dem replikativen Potential – führt in kultivierten Fibroblastzellen zu einem permanenten Zellzyklusarrest, der zellulären Seneszenz⁴⁷. Obwohl seneszente Zellen außerstande sind zu proliferieren, sind sie

weiterhin lebensfähig und metabolisch aktiv, aber gegenüber mitogenen oder apoptotischen Stimuli unempfindlich^{48,49}. Zudem scheinen seneszente Zellen vom Immunsystem entfernt zu werden⁵⁰⁻⁵², jedoch unterliegt diese Kapazität ebenfalls altersassoziierten Veränderungen⁵³. Die zelluläre Seneszenz kann durch exogene, wie z. B. Chemikalien oder Strahlung, und/oder endogene Stressoren, z. B. onkogene Aktivität oder oxidativer Stress, ausgelöst werden, welche zu DNA-Schäden führen können^{45,50,54,55}. Weiterhin können Gene des Zytoskeletts, die Telomerase-Aktivität und -Regulierung, der Interferon-Signalweg oder Nährstoff-Ungleichgewichte an der Ausbildung der zellulären Seneszenz beteiligt sein. Die zelluläre Seneszenz kann daher mittels Stress vorzeitig herbeigeführt werden (engl. *premature senescence*). Dagegen wird über die endliche Zellteilung eine replikative Erschöpfung induziert (engl. *replicative senescence*)⁵⁶⁻⁵⁹. Letztendlich ist die zelluläre Seneszenz von physiologischer Bedeutung und spielt eine Rolle in der medizinischen Diagnostik. Unter anderem ist sie an der Unterdrückung der Tumorgenese durch die Begrenzung der Proliferation von geschädigten Zellen⁶⁰⁻⁶², bei degenerativen Erkrankungen, der Alterung auf der Organismen-Ebene^{4,63} oder der Wundheilung⁶⁴⁻⁶⁶ beteiligt. Für die (Gewebe-) Diagnostik ist die Identifikation von Tumorzellen essentiell. Diese Zellen müssen nicht nur von gesunden, sondern auch von seneszenten Zellen und anderen Auffälligkeiten unterschieden werden. Mit zunehmendem Alter steigt der prozentuale Anteil an seneszenten Fibroblastzellen im Bindegewebe⁴. Gleichzeitig verzögert die Entfernung seneszenter Zellen altersassoziierte Erkrankungen, bzw. trägt zur Verjüngung des Gewebes bei⁵. Die Entfernung von Genen (z. B. Onkogenen wie RAS), die zur Inaktivierung von Proteinen beitragen, führt zur Unterdrückung der Zellproliferation und induziert Seneszenz. Diese wird mit der Akkumulation des Proteins p16, einer Cyclin-abhängigen Kinase (engl. *cyclin dependent kinase*, CDK), aber nicht des Tumorsuppressor-Proteins p53 assoziiert⁶⁷. Dessen Genstrukturen sind möglicherweise von therapeutischem Nutzen zur Seneszenz-basierten Krebstherapie. Insgesamt tragen seneszente Zellen zum Verlust der Integrität und Funktion von Geweben bei, wodurch der menschliche Körper für eine Anzahl von altersassoziierten Erkrankungen empfänglicher wird^{2,68}. Zelluläre Seneszenz ist daher bei der Ausbildung altersassoziierten Phänotypen beteiligt, während die Entfernung dieser Zellen die Dysfunktion im Gewebe reduziert. Ziel ist es, die Lebenserwartung bei gleichzeitigem Erhalt der Gesundheit zu verlängern, was eine Verknüpfung zwischen zellulärer, gewebeinduzierter und Organismus-bedingter Alterung bedeutet.

Aus humanem Gewebe isolierte primäre Fibroblastzellen erreichen nach ca. 50–80 Populationsverdopplungen (engl. *population doublings*, PD) die zelluläre Seneszenz. Mit dem Erreichen einer endlichen Anzahl an Zellteilungen während der replikativ-induzierten Seneszenz, der „Hayflick-Grenze“, bilden die Zellen mehrere seneszente Phänotypen aus^{47,54}. Allgemein nimmt dabei die (strukturelle) Integrität und Funktion vom Gewebe ab, was zu einer gesteigerten Empfänglichkeit gegenüber altersassoziierten Erkrankungen führt^{68,69}. Eine Kombination aus verschiedenen Stressfaktoren kann komplexe und kumulative Auswirkungen auf heterogene Zellpopulationen haben. Folglich bilden Zellen verschiedene gemeinsame Merkmale

während der Seneszenz aus. Erwiesen ist eine flache, vergrößerte und häufig vielkernige Morphologie^{70,71}. Eine veränderte Protein-Sekretion, z. B. von Wachstumsfaktoren oder Chemokinen mit parakrinen oder autokrinen Effekten, ist als Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp (engl. *senescence-associated secretory phenotype*, SASP) bekannt⁷²⁻⁷⁴. Akkumulationen des Alterspigments Lipofuszin und granulärer (körniger) Partikel⁷⁵ sowie mengenmäßige Zunahmen von Mitochondrien und Lysosomen werden mit der Seneszenz assoziiert^{76,77}. Reaktionen auf DNA-Schäden zusammen mit spezifischen Protein-Signalwegen sind entscheidend für die Ausbildung der Seneszenz⁷⁸. Besonders für die zelluläre Seneszenz sind zwei zentrale Protein-vermittelte Signalwege bedeutend: p53-p21, ein Tumorsuppressor mit einem CDK-Inhibitor sowie p16-pRb, ein CDK-Inhibitor mit dem Retinoblastom-Protein.

Unabhängig von der Hayflick-Grenze kann die Seneszenz Telomer-abhängig und -unabhängig induziert werden. Die abhängige Induktion wird durch eine gesteigerte Reaktion auf DNA-Schäden (engl. *DNA damage response*, DDR) aufgrund dysfunktionaler Telomerase verursacht (möglicherweise verbunden mit verkürzten Telomeren). Pro Zellzyklus verlieren die Telomere der DNA an Länge, da die DNA-Polymerase außerstande ist das 3'-Ende des DNA-Strangs zu replizieren^{69,79}. Das führt zu einem Verlust von ca. 50–200 Basenpaaren pro Zellzyklus⁸⁰. Die dysfunktionalen Telomere aktivieren p53 und akkumulieren weitere Faktoren (z. B. das Histonprotein H2AX und die Serin-Proteinkinase ATM), welche als Telomerdysfunktions-induzierte Foci (engl. *telomere dysfunction-induced foci*, TIF) bezeichnet werden⁷⁹. Von der Telomerlänge unabhängig induzierte zelluläre Seneszenz tritt häufig vorzeitiger als die abhängig induzierte Seneszenz ein und wird durch Chemikalien oder Strahlung verursacht. Dazu zählen u. a. Doxorubicin, Cisplatin oder ultraviolette und ionisierende Strahlung⁷⁸. Diese induzieren globale und permanente DNA-Schäden, welche ab Überschreiten einer bestimmten Schadensgrenze nicht mehr repariert werden. Das verursacht vermehrt DDR und triggert dauerhaft den p53-p21-Signalweg, was wiederum Seneszenz induziert^{81,82}. Auch oxidativer Stress, durch H₂O₂, verursacht genomische und mitochondriale DNA-Schäden, die zur Seneszenz führen⁸³. Schäden treten vorzugsweise an Telomeren auf, da sich dort leicht oxidierbares Guanin in den TTAGGG-Sequenzen befindet. Das Hauptprodukt dieser oxidativen Schäden (8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG)) wird als messbarer Biomarker verwendet. Zudem scheint eine sauerstoffärmere Umgebung das Eintreten der Seneszenz zu verlangsamen⁸⁴. Dies wird im Zusammenhang mit der Reduktion von ROS und der Beeinflussung des ROS-Metabolismus diskutiert⁸⁵. Die Aktivierung von Onkogenen wiederum führt aufgrund von Hyperproliferation zu einem Anstieg von ROS, was zu DNA-Schäden und Seneszenz führt³. Die Aufnahme von Radikalfängern und Antioxidantien wiederum reduziert ROS und wirkt sich positiv auf die Lebensdauer von Zellen aus⁸⁵. Auch die Autophagozytose (auch Autophagie), ein Vorgang bei dem zelluläre Bestandteile in Autophagosomen aufgenommen und in Lysosomen abgebaut und verwertet werden, wird im Zusammenhang mit der zellulären Seneszenz diskutiert⁸⁶. DNA-Schäden, die bei der Alterung per se oder aufgrund von Nährstoffmangel entstehen, wie z. B. bei einem durch die Zellkultur-induzierten

Serumentzug, können eine Autophagozytose auslösen. Somit wäre das Überleben der Zelle gesichert, indem Schäden an Zellorganellen und Fehlfunktionen durch den Abbau verhindert werden.

Insgesamt ist eine Vielzahl an Signalwegen bei der Entstehung der Seneszenz beteiligt. Die hervorgerufenen phänotypischen und genotypischen Veränderungen während der Seneszenz können als charakteristische Biomarker zur Identifizierung eingesetzt werden ⁸⁷.

1.2.2 Seneszenz in dreidimensionalen Hautmodellen

Eine der Hauptaufgaben der in der Dermis befindlichen Fibroblastzellen ist der Aufbau und Erhalt der strukturellen Integrität des Bindegewebes sowie die Wundheilung. Im Gewebe tragen diese Zellen zur Synthese der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) bei, indem sie Vorstufen von Kollagen und anderen Matrixkomponenten sowie Enzymen synthetisieren. Das Bindegewebe ist daher reich an Kollagen. Die Lage der matrixbildenden Komponenten ist dabei abhängig von der Orientierung des Zytoskeletts der Zelle und die Zusammensetzung der ECM bestimmt die physikalischen Eigenschaften des Bindegewebes. Interaktionen zwischen den verteilten, aber in direkter Nachbarschaft befindlichen Einzelzellen und der ECM sind für das Zellverhalten bedeutend.

Besonders Kollagen unterliegt in der menschlichen Haut altersassoziierten Veränderungen ⁸⁸. Auch die Fähigkeit zur Wundheilung nimmt mit dem Alter ab. Die in die Wunde einwandernden Fibroblasten regenerieren ECM, was die Gewebefunktion wiederherstellt. Im Alterungsprozess ist die Beweglichkeit und Proliferation der Zellen vermindert, wodurch Wundheilungsstörungen bei gleichzeitiger Abnahme der Stabilität, Elastizität und Dehnbarkeit zunehmen. Zur Untersuchung der Seneszenz haben sich daher Zellmodelle aus verschiedenen Fibroblast-Zelllinien etabliert, auch aufgrund ihrer leichten Kontrollierbarkeit, guter Adhärenz und dem Vorhandensein von sichtbaren morphologischen Veränderungen ^{77,89,90}. An Populationen von Fibroblast-Zelllinien, kultiviert in zweidimensionalen (2D) Zellkulturen, wurden altersassoziierte Umprogrammierungen auf transkriptioneller Ebene im Detail analysiert ⁹¹. Nahezu 80 % der für die Alterung betroffenen Gene wurden übereinstimmend für fünf verschiedene Fibroblast-Zelllinien gefunden. Dies verdeutlicht in einem hohen Maß gemeinsame zelluläre Veränderungen während des Alterns. Allerdings wurde der Einfluss dieser in der Genexpression ermittelten Veränderungen nicht auf biomolekulare Häufigkeiten und Modifikationen untersucht.

Zellen, die in einer 2D-Zellkultivierung *in vitro* in einer Einzelschicht wachsen, spiegeln nicht die Komplexität der in einer Mikroumgebung wachsenden Zellen *in vivo* wider ⁶. Die 2D-kultivierten Zellen büßen bedeutende Signaleigenschaften und Schlüsselmoleküle ein und bestimmte Phänotypen werden nicht unterschieden. In einer dreidimensionalen (3D) Umgebung kultivierte Zellen exprimieren dagegen unterschiedliche Oberflächenrezeptoren und weisen eine andere proliferative Kapazität, Zelldichte und andere metabolische Funktionen, wie z. B. die ECM-Synthese, auf ⁹².

Aufgrund der Dreidimensionalität erfolgen u. a. interzelluläre Beeinflussungen und Zell-Matrix-Interaktionen. Dadurch entstehen realistischere Modelle zu verschiedenen Fragestellungen, da die *in vivo* Umgebung und das Zellverhalten nachgeahmt wird⁷. Dies ist besonders relevant für Zellen des Bindegewebes, wie den dermalen Fibroblastzellen, welche gewöhnlich von der ECM umgeben sind⁹³. Umgebungsbedingte Unterschiede, d. h. Unterschiede zwischen 2D-Zellkultivierungen und 3D-Modellen, sind auch bei der Zellmigration und den Reaktionen auf Medikamente zu beobachten⁶. Bekannt ist, dass verschiedene Zelltypen zur Bildung von 3D-Hautmodellen verwendet werden können. Dazu zählen die Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten, die die *in vivo*-ähnlichen Strukturen nachahmen⁹². In einer Kollagenmatrix wachsende humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden erfolgreich als 3D-Hautmodell für die Wundtherapie getestet⁹⁴.

1.2.3 Quieszenz

Dermale Fibroblasten liegen als ruhende (quieszente) Zellen im Gewebe vor. Kennzeichnend ist die vorübergehende Abwesenheit der Proliferation⁹⁵. Dennoch werden ECM-Proteine wie Kollagenfasern sekretiert, um für die strukturelle Unterstützung des Bindegewebes zu sorgen und die äußere Umgebung zu formen⁹⁶. Die Homöostase des Gewebes und die Aufrechterhaltung der Funktion wird u. a. durch die Quieszenz kontrolliert, wodurch ebenfalls eine unkontrollierbare Proliferation vermieden wird⁸. Zellen in diesem Zustand sind auch nach langen Zeiträumen in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzutreten. Zum Beispiel werden durch eine Verletzung quieszente Fibroblasten aktiviert, diese beginnen zu proliferieren und migrieren zur Wunde. Durch Sekretion bestimmter Moleküle und die Rekrutierung von Endothelzellen wird der Heilungsprozess koordiniert und aktivierte Fibroblastzellen gehen letztendlich wieder in den quieszenten Zustand über. Funktionelle Veränderungen, wie ein modifizierter Metabolismus⁹⁷ oder Veränderungen in der Chromatin-Konformation^{98,99}, werden mit der Quieszenz assoziiert. Aktiv kann die Quieszenz durch spezifische molekulare Mechanismen ausgelöst werden¹⁰⁰, z. B. durch die Kontaktinhibierung, dem Vorhandensein oder der Abwesenheit von Nährstoffen, dem Verlust der Adhäsion oder durch einen mitogenen Abbau. Diese Aktivierungen sind mit umfassenden Veränderungen in der Genexpression oder in der Genregulation für die Zellteilung verbunden⁹⁶. Auch Schäden durch Radikale oder den Übergang in die terminale Differenzierung werden durch den reversiblen Zellzyklusarrest, als eine vorbeugende Schutzmaßnahme, begrenzt¹⁰¹. Trotz unterschiedlicher G₀-Zustände – der reversiblen Quieszenz sowie der irreversiblen Seneszenz und terminalen Differenzierung – liegt ein gemeinsames genetisches Programm aufgrund allgemeiner Funktionen bestimmter Gene vor. In Zellen, die sich im Zellzyklusarrest befinden, d. h. sowohl in quieszenten als auch in seneszenten Zellen, ist die Hochregulierung des CDK-Inhibitors p21 bekannt, der von p27 begleitet wird¹⁰². Der Mangel an p21 führt zur Rückkehr in die Proliferation und deaktiviert die Quieszenz⁹⁵. Durch Hochregulierung von p21 sind die Zellen wiederum gefährdet, da der Übergang vom

quieszenten in den seneszenten Zustand erfolgen kann. Um die Reversibilität der G₀-Phase zu gewährleisten, muss die terminale Differenzierung als eine Art des irreversiblen Zellzyklusarrests unterdrückt werden¹⁰¹, wodurch andererseits Tumorentstehungen möglich sind. Auch können Zellen sich selbst durch eine kurzzeitige Quieszenz vor einem Übergang in die Seneszenz schützen. Wohingegen langandauernde Quieszenz einen Seneszenz-assoziierten Zellzyklusarrest auslöst, um die Entstehung von malignen Tumoren vorzubeugen¹⁰.

Basierend auf dem Konzept der kontinuierlichen Telomerverkürzung während der Zellteilungen⁹, lässt die Quieszenz im Vergleich zur Proliferation eine Verlängerung der Lebensdauer im Tierversuch erkennen. Demgegenüber ist die Telomerverkürzung in langandauernden quieszenten Fibroblastzellen zu vernachlässigen, da Zellen in den seneszenten Zustand übergehen¹⁰. Die beschriebene Telomerverkürzung als Auslöser für die Seneszenz ist dadurch fragwürdig¹⁰³. Insgesamt weisen quieszente und seneszente Signalwege gemeinsame Merkmale auf, um einen Zellzyklusarrest zu gewährleisten.

1.2.4 Molekularbiologische Analysemethoden

1.2.4.1 Detektion seneszenter Zellen

Seneszente Zellen können von anderen Zellzuständen unterschieden werden, da sie unterschiedliche spezifische Eigenschaften aufweisen. Dazu zählen die abgeflachte und vergrößerte Morphologie und eine veränderte Genexpression. Einige dieser mit der Seneszenz verbundenen Veränderungen können als Biomarker zur *in vitro* und *in vivo* Detektion herangezogen werden¹⁰⁴. Die offensichtlichste und am einfachsten zu detektierende Veränderung ist die Größenzunahme. Für weitere morphologische Veränderungen, wie die steigende Anzahl von Mitochondrien oder Vakuolen, sind spezifische Färbungen in Kombination mit Mikroskopen nötig. Auch die erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA β -Gal) -Färbung lässt sich relativ einfach nachweisen⁷⁵. Andere Biomarker können durch Veränderungen in der Chromatinstruktur und der damit verbundenen Entstehung eines Seneszenz-assoziierten Heterochromatin Fokus^{105,106}, oder eines TIF^{4,79}, zum Seneszenz-Nachweis verwendet werden. Die detektierbare Aktivierung bzw. Hochregulierung von p53 und p16 während der vorzeitigen Seneszenz¹⁰⁷ fungiert außerdem als mögliche Tumorsuppressor-Funktion⁵⁶. Zelluläre Seneszenz wird eher durch p16¹⁰⁸ und andere Tumorsuppressoren (p14ARF und PML) verursacht. Diese wiederum sind von zentraler Bedeutung für p53, welches wesentlich für die zelluläre Reaktion auf die Seneszenz durch die verkürzten Telomere, DNA-Schäden, Onkogene und mitogene Signale ist. Vorübergehend sind dadurch p53 und p21 hochreguliert¹⁰⁹, welche ebenfalls als Biomarker dienen. Phänotypische Veränderungen seneszenter Zellen beruhen auf der exzessiven Sekretion von Wachstumsfaktoren, Matrix-Metalloproteasen, Zytoskelett-Proteinen und Entzündungsmediatoren¹¹⁰, welche unter dem Begriff SASP

zusammengefasst werden. Bestandteile von SASP können wiederum die Tumorprogression fördern und zur Alterung beitragen⁷⁷.

Insgesamt ist die Expression der verschiedenen Marker nicht einheitlich und variiert deutlich zwischen verschiedenen Zellen oder Geweben. Bisher identifiziert keiner dieser Marker vollkommen spezifisch und daher eindeutig seneszente Zellen bzw. grenzt diese gegen verschiedene andere Zellzustände ab^{11,111}. Die Hochregulierung von p21 und p53 während der Seneszenz erfolgt ebenfalls während der Apoptose und Quieszenz. Trotz dieser Unspezifität werden sie zur Detektion zellulärer Seneszenz häufig eingesetzt. Zudem ist die Ausbildung bestimmter Seneszenz-Marker davon abhängig, wie die Seneszenz induziert wird, z. B. durch Aktivierung von Onkogenen oder über replikative Seneszenz¹¹². Die Aktivität der SA β -Gal, die lysosomalen Ursprungs ist und bei einem pH-Wert von 6,0 histochemisch bestimmt wird, wird als ein geeigneter Seneszenz-Marker *in situ* diskutiert⁷⁵. Seneszente Fibroblasten – aber nicht prä-seneszente oder quieszente – exprimieren diesen Marker. Trotzdem ist der SA β -Gal-Marker nicht optimal, da längerfristig in Konfluenz kultivierte Zellen mit der Bildung seneszenten Phänotypen assoziiert werden, welche mit zunehmender Häufigkeit im alternden Gewebe vorkommen¹¹³. Außerdem ist die SA β -Gal am eigentlichen Seneszenz-Prozess nicht beteiligt¹¹⁴.

Daher werden Kombinationen verschiedener Marker zur Identifizierung seneszenten Zellen und zur Abgrenzung gegenüber proliferierenden Zellen in molekular-spezifischen bioanalytischen Untersuchungsmethoden verwendet. Die angewendeten Protokolle beinhalten häufig invasive Vorbehandlungen, die wiederum die zellulären Funktionen während der Untersuchung beeinflussen können. Durch die Markierung von Zellen sind nachfolgende zelluläre Untersuchungen begrenzt oder nicht möglich, beispielsweise durch Färbungen mittels Primärantikörpern für eine Immunfluoreszenz- oder Immunblot-Analyse¹¹⁵, durch SA β -Gal oder mittels Sudanschwarz B Farbstoffen. Das Einbringen von Antikörper in Zellen erfolgt über die Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen, was zur Folge hat, dass der zelluläre Stoffwechsel verändert wird oder unterbrochen ist. Daher werden zelluläre Immunstudien *in situ*, aber nicht *in vivo*, durchgeführt. Die verminderte Funktion des Proteasom-Systems in seneszenten Zellen führt zur Anreicherung von oxidierten Proteinen in Form von Lipofuszin^{115,116}. Im Lipofuszin sind ebenfalls Abfallprodukte von oxidierten Lipiden enthalten, die mit den Proteinen aggregieren. Die Akkumulation der Produkte mit zunehmender Seneszenz führt zu einer verstärkten Autofluoreszenz in seneszenten Zellen.

Insgesamt fehlt ein universeller und spezifischer Marker, um die zelluläre Seneszenz zu detektieren. Obwohl eine Kombination aus verschiedenen Markern erfolgreich zur Detektion eingesetzt wird, sind verwendete Protokolle bei vielen Untersuchungsmethoden für biologische Proben meist invasiv und zerstören diese. Anschließende Untersuchungen sind nicht mehr möglich. Viele Marker eignen sich daher nicht für eine *in vivo* Detektion seneszenten Zellen. Daher besteht für die Detektion seneszenten Zellen eine hohe Nachfrage an nicht-invasiven und markierungsfreien Techniken, die auch zukünftig *in vivo* einsetzbar sind.

1.2.4.2 Analysemethoden

In der Altersforschung kommen gängige molekularbiologische Untersuchungen wie die Fluoreszenzfärbung, Western Blot, *enzyme-linked immunosorbent assay* (engl., ELISA) oder PCR zum Einsatz¹¹⁷. In Bezug darauf, wird sich auf Methoden der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Seneszenz-Marker konzentriert.

Vor Fluoreszenzfärbungen erfolgt häufig eine Zell-Fixierung, um Strukturen für nachfolgende Untersuchungen zu konservieren und um zelluläre Zerfallsprozesse zu unterbinden. Dabei ist die Methode der Fixierung entscheidend für die nachfolgende Verwendung der Probe. Für konventionelle (immun-) histologische und anatomische Untersuchungen eignen sich Formaldehyd-basierte Methoden. Diese beruhen auf der Vernetzung von Proteinen, da Methylenbrücken oder Brücken durch Ausbildung Schiffischer Basen gebildet werden. Nach erfolgter Fixierung können unterschiedliche Färbungen mit mehreren Farbstoffen durchgeführt werden, welche anschließend mikroskopisch untersucht werden. Dazu zählt die SA β -Gal-Färbung, die häufig in Kombination mit einer DNA-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt wird. In der Immunhistochemie binden in fixierten Proben (primäre) Antikörper an spezifische Antigene, aufgrund ihrer Affinität zu bestimmten Molekülabschnitten (Epitopen). Ausgewählte Strukturen können somit innerhalb der Zellen oder dem Gewebe gegen andere abgegrenzt, lokalisiert und sichtbar gemacht werden. Ein sekundärer Antikörper, über den der Nachweis erfolgt, bindet an den primären Antikörper. Die Nachweisverfahren erfolgen enzymatisch oder über Immunfluoreszenz, d. h. durch am Antikörper gebundene Fluoreszenzfarbstoffe. Diese lassen sich mit einem Fluoreszenzmikroskop nachweisen, indem sie mit UV-Licht angeregt werden und daraufhin Licht einer höheren Wellenlänge emittieren.

Der Proteinnachweis mittels Western Blot beruht auf der Übertragung eines Proteins auf eine Trägermembran und der Identifizierung mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Vor der eigentlichen Übertragung werden die Proteine im Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt. Das geschieht v. a. aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmasse im elektrischen Feld, z. B. durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page). Die dann nach Größe aufgetrennten Proteine können z. B. auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Der Nachweis der gesuchten Proteinbande erfolgt mithilfe eines primären Antikörpers, welcher spezifisch an das Zielprotein bindet. Unspezifische Bindungen werden durch die Behandlung der Membran verhindert, z. B. durch eine Milchpulverlösung. Ein Sekundärantikörper mit einem Marker, z. B. alkalischer Phosphatase, bindet an den gebundenen Primärantikörper. Dieser Marker spaltet von einem Substrat Phosphat ab. Dadurch bildet sich ein blauer Farbstoff, da verbleibende Indolylgruppen mit Sauerstoff reagieren. Durch diese Farb- oder Chemolumineszenz-Reaktionen wird das Zielprotein als sichtbare Bande lokalisiert. Die Intensität der Bande steht in direktem Zusammenhang mit der Proteinmenge.

Auch mittels ELISA können u. a. Proteine spezifisch und quantitativ nachgewiesen werden. Dieses ebenfalls antikörperbasierte Nachweisverfahren beruht

auf der Messung von enzymatischen Farbreaktionen in Mikrotiterplatten. Dabei steht die Intensität der Färbung in direktem Zusammenhang mit der Proteinmenge. Adsorptiv an die Oberfläche gebundene Erstantikörper immobilisieren spezifisch das gesuchte Protein. Die Detektion erfolgt über die Bindung eines zweiten Antikörpers an dem Zielprotein, der das Nachweissystem trägt (z. B. ein Enzym wie die alkalische Phosphatase). Zugegebenes farbloses Substrat wird anschließend enzymatisch umgesetzt.

Um selbst kleinste Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz zu vervielfältigen (amplifizieren), wird die PCR als enzymabhängiges Verfahren *in vitro* durchgeführt. Benötigt werden dabei RNA-Primer, die sich an die DNA anlagern, einzelne Nukleotide und eine hitzestabile Polymerase (häufig aus *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase). Durch DNA-Denaturierung werden Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, damit Nukleinsäuren einzelsträngig vorliegen. Primer binden daraufhin an die 3'-Enden der Gensequenz (Annealing) und die Polymerase synthetisiert den komplementären Strang (Elongation). Dieser Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird so lange wiederholt, bis die gewünschte Menge an DNA vorliegt. Häufig werden 25-50 Zyklen durchgeführt, in der sich die DNA exponentiell vervielfältigt, da sie sich mit jedem Zyklus verdoppelt. Über eine Größenauftrennung mittels Gelelektrophorese können entstandene PCR-Produkte kontrolliert werden. Um quantitativ DNA nachzuweisen, empfiehlt sich eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR). Mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern wird die Menge an gebildeten PCR-Produkten proportional bestimmt. Insgesamt können Aussagen zu genetischen Veränderungen getroffen werden¹¹⁸, wie sie auch bei der Seneszenz stattfinden.

Insgesamt sind die für die Seneszenz-Untersuchungen eingesetzten Techniken meist invasiv, d. h. die Proben werden vor oder während der Untersuchungen zerstört. Das geschieht entweder durch Schneiden von Proben oder Aufschluss von Zellen, um an die DNA zu gelangen, oder durch Fixierung. Auch verwenden viele der Methoden Marker, um Zielstrukturen zu identifizieren. Oftmals erfolgt dies über Antigen-Antikörper-Reaktion, da diese eine hohe Affinität zueinander aufweisen. Dadurch sind weitere Analysen oft nicht mehr möglich, da die ursprüngliche Probe irreversibel verändert wird. Werden Fluoreszenzmarker für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, benötigt jeder einzelne eine andere Anregungswellenlänge. Bei gleichzeitiger Anwendung dürfen sich die Emissionsspektren dieser Marker nicht überlagern, um die Kontrastinformation zu gewährleisten. Die verwendeten Marker können jedoch nicht die Komplexität von biologischen Proben wiedergeben. Zudem können unbekannte Strukturen nicht nachgewiesen werden, da der passende Marker fehlt. Daneben ist der zeitliche und experimentelle Aufwand vieler molekularbiologischer Analysen hoch.

1.3 Schwingungsspektroskopie

Markierungsfreie und nicht-invasive Alternativen zu herkömmlichen biologischen Untersuchungsverfahren sind schwingungsspektroskopische Analysetechniken. Diese basieren auf Schwingungen in Molekülen, die durch elektromagnetische Felder angeregt werden bzw. mit diesen wechselwirken¹¹⁹. Das Molekül geht dabei vom Schwingungsgrundzustand in einen höheren Zustand über. Dabei werden Schwingungen detektiert, welche auf veränderten Bindungslängen (Streckschwingungen, auch Valenzschwingungen genannt) und Bindungswinkeln (Deformationsschwingungen) beruhen. Dadurch können molekulare Eigenschaften, wie z. B. funktionelle Gruppen, charakterisiert und Proben-Bestandteile identifiziert werden. Die zu beobachteten Spektren bestehen aus Spektralbanden, die spezifisch für bestimmte Schwingungen sind, wie z. B. CH-Streckschwingungen in Lipiden und Proteinen. Zwei typische Methoden der Schwingungsspektroskopie sind die RS und IR-Spektroskopie¹²⁰. Beide spektroskopische Techniken sind komplementär zueinander. In der Schwingungs-Spektroskopie wird meist die Wellenzahl ($\tilde{\nu}$, angegeben in cm^{-1}) zur Beschreibung der einzelnen Bereiche der elektromagnetischen Strahlung verwendet, welche im Bezug zum reziproken Wert der Wellenlänge (λ) steht. Die Wellenzahl ist dabei proportional zur Strahlungsfrequenz ν und damit zur Energie des elektromagnetischen Wechselfeldes (E), da $E = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$, wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum ist. Eine höhere Wellenzahl ist gleichbedeutend mit höherer Energie.

1.3.1 Raman-Spektroskopie

Die RS beruht auf der Änderung der Polarisierbarkeit der Elektronenhülle, aufgrund der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Molekülen¹¹⁹⁻¹²¹. Die Polarisierbarkeit α ist das Maß für die Deformierbarkeit der Elektronenhülle in den Molekülen. Die Detektion beruht auf der Messung des an Molekülen unelastisch gestreuten Lichts, welches experimentell 1928 von dem Physiker C. V. Raman nachgewiesen wurde und als Raman-Effekt (auch Smekal-Raman-Effekt) bekannt ist¹²². Dafür wird aus einer Strahlungsquelle kommendes intensives monochromatisches Licht, d. h. Licht einer definierten Frequenz bzw. Wellenlänge, zur Molekülanregung verwendet. Die Entwicklung der Laser (Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung, engl. *light amplification by stimulated emission of radiation*) vereinfachte die RS, da Laserlicht intrinsisch monochromatisch ist.

Das auf die Probe fokussierte Licht wird gestreut und setzt sich aus elastisch (Rayleigh-Streuung) und unelastisch (Raman-Streuung) gestreutem Licht zusammen (siehe Abbildung 2). Bei der Rayleigh-Streuung entspricht die Frequenz des Streulichtes der Frequenz der einfallenden elektromagnetischen Strahlung. Die Rayleigh-Streuung macht einen großen Teil des Streulichtes aus, besitzt aber keinen spektroskopischen Informationsgehalt, da sich die Wellenlänge nicht ändert. Dagegen ist das unelastisch gestreute Licht um etwa acht bis zehn Größenordnungen schwächer als das eingestrahelte Licht (ein Photon von ca. 10^6 Photonen). Während der Raman-Streuung ergibt sich eine

Energiedifferenz zwischen der Frequenz des Anregungs- (ω_0) und gestreuten Lichts (ω) aufgrund der Änderung der Polarisierbarkeit in den Molekülen und der Schwingungsanregung.

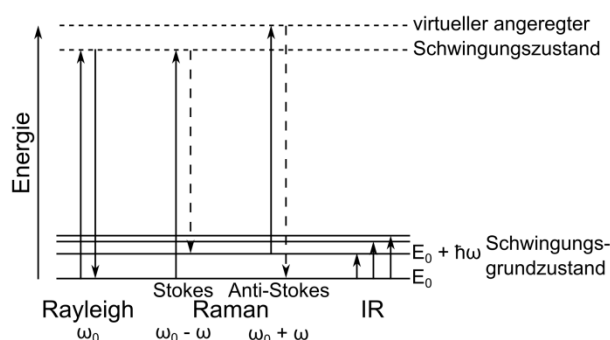


Abbildung 2: Jablonski-Diagramm der Rayleigh- und Raman-Streuung sowie Infrarotabsorption.

Das gestreute Licht weist eine andere Wellenlänge auf, wobei die Energiedifferenz der Schwingungsenergie entspricht. Bei der Stokes-Raman-Streuung erfolgt eine Energieübertragung vom Photon auf ein sich im elektronischen Grundzustand befindendes Molekül. Die Energie und Frequenz des gestreuten Photons nimmt ab und eine längerwellige Streustrahlung ($\omega_0 - \omega$) wird emittiert. Die Energieübertragung bei der Anti-Stokes-Raman-Streuung erfolgt vom im angeregten Schwingungsgrundzustand befindlichen Molekül auf ein Photon. Nach der Anregung und Relaxation befindet sich das Molekül in einem niedrigeren Energieniveau und das gestreute Photon weist eine höhere Energie und Frequenz als ursprünglich auf. Dabei entsteht eine kürzerwellige und damit höherenergetische Raman-Streustrahlung ($\omega_0 + \omega$). Aufgenommene Raman-Spektren werden als Intensität I der Streustrahlung über die relative Wellenzahl des Schwingungsübergangs $\tilde{\nu}$ aufgetragen. Die Intensität der Raman-Streuung steigt mit der vierten Potenz der Frequenz des Anregungslichts ($I_S \sim \nu^4$) bzw. die Raman-Banden sind proportional zum Quadrat der Änderung des induzierten Dipolmoments ($I \sim \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)^2$).

Quantenmechanische Auswahlregeln beschreiben, ob elektromagnetische Strahlung zu Übergängen zwischen zwei Zuständen führt. Raman-aktive Moleküle liegen vor, wenn symmetrische Schwingungen hin zum Inversionszentrum (Symmetriezentrum) vorliegen. Dadurch können Änderungen der Polarisierbarkeit erzeugt werden und ein Raman-Signal wird gemessen, d. h. $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_{q=0} \neq 0$. Mehratomige (n) nicht lineare Moleküle, z. B. Wasser (H_2O), können aufgrund der drei Raumkoordinaten mehrere Freiheitsgrade (Translation-, Rotation- und innere Schwingung) und damit $3n - 6$ unterschiedliche Schwingungsmoden einnehmen. Im Gegensatz dazu besitzen lineare mehratomige Moleküle, z. B. Kohlendioxid (CO_2), zwei Rotationsfreiheitsgrade und führen drei Translationsbewegungen aus. Nach der Gleichung $3n - 5$ besitzen solche Moleküle vier Schwingungsfreiheitsgrade, die als Normalmoden bezeichnet werden (Normalschwingungen; siehe Abbildung 3).

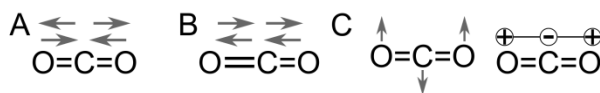


Abbildung 3: Schwingungen eines dreiatomigen linearen Moleküls.

Am Beispiel des CO_2 -Moleküls lassen sich A) symmetrische und B) antisymmetrische Streckschwingungen (auch Valenzschwingungen) sowie C) die Deformationsschwingungen (auch Beugeschwingung) veranschaulichen. Unter C) ist die Deformationsschwingung der Vertikalebene (links) und der Horizontalebene (Schwingung in der Zeichenebene; rechts) abgebildet. Graue Pfeile verdeutlichen die Molekülbewegungen. Die Streckschwingung unter A) ist Raman-aktiv und unter B) IR-aktiv. Die Deformationsschwingungen (C) sind IR-aktiv.

1.3.2 Raman-Mikroskopie

Ein möglicher Aufbau eines Raman-Mikroskops (siehe Abbildung 4) besteht aus einem (monochromatischen) Laser (1) zur Erzeugung einer definierten Anregungs-Wellenlänge und einer optischen Faser (2). Über einen Strahlteiler (3) wird das Licht zum Objektiv (5) gelenkt und das Laserlicht bzw. Streulicht wird fokussiert. Ein Kantenfilter (7) absorbiert einen Großteil der reflektierten Rayleigh-Streuung innerhalb des Mikroskops (4). Die Lochblende bzw. das Pinhole (8) blockiert das Streulicht aus tieferen Probenebenen und über eine photonische Faser (9) gelangt das Licht zum Spektrometer (10). In diesem wird das Streulicht durch ein Gitter spektral zerlegt und der CCD-Detektor (engl. *charge-coupled device*; 10) erfasst die Signalintensität in Abhängigkeit der Wellenlänge.

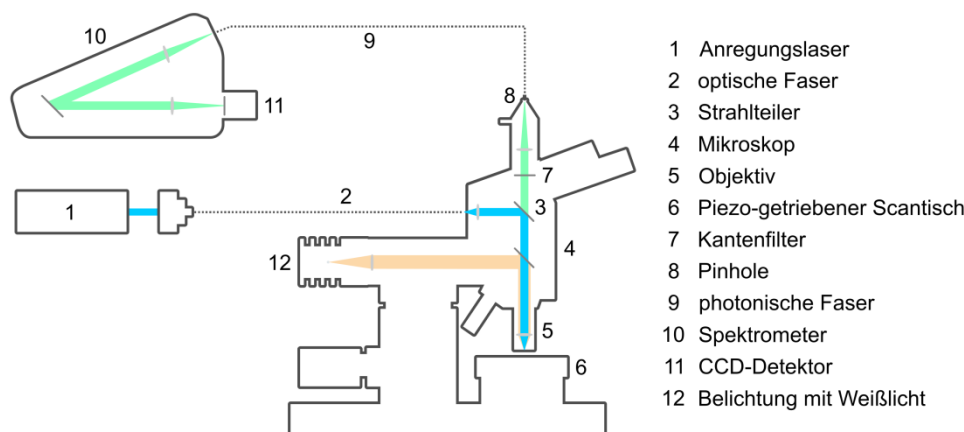


Abbildung 4: Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Raman-Mikroskops.

Adaptiert von ¹²³.

1.3.3 Infrarot-Spektroskopie

Qualitative und quantitative Analysen von Proben sind mittels IR-Spektroskopie möglich, welche heutzutage in der Forschung, z. B. in der Strukturaufklärung, und in der Industrie, z. B. der Qualitätskontrolle von Pharmaka, große Anwendung finden ^{121,124}. Weisen Moleküle veränderbare oder induzierbare Dipolmomente auf, sind diese IR-aktiv, und Wechselwirkungen mit elektromagnetischer Strahlung entsprechender Frequenz können erfolgen. Das Dipolmoment μ eines Moleküls

bestimmt dabei maßgeblich die Absorption der elektromagnetischen Strahlung ($\left(\frac{\partial\mu}{\partial q}\right)_{q=0} \neq 0$). In IR-Spektren werden somit Absorptionsbanden beruhend auf Molekülschwingungen sichtbar. Moleküle mit verschiedenen Atomgruppen ohne anfängliches Dipolmoment können durch eine Verlagerung der Ladungsschwerpunkte ebenfalls ein Dipolmoment ausbilden und dadurch IR-aktiv werden. Moleküle mit gleichen Atomen, homonukleare zweiatomige Moleküle wie N_2 oder O_2 , besitzen kein Dipolmoment und sind daher IR-inaktiv.

Der infrarote Spektralbereich wird nach der Art der Molekülschwingung eingeteilt: nahes IR (engl. *near infrared*, NIR, Wellenzahl von $13.000\text{--}3.3000\text{ cm}^{-1}$), mittleres IR (engl. *mid wavelength infrared*, MWIR, Wellenzahl von $3.300\text{--}330\text{ cm}^{-1}$) und fernes IR (engl. *far infrared*, FIR, Wellenzahl von $330\text{--}10\text{ cm}^{-1}$). Bei Anregungen im FIR werden besonders Molekülrotationen, im MIR besonders Molekülschwingungen und im NIR v. a. Oberschwingungen angeregt. Der zum Messen gebräuchlichste und spektroskopisch interessanteste Wellenzahlbereich ist der des mittleren IR. Wechselwirkt eine elektromagnetische Welle mit der Probe, erfolgt ein Energietransfer und die Strahlungsenergie wird absorbiert und z. B. in thermische Energie umgewandelt. Während der IR-Messung wird die Transmission T ermittelt, indem die Intensität der durch die Probe durchgelassenen IR-Strahlung (I) mit der auf die Probe einfallenden Strahlung (I_0) verglichen wird. Neben der Transmission kann auch die Absorbanz A – häufig für quantitative Messungen – angegeben werden, da beide miteinander in Beziehung stehen (siehe Formel 1.1). Die Absorbanz wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben, dessen Gültigkeit nur bei kleinen Konzentrationen gegeben ist.

$$A_\lambda = \log_{10} \cdot \frac{1}{T} = \log_{10} \cdot \frac{I_0}{I} = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (1.1)$$

Unter Vernachlässigung des Streu- und Reflexionsverlustes ist die Absorption proportional zum molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten (auch Extinktionskoeffizient) ϵ bei einer Wellenlänge λ , der molaren Konzentration der zu untersuchenden Probe c und der Schichtdicke d des zu durchstrahlenden Körpers. Ein Absorptionsspektrum kann daher als Linearkombination mehrere Absorptionsspektren einzelner Spezies beschrieben werden, nach ihren Konzentrationen gewichtet. Praktisch können mittels Lambert-Beerschen Gesetz quantitative Aussagen aus dem IR-Spektrum gewonnen werden.

1.3.4 Infrarot-Mikroskopie

Ursprünglich erfolgte die Aufnahme der IR-Spektren mittels dispersiver Technik, d. h. der spektralen Zerlegung des Lichtes über einen Monochromator (über Gitter oder Prismen). Inzwischen haben sich die Fourier-Transform (FT) -IR-Spektrometer in der IR-Spektroskopie durchgesetzt. Über ein Fourier-Integral erfolgt die Integraltransformation und kontinuierliche nichtperiodische Signale können in ein

kontinuierliches Spektrum zerlegt werden. Dadurch kann der gesamte IR-Bereich zwischen 780 nm und 1000 μm erfasst werden, bei einer gleichzeitig hohen Wellenzahlgenauigkeit und ohne Intensitätsverlust einzelner spektraler Bestandteile. Zur Datenaufnahme wird ein Interferometer, meist ein Michelson-Interferometer, eingesetzt. Über einen Strahlteiler wird der Strahl aus der IR-Quelle in zwei Strahlen aufgeteilt (siehe Abbildung 5). Diese werden im Interferometer auf einen festen und einen beweglichen Spiegel gelenkt, der die Strahlen reflektiert und wieder zusammenführt. Der entstandene, überlagerte (interferierte) Strahl durchquert die Probe, die sich auf dem Objektisch befindet, und die Photonen treffen auf den IR-Detektor, z. B. einen Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor (engl. *mercury cadmium telluride*, MCT). Das resultierende Interferogramm ist abhängig von der Frequenz und des zurückgelegten optischen Weges der Teilstrahlen und wird rechnerunterstützt durch FT in ein IR-Spektrum mit einer Intensitäts-Frequenz-Verteilung umgerechnet.

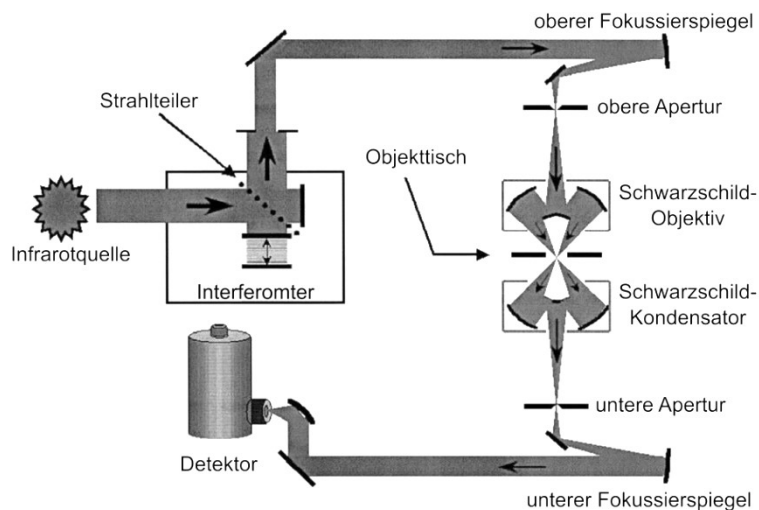


Abbildung 5: Schematischer Aufbau und Strahlengang eines konventionellen FT-IR-Mikroskops. Aufbau mittels reflektierender Schwarzschild-Optik, adaptiert von ¹²⁵.

1.3.5 Einteilung der Wellenzahlbereiche und Vor- und Nachteile der Raman- und Infrarot-Spektroskopie

In Abhängigkeit quantenmechanischer Auswahlregeln sind Übergänge zwischen Schwingungszuständen definiert. Besonders für niedrigere Schwingungsenergien nähern sich Molekülschwingungen einem harmonischen Oszillator an. In Molekülen sind die Schwingungen funktioneller Gruppen i. d. R. unabhängig von denen der übrigen Molekülstrukturen. Ferner liefern Schwingungen detaillierte Informationen über die Probe.

Innerhalb der Raman-Spektren kann der Wellenzahlbereich in einen unteren (kleiner 1800 cm^{-1}) und oberen Bereich (größer 2800 cm^{-1}) eingeteilt werden. Im unteren Wellenzahlbereich werden charakteristische Molekülschwingungen in Form von spezifischen Bandenstrukturen beobachtet. Dies diesen als „Fingerabdruck“ zur Identifikation von Molekülen, wie z. B. von Makromolekülen wie Proteinen. Charakteristische Proteinschwingungen stellen die symmetrische Ringatmung von

Phenylalanin (1004 cm^{-1}) und die hauptsächlich der C=O- bzw. C-N-Streckschwingung zugeordnete Amid I- bzw. Amid III-Banden (ca. 1640 bis 1690 cm^{-1} bzw. 1390 bis 1430 cm^{-1}) dar. Typische Banden der DNA und/oder RNA (ca. 724 und 788 cm^{-1}) beruhen auf der Ringatmung aufgrund der Basenpaare (Pyrimidinbasen wie Cytosin, Thymin oder Uracil) und auf der Esterschwingung anhand des Phosphat-Rückgrats in den Nukleinsäuren (zwischen 1070 und 1100 cm^{-1}), diese sind jedoch relativ unspezifisch. Im oberen Wellenzahlbereich werden CH-Streckschwingungen beobachtet, die aufgrund von CH-Bindungen sowohl in Proteinen als auch in Lipiden vorkommen. Dazwischen liegt der stille Wellenzahlbereich, in dem keinerlei Banden biologischen Proben zugeordnet werden. Im IR-Spektrum beruhen gewonnene Absorptionsbanden auf charakteristischen Schwingungen funktioneller Gruppen, die in bestimmten Bereichen identifiziert werden. Funktionelle Gruppen sind u. a. Carboxy- und Aminoverbindungen, Doppelbindungen oder Aromaten sowie weitere Strukturelemente. Das IR-Spektrum kann dabei in verschiedene charakteristische Bereiche unterteilt werden. Der Bereich kleiner 1500 cm^{-1} gilt als „Fingerabdruck“-Bereich. Hier schwingen v. a. Einfachbindungen bzw. in Reinsubstanz vorliegende Moleküle können identifiziert werden. Besonders Deformationsschwingungen verursachen spektrale Banden. Oberhalb von 1500 cm^{-1} können die Banden v. a. einzelnen funktionellen Gruppen zugeordnet werden.

Die hochspezifische Identifizierung von funktionellen Gruppen, aufgrund der spezifischen Lage und Intensität der Absorptionsbanden bei Reinsubstanzen sowie der mittlerweile zahlreich vorhandenen katalogisierten Vergleichsspektren, macht die IR-Spektroskopie insgesamt zu einer attraktiven Analysetechnik. Zudem ist sie eine sehr zuverlässige, relativ „einfache“ und schnelle Methode, um Strukturen in Substanzen und auch biologischen Proben zu bestimmen, differenzieren oder klassifizieren. Wasser ist aufgrund der starken Eigenabsorption ein ungeeignetes Lösungsmittel in der IR-Spektroskopie, was Messungen von biologischen Proben erschwert. Intensive Wasserbanden (im Bereich von $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$, $2850\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ und $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) überlagern die eigentlichen IR-Spektren. Wasserhaltige Proben werden daher entweder getrocknet oder mittels abgeschwächter Totalreflexion (engl. *attenuated total reflection*) vermessen. Insgesamt sind Analysen von biologischen Proben in wässriger Umgebung von Vorteil, da die Struktur der Probe erhalten bleibt. Dies ist innerhalb der RS-Messungen möglich. Wasser besitzt einen kleinen Steuquerschnitt, da elektromagnetische Strahlung nur schwach absorbiert wird. Im Gegensatz zu IR-Spektroskopie weist Wasser in der RS ein wenig intensives und Banden-armes Spektrum auf. Dadurch können von Wasser alle drei Aggregatzustände (bei verschiedenen Temperaturen und Drücken) vermessen werden. In der Praxis sind daher nicht-invasive und markierungsfreie Untersuchungen von biologischen Proben möglich, z. B. an lebenden Zellen. Jedoch kann es aufgrund des intensiven Laserlichts zum Aufheizen und Verbrennen der Probe kommen, was nachteilig für die Lebensfähigkeit der Zellen ist. Zudem können in biologischen Proben etliche Moleküle fluoreszieren. Im Vergleich zur Raman-Streustrahlung überlagert diese sechs- bis achtfache intensivere Strahlung die Raman-Spektren und erschwert die Datenaufnahme bzw. Auswertung.

Eine langwelligere Anregung im nahen IR-Bereich verringert das Auftreten von Floreszenz, bei einem gleichzeitig geringeren Raman-Signal aufgrund der λ^{-4} -Abhängigkeit.

1.4 Chemometrische Datenanalyse

Strukturen in analytischen Daten können mit Hilfe chemometrischer Analysen eingeordnet, klassifiziert oder vorausgesagt werden ¹²⁶. Für den Nutzer können dadurch Strukturen bzw. Muster sichtbar gemacht werden, indem Zusammenhänge durch Modelle mittels multivariater Datenanalysen erkannt werden. Eine Voraussetzung, um Zusammenhänge zu erfassen, ist u. a. eine geeignete Planung der Messreihe bzw. die Anpassung und Optimierung der Experimente während der Messungen selbst. Große Datenmengen und komplexe, rechenintensive Datenanalysen können heutzutage aufgrund der kontinuierlichen Verbesserungsprozesse in der Computerindustrie relativ schnell ausgewertet werden. In Abhängigkeit des Objektes (z. B. Anzahl der gemessenen Spektren und deren Eigenschaften wie die Intensität) und der Ziele der Datenanalyse, erfolgen häufig neben der Datenbereinigung, wie der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses oder der Entfernung von Ausreißern, Datenreduktionen (siehe Abbildung 6). Die Qualität der Informationen wird dabei nicht beeinflusst. Redundante Daten werden erfasst, aber nicht übertragen. Die Objekte, Ziele und Analysen selbst stehen miteinander in Verbindung.

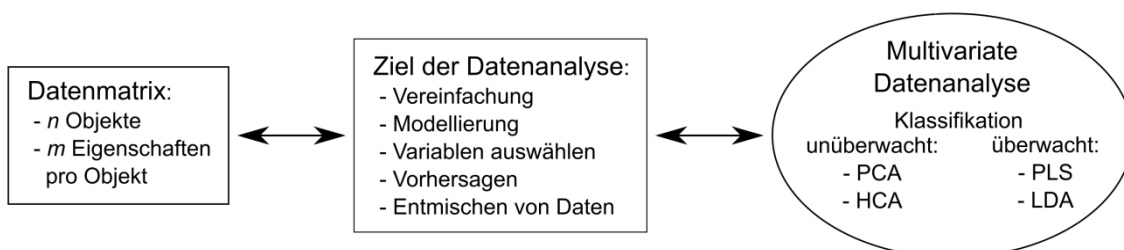


Abbildung 6: Ausgangspunkt und Ziele einer multivariaten Datenanalyse.

Ausgehend von einer Datenmatrix mit vielen Objekten (n), die wiederum viele Eigenschaften/Variablen (m) aufweisen, können in Abhängigkeit der Ziele Klassifizierungsmethoden (z. B. PCA und HCA) oder Regressionsmethoden (z. B. PLS) angewandt werden.

Für spektroskopische Datensätze eignen sich häufig Methoden zur Bildung bilinearer Modelle. Dazu zählt die Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA), lineare Diskriminanzanalyse (LDA) und *partial least squares* (PLS) -Regression. Andererseits können Daten nach der Art der Klassifikation unterschieden werden ¹²⁷. Zur unüberwachten Klassifikation zählen die PCA und die hierarchische Clusteranalyse (engl. *hierarchical cluster analysis*, HCA), bei der Strukturen innerhalb der Spektren ohne zusätzliche Referenzinformationen ermittelt werden. Bei der überwachten Klassifikation werden Strukturen innerhalb der Spektren mit Hilfe von Referenzinformationen, z. B. aus Standardmethoden, aufgezeigt. Dabei wird ein bestimmtes Grundwissen über die Datensätze vorausgesetzt. Zu diesen Klassifikationen zählen u. a. die PLS und LDA.

1.4.1 Hierarchische Clusteranalyse

Um abgestufte Strukturen in meist unbekanntem Datensätzen, wie z. B. Zellkompartimente innerhalb der Zellen, zu „clustern“ und darzustellen, kann eine HCA durchgeführt werden¹²⁸. Über distanzbasierte Verfahren werden die Spektren in Gruppen, sprich Clustern, unterteilt. Innerhalb des Cluster weisen die Spektren eine geringere Distanz und demnach eine höhere Ähnlichkeit (größere Homogenität) auf als zwischen einzelnen Clustern (größere Heterogenität). In Abhängigkeit des Berechnungsverfahrens werden die Cluster agglomerativ (anhäufend) oder divisiv (trennend) gebildet. Bei agglomerativen Verfahren (auch Bottom-Up-Verfahren) ist jedes Spektrum zu Beginn ein einzelnes Cluster. Sukzessiv werden über den geringsten Abstand zwischen zwei Clustern diese zu einem größeren zusammengefasst. Nach jedem Zusammenschluss wird die Distanz zwischen den Clustern neu berechnet. Dieser iterative Prozess wiederholt sich $n - 1$ mal, bis alle Spektren n in Clustern vereint sind. Im Gegensatz dazu bilden alle Spektren bei divisiven Verfahren (auch Top-Down-Verfahren) zu Beginn ein gemeinsames Cluster, welches sukzessiv in kleinere Cluster gesplittet wird. Am Ende ist jedes einzelne Spektrum in einem einzelnen Cluster. Die gebildeten hierarchischen Cluster-Strukturen lassen am Ende keine Rückschlüsse mehr auf verwendete Berechnungsverfahren zu. Graphisch werden die Ergebnisse in einem Dendrogramm dargestellt. Auf der x-Achse werden die Objekte aufgetragen und auf der y-Achse werden die Abstände zwischen den Clustern und dadurch die Distanzen bzw. Ähnlichkeiten dargestellt. Auf jeder Ebene werden zwei Cluster in Form von Knoten vereinigt. Kanten repräsentieren Distanzen und Abstände zwischen den Clustern werden durch vertikale Linienzüge verdeutlicht. Häufig wird für spektrale Analysen die Pearson-Korrelation als Ähnlichkeitsmaß verwendet (siehe Formel 1.2). Spektren (X und Y bzw. standardisierte Werte Z_X und Z_Y) werden jeweils paarweise multipliziert und die Summe des sich ergebenden Produkts wird durch die Anzahl der Wertepaare (zugrundeliegende Variablen N) dividiert, die sich um 1 verringern.

$$\text{Ähnlichkeit}_{X,Y} = \frac{\sum(Z_{Xi} \cdot Z_{Yi})}{N-1} \quad (1.2)$$

Zur Berechnung des Dendrogramms kann die Ward-Methode angewandt werden. Über den euklidischen Abstand $d(x, y)$ wird das Dendrogramm berechnet, indem im n -dimensionalen Raum zwei Punkte durch die euklidische Norm $\|x - y\|_2 = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$ des Differenzvektors zwischen den zwei Punkten definiert sind. Jede Dimension entspricht dabei einem x-Wert im Schwingungsspektrum. Der Ward-Algorithmus kann auch für die Berechnung der Distanzmatrix verwendet werden. Erhaltene Cluster werden entweder durch einen definierten Schnitt in der Höhe des Dendrogramms oder über die vorab definierte Anzahl der Cluster bestimmt. Komplexe Datensätze können über die gebildeten homogenen oder heterogenen Cluster taxonomische Verwandtschaftsverhältnisse von Mikroorganismen oder spektrale Ähnlichkeiten in biologischen Materialien wie in Zellen aufzeigen^{129,130}.

1.4.2 Hauptkomponentenanalyse

Die PCA¹³¹ hat das Ziel, viele gemessene Variablen auf wenige latente (indirekt erfasste) Variablen zu reduzieren und dadurch umfangreiche Datensätze zu strukturieren und zu vereinfachen¹²⁶. Unabhängige Variablen der Datenmatrix X werden verwendet, wobei Referenzmethoden nicht berücksichtigt werden. Entstandene latente Variablen (LV) werden auch Faktoren oder Hauptkomponenten genannt. Mathematisch sind dies Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen, d. h. die unterschiedlich gewichteten Variablen ergeben eine lineare Summe. Die Faktoren werden über einen Algorithmus zur Eigenwertberechnung bestimmt, wobei aus einer mittenzentrierten Datenmatrix X Eigenvektoren und zugehörige Eigenwerte ermittelt werden, die zusammen diese Faktoren bilden (siehe Formel 1.3). Die Spalten von X geben die Anzahl der Faktoren, sprich die m Eigenschaften (Anzahl der Merkmale oder Variablen), wieder. In den Zeilen stehen die n Objekte (Anzahl Proben). X wird in zwei neue Matrizen zerlegt: die Gewichts- oder *Score*-Matrix T und die Faktoren- oder Hauptkomponentenmatrix P , welche mittels Hauptachsentransformation transponiert wird (P^T). P weist so viele Spalten wie die Originalmatrix auf, welche als Faktorladungen (engl. *loadings*) bezeichnet werden. Die Zeilen entsprechen der Anzahl der zu berücksichtigten Hauptkomponenten. Anteile der Faktoren an der Gesamtvarianz (zufällige Fehler; Ermittlung der Messunsicherheiten) der gemessenen Daten werden durch die Eigenwerte bestimmt. Je wichtiger Faktoren zur Beschreibung der Originaldaten sind, desto höher sind die Eigenwerte und dadurch Anteile an der Gesamtvarianz. Für jedes Objekt werden neue Koordinaten (Faktorenwerte, engl. *scores*) berechnet und die Objekte werden genau auf diesen Faktoren abgebildet. Faktorenwerte bilden die Matrix T , die gleich viele Zeilen wie in X aufweisen und die Spalten entsprechen der Anzahl der Faktoren, sprich der Dimension des neuen Koordinatensystems. Um eine Datenreduktion zu erreichen, werden meist weniger Faktoren als die vorhandenen Variablen von X berechnet. Dadurch entsteht die Residuenmatrix E , als Differenz zwischen originaler Matrix X und der über die Faktoren und *scores* reproduzierten Matrix. E weist genauso viele Zeilen und Spalten wie in X auf. Die Residuenmatrix liefert Informationen, welche Variablen bei welchen Objekten die gewählte Anzahl an Faktoren am geeignetsten wiedergegeben. Je kleiner der Betragswert, desto besser.

$$X = TP^T + E \quad (1.3)$$

Die Schwierigkeit bei der Verwendung der PCA besteht darin herauszufinden, wie viele Faktoren nötig sind, damit nur die relevanten Informationen zur Modellbeschreibung herangezogen werden. Häufig beschreiben die ersten zehn Hauptkomponenten die Daten und die weiteren enthalten kaum oder keine Dateninformationen (Rauschen). Auch muss für jeden Datensatz eine eigene Transformationsmatrix ermittelt werden, da die PCA problemabhängig ist.

In einem sogenannten Streudiagramm (engl. *scatter plot*) sollen Korrelationen innerhalb der Datenmenge einfacher erkannt werden. Meistens werden zwei bis drei

Datenmerkmale, in Form der Hauptkomponenten, in einem kartesischen Koordinatensystem gegenübergestellt (siehe Abbildung 7). Die erste Hauptkomponente (engl. *principal component 1* oder PC1), und somit die erste Achse im neuen Koordinatensystem, wird so in die Datenmatrix projiziert, dass sich die Gerade den Daten am besten nähert (siehe Abbildung 7B). Der Unterschied innerhalb der Daten, z. B. zwischen zwei Gruppen, wird dadurch maximal und die Varianz der Daten in dieser Richtung ist am größten. Somit ist der Fehler, der durch abweichende Datenpunkte entsteht, am geringsten. Der Koordinatenursprung als Nullpunkt im neuen Hauptachsenkoordinatensystem wird über den Schwerpunkt aller Daten, d. h. über den Mittelwert der Variablen, bestimmt. Die zweite Achse, sprich die zweite Hauptkomponente (PC2), geht durch den Datenmittelpunkt und ist orthogonal zur ersten Achse (siehe Abbildung 7C). Die Varianz in dieser Richtung ist am zweitgrößten, die der nächsten Achse am drittgrößten, usw.

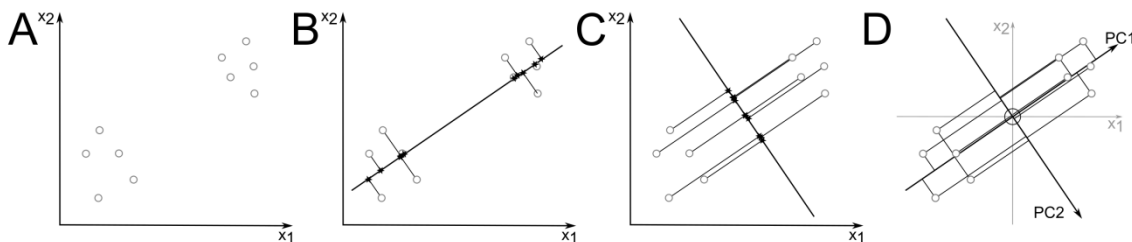


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Hauptkomponenten.

Objekte (A; Kreise) mit Geraden (B, C), die die maximale (B) und minimale Varianz (C) der Daten sichtbar macht. Projektion der Daten auf der Geraden sichtbar durch schwarze Sterne. Ursprüngliches Koordinatensystem (hellgrau) und neues Hauptkoordinatensystem (D) durch die Projektionen der *scores* auf die Hauptachsen (PC1 und PC2). Einheitskreis als Schnittpunkt der neuen Achsen, adaptiert von ¹²⁶.

Die Varianz einer Komponente ist ein Maß für den Informationsgehalt am Gesamtdatensatz und wird in Prozent angegeben. Für Daten mit m -Eigenschaften gibt es daher insgesamt m -Achsen, die orthogonal zueinander stehen. Durch Rotation der Achsen, die die Eigenschaften/Variablen darstellen, entsteht das neue Koordinatensystem (siehe Abbildung 7D). Der Schnittpunkt des Einheitskreises mit den Achsen erhält den Betrag eins als Einheit im neuen Koordinatensystem. Dabei sind die *scores* die Projektionen der Datenpunkte auf die neuen Koordinatenachsen. Die Richtung wird dabei von den *loadings* der einzelnen Hauptkomponenten bestimmt, d. h. die Richtung ist abhängig vom Einfluss einer Variablen.

1.4.3 Partial Least Squares-Regression

Die PLS zählt zu den multivariaten Regressionsverfahren ¹²⁶. Ähnlich der PCA werden Zusammenhänge zwischen vielen Zielgrößen Y (Variablen wie z. B. den PD) und vielen Messgrößen X (z. B. den Spektren) errechnet, wobei n Objekte mit m (gemessenen) Eigenschaften (z. B. den Spektrenwerten) in X enthalten sind. Zu den Objekten gemessene Zielgrößen bilden Vektoren, welche in der Summe die Matrix Y mit mehreren Dimensionen ($n \times k$; mit k als Anzahl der Zielgrößen) ergeben. Bei der PLS erfolgt eine Transformation in ein niedrigdimensionales Koordinatensystem, das durch

LV aufgespannt wird. Diese korrelieren mit den Variablen der Datenmatrix und sind im neuen Koordinatensystem richtungsweisend. Insgesamt sind weniger und einfacher zu interpretierende Komponenten (Richtungen) vorhanden. Die PLS verhält sich analog zur PCA und empfiehlt sich als Vorbehandlungsmethode für die LDA^{132,133}. Im Unterschied zur PCA verwendet die PLS Informationen der Y -Daten zur Findung der (Haupt-) Komponenten für die X -Daten. Informationen von unabhängigen und abhängigen Variablen werden daher verwendet. Dazu zählt z. B. die Eingruppierung seneszenten Zellen aufgrund der PD und prozentualer Anteile an positiv gefärbten Zellen. In der PLS werden Einflüsse auf die unabhängigen Variablen unterdrückt, wenn sich diese Einflüsse nicht auf die abhängigen Variablen auswirken. Schematisch wird eine PCA aus den X -Daten berechnet (siehe Formel 1.4), und dabei entstehen *scores* T und *loadings* P . Die Verbindung zwischen den X - und Y -Daten ist die transponierte Matrix W , analog zu P^T , welche gewichtete *loadings* berechnet. Diese drücken den Zusammenhang zwischen den Vektoren und der Matrix X aus. Für die Y -Daten wird ebenfalls eine PCA berechnet (siehe Formel 1.5), wodurch die Matrix U mit den *scores* und die Matrix Q mit den *loadings* entsteht. Die jeweilige Residuenmatrix E bzw. F ist von der Anzahl der gewählten Faktoren abhängig.

$$X = TP^T + E \quad (1.4)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (1.5)$$

Zwischen X - und Y -Daten erfolgt ein Informationsaustausch, wobei die PCA von Y von X beeinflusst wird und die PCA von X Informationen aus Y enthält (siehe Abbildung 8).

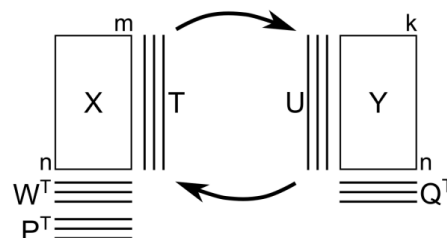


Abbildung 8: Schema der PLS und der jeweiligen Matrizen.

X -Daten beeinflussen die PCA der Y -Daten und umgekehrt, adaptiert von¹²⁶.

Die neuen Koordinaten werden nach ihrer Wichtigkeit geordnet und nur die ersten LV, die die Richtung angeben und deren Anzahl der Benutzer definiert, werden in dem neuen Koordinatensystem für die LDA verwendet. Die Auswahl für die Anzahl der LV muss abgeschätzt werden. Der Vorteil der PLS als robuste Regressions- oder Kalibriertechnik liegt darin, dass sie mit vielen Variablen, die wiederum viele Informationen aufweisen, umgehen kann. Das eignet sich besonders für spektroskopische Auswertungen von biologischen Proben. Nachteilig ist, dass die PLS versucht, Klassen auf einen Punkt zu projizieren, wodurch keine Streuungen sichtbar werden. Daher ist es sinnvoll, die PLS mit der LDA zu einer PLS-LDA zu kombinieren, um Klassifikationsprobleme zu lösen. Solche Modelle wurden für die Klassifikation von Raman- und/oder FT-IR-Spektren von Einzelzellen für unterschiedlichste Fragestellungen verwendet¹³⁴⁻¹³⁶.

1.4.4 Lineare Diskriminanzanalyse

Bei moderaten Modellabweichungen eignet sich die klassische LDA für Daten mit zwei oder mehreren unterschiedlich identifizierbaren Gruppe aufgrund ihrer Robustheit¹³⁷. In Abhängigkeit des Stichprobenumfangs können jedoch die Varianzabschätzungen unterschiedlich stark streuen. Eine auf Fisher zurückgehende Diskriminanzanalyse betrachtet univariate Linearkombinationen von n Variablen als Diskriminanzfunktionen¹³⁸. Als überwachtes Analogon zur PCA und Klassifikationsanalogon zur PLS, maximiert die LDA die Varianz zwischen einzelnen Gruppen. Innerhalb der Gruppen wird dabei die Kovarianzstruktur (Kovarianzmatrix) berücksichtigt. Dadurch kann die Varianz zwischen den Gruppen maximiert und innerhalb minimiert werden. Durch Koordinatentransformation der Daten wird die Kovarianzmatrix aller Gruppen zur Einheitsmatrix und eine elliptische Kovarianzstruktur dadurch sphärisch. Die Verbindungslinie zwischen den Gruppenmittelpunkten im neuen Koordinatensystem ist die Richtung mit maximaler Distanz, welche den Normalenvektor der Trennebene angibt. Der Schnittpunkt zwischen der Trennebene und der Verbindungslinie zwischen den Gruppenmittelpunkten ist aufgrund der Zugehörigkeit der verschiedenen Gruppen festgelegt, d. h. der Winkel ist von der Kovarianz zwischen den Variaten im neuen Koordinatensystem abhängig. Um die Summe der Wahrscheinlichkeiten der Fehlklassifikationen zu minimieren, wird der Schnittpunkt so gewählt, dass er für beide Gruppen gleich ist. Mit unterschiedlicher Gewichtung der Fehlklassifikationen kann er allerdings auch verschoben werden. Die Eigenvektoren der Kovarianzmatrix aus der gemeinsamen Matrix aller Gruppen S_w und zwischen den Gruppen S_b ergeben die Diskriminanzfunktionen $S_w^{-1}S_b$. Maximal bilden LDA-Modelle $n_g - 1$ Diskriminanzfunktionen zur Trennung von n_g Gruppen. Projektionen aus dem p -dimensionalen in einen $n_g - 1$ -dimensionalen Datenraum werden in einem *score plot* dargestellt. Vorteile der LDA bei zwei Gruppen sind u. a. die Bildung eines linearen Modells, wodurch eine einfache Anwendung und gute Interpretierbarkeit entsteht¹³⁹. Erfüllen die Daten die Annahmen der LDA (z. B. richtig spezifiziertes Modell, keine lineare Abhängigkeit der Variablen, die Störgrößen sind nicht korreliert und normalverteilt) werden mehr Informationen aus den Daten genutzt und die LDA liefert effizientere Schätzwerte mit kleineren Varianzen als die logistische Regression. Da Schätzprobleme über eine Methode der kleinsten Quadrate gelöst werden, ist die LDA sehr schnell in ihrer Berechnung, was v. a. bei großen Datensätzen relevant ist. Nachteilig ist die geringere Flexibilität, Robustheit und Unempfindlichkeit gegenüber Ausreißern im Vergleich zur logistischen Regression. Auch benötigt die LDA mehr Proben, da die Inversion der Kovarianzmatrix und dadurch die Rechnung numerisch instabil ist.

1.4.5 Validierung, Sensitivität und Spezifität

Die Qualität oder Leistungsfähigkeit chemometrischer Modelle lässt sich durch eine Validierung (Test) überprüfen. Die aufgrund des Modells berechneten Vorhersagen zu den Proben werden mit bekannten Referenzinformationen (z. B. Messergebnisse aus Standardtechniken, auch Goldstandard) verglichen. Zum Testen der Daten werden geeignete Validierungsschemata und Kenngrößen benötigt, um die Leistungsfähigkeit des Modells zu beschreiben. Die Anzahl der Proben und die Art des Validierungsschemas beeinflussen die Varianz des Validierungsergebnisses bzw. das Schema des systematischen Fehlers.

1.4.5.1 Validierung

Die k -fache Kreuzvalidierung wird in der Chemometrie häufig angewandt. Proben werden auf möglichst gleich große Datensätze k aufgeteilt, i. d. R. entstehen zwischen 5-10 Unterdatensätze, aus denen ohne Zurücklegen gezogen wird. Während der Validierung dieser Modelle wird jeweils ein Unterdatensatz ausgelassen, um eine gleiche Gewichtung der Proben für die Auswertung zu gewährleisten. Dieser ausgelassene Datensatz wird von den übrigen getestet. Ein Sonderfall ist die *leave-one-out*-Validierung, bei der immer genau eine Probe ausgelassen wird. Da diese eine Probe häufig nicht den Gesamtdatensatz repräsentiert, können diese Modelle falsche Voraussagen liefern¹⁴⁰. Allerdings kann durch zufällige Probenaufteilung und Wiederholung (Iteration) die Varianz-Unsicherheit reduziert werden, ohne große Abweichungen zum systematischen Fehler für die Messung der Modellqualität aufzuweisen¹⁴¹.

1.4.5.2 Sensitivität und Spezifität

Kenngrößen für Klassifikationsmodelle sind u. a. die Sensitivität und Spezifität. Als Maß für die Empfindlichkeit gibt die Sensitivität an, wie gut z. B. eine Methode alte Zellen als tatsächlich seneszent detektieren kann (Richtig-positive-Rate). Die Spezifität, als Maß für die Genauigkeit, gibt die Fähigkeit einer Methode an, wie gut z. B. junge Zellen als nicht seneszent bzw. jung erkannt werden (1 – Falsch-negative-Rate). In der Regel kann die Sensitivität auf Kosten der Spezifität erhöht werden und umgekehrt. Diese und andere Kenngrößen sind die Verhältnisse der Summen aus bestimmten Bereichen und lassen sich aus einer Zuordnungsmatrix (auch Wahrheitsmatrix) ableiten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Schema einer Zuordnungsmatrix mit zwei Klassen.

		Vorhersage	
		alte Zellen	junge Zellen
Referenz/ Methode	positiv	richtig positiv r_p	falsch positiv f_p
	negativ	falsch negativ f_n	richtig negativ r_n

Dabei liefert die Matrix einen detaillierten Überblick über die Leistungsfähigkeit des Modells und dessen Vorhersage. Die Sensitivität berechnet sich aus $\frac{r_p}{r_p+f_n}$ und die Spezifität aus $\frac{r_n}{r_n+f_p}$. Beide Kenngrößen sind wichtig, um Aussagen zur Zuverlässigkeit der Spektren zu liefern. Beide Größen können in einem Spezifitäts-Sensitivitäts-Diagramm abgebildet werden, was einer gespiegelten Grenzwertoptimierungskurve (engl. *receiver operating characteristic*, ROC) entspricht. Auf der horizontalen Achse wird die Spezifität und auf der vertikalen Achse die Sensitivität aufgetragen. Ideale Modelle erreichen 100 % Spezifität und Sensitivität und treffen sich in der oberen rechten Ecke der graphischen Darstellung. Zufällig ratende Modelle weisen Werte von jeweils 50 % auf. Das entspricht der Diagonalen in der graphischen Darstellung, die sich zwischen den maximalen Achsenwerten befindet.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung humaner Zellen

2.1.1 Humane Fibroblast-Zelllinien

Humane Fibroblast-Zelllinien BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38 wurden von ATCC (Manassas, VA, USA) erworben. Weitere Informationen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Zu Beginn der Experimente betragen die PD aller Zellen ca. 26–28 PD.

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Fibroblast-Zelllinien.

Zelllinien	Ursprung und Merkmale
BJ	Primärzellen, <i>Homo sapiens</i> , männlich, Neugeborene, Vorhaut, normal diploider Karyotyp
MRC-5	Primärzellen, <i>Homo sapiens</i> , männlich, Abort 14. SSW ^a , Lunge, normal diploider Karyotyp
IMR-90	Primärzellen, <i>Homo sapiens</i> , weiblich, Abort 16. SSW, Lunge, normal diploider Karyotyp
WI-38	Primärzellen, <i>Homo sapiens</i> , weiblich, Abort 3. SSM ^b , Lunge, normal diploider Karyotyp

2.1.1.1 Kultivierung von Fibroblast-Zelllinien

Die im Folgenden zur Zellkultur verwendeten Produkte wurden von Gibco™ und Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen, sofern nicht anders erwähnt. Alle genannten primären Zelllinien wurden nach den Empfehlungen von ATCC in 75 cm² Kulturflaschen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (engl., DMEM, low glucose) unter Zusatz von 10 % (v/v) fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) kultiviert, sofern nicht anders angegeben. Dies erfolgte unter einer 9,5 % CO₂-Atmosphäre bei 37 °C, die befeuchtet wurde. Erreichten die Zellen in der Kulturflasche eine Dichte (Konfluenz) von mehr als 90 %, erfolgte die Überführung in die nächsthöhere Passage. Dazu wurde altes Medium entfernt, die Zellen mit 1x phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, pH 7,4) gewaschen und für 5 min mit 3 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) inkubiert. Um Zellaggregationen zu vermeiden, wurde das Zell-Trypsin-Gemisch vorsichtig suspendiert. Die Zugabe von 5 ml Medium mit Serum bewirkte die sofortige Inaktivierung von Trypsin. Resuspendierte Zellen wurden im Verhältnis 1:2 oder 1:4 mit neuem Medium subkultiviert. Die neuen PD wurden entsprechend der alten PD plus einer oder plus zwei PD gezählt. Nach 2–3 Tagen erfolgte ein erneuter Medienwechsel.

Zur spektroskopischen Analyse wurden Zellen einer gewünschten PD trypsiniert. Anschließend wurde Medium bis auf ein Volumen von 8 ml hinzugegeben. In Abhängigkeit der vorherigen Konfluenz wurden 0,1–1 ml Zellmedium auf autoklavierte Calciumfluorid- (CaF₂) Objektträger (Crystal, Berlin, Deutschland) ausgesät. Diese befanden sich in 6-Kavitäten-Mikrotiterplatten und ca. 5 ml frisches Medium wurde hinzugefügt. CaF₂-Objektträger wurden verwendet, um unerwünschte

^a SSW – Schwangerschaftswoche

^b SSM – Schwangerschaftsmonat

Raman-Hintergrundstreuungen zu vermeiden, die sonst bei normalen Glasobjektträgern aufgetreten wären. Nach maximal einem Tag wurden die adhärennten Fibroblastzellen mit PBS gewaschen und in vierprozentiger Paraformaldehydlösung (PFA, pH 7,4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS. Fixierte Zellen wurden maximal zwei Wochen in PBS bei 4 °C gelagert, bevor sie untersucht wurden.

Für Rückstellproben wurden die Zellen in kryokonservierendem Medium resuspendiert, bestehend aus DMEM, 10 % FBS und 5 % Dimethylsulfoxid, und unverzüglich bei -80 °C gelagert. Nach 2–3 Tagen wurden die Zellen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff überführt. Erneutes Auftauen und wieder einfrieren kann zu vorzeitiger Seneszenz führen¹⁴², was zu vermeiden ist.

2.1.1.2 Erzeugung zellulärer Seneszenz

Replikative Seneszenz wurde unbeeinflusst über die Zellkultivierung induziert. Die Zellen erreichten ihre jeweilig maximalen PD. Die Ausbildung des seneszenten Phänotyps und dem damit verbundenen Proliferationsarrest wurde unter natürlichen Bedingungen für BJ- und MRC-5-Zellen bei ~74 PD und für IMR-90- und WI-38-Zellen ~54 PD beobachtet.

2.1.1.3 Erzeugung von Quieszenz

Quieszenz wurde anhand von Kontaktinhibierung oder Serumentzug an BJ-Zellen (PD 28) in drei unabhängigen Kulturansätzen induziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte direkt auf autoklavierten CaF₂-Objektträgern. Kontaktinhibierung wurde über die vollständige Konfluenz realisiert, ohne ein zwischenzeitliches Passagieren von Zellen. Für den Serumentzug wurden Zellen mit 0,1 % FBS im Medium kultiviert. Quieszente Zellen wurden jeweils für 0, 7, 14 und 100 Tage in drei unabhängigen Kulturansätzen (Batches) kultiviert. Nach 14 und 100 Tagen wurden kontaktinhibierte und serumentzogene Zellen aus der Quieszenz in die Proliferation zurückgeführt und für insgesamt drei zusätzliche Tage kultiviert. Dafür wurden kontaktinhibierte Zellen passagiert und genau wie serumentzogene Zellen mit zehnprozentigem FBS-haltigen Medium kultiviert. Zum Vergleich wurden proliferierende (PD 28) und senescente (PD 70, dem 220sten Kultivierungstag entsprechend) Zellen in drei unabhängigen Batches kultiviert. Unterschieden wurde kurz- (bis 14 Tage) und langfristig- (100 Tage) induzierte Quieszenz, wobei das Medium, wie oben beschrieben, alle drei Tage erneuert wurde. Um während der Langzeitkultivierung bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, wurde während des gesamten Quieszenz-Experiments Kanamycin (0,11 mM), als bakteriostatisches Antibiotikum, und Ampicillin (0,28 mM), als β -Lactam Antibiotikum, in das jeweilige Medium hinzu gegeben. Die Fixierung der für die jeweiligen Zeitpunkte zu untersuchenden Zellen erfolgte wie beschrieben.

2.1.1.4 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung

Nach Dimri *et al.* wurde der SA β -Gal-Assay durchgeführt⁷⁵. Dafür wurden untersuchte Zellen wie oben beschrieben mit vierprozentiger PFA-Lösung fixiert und die SA β -Gal-Färbelösung hinzugegeben. Die Zusammensetzung der Färbelösung war wie folgt: 1 mg/ml X-Gal, 8 mM Zitronensäure/Natriumphosphat (pH 6,0), 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 150 mM NaCl und 2 mM $MgCl_2$. Die enzymatische Reaktion erfolgte innerhalb von 4–16 Stunden im Dunkeln, bei 37 °C unter CO_2 Ausschluss. Nach Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Eindeckmedium Prolong Gold antifade Reagenz mit enthaltenem kernfärbendem DAPI (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde auf die Objektträger zum einbetten gegeben. Für die Untersuchungen zum Übergang in die zelluläre Seneszenz wurden Daten von etwa jeder vierten PD erfasst. Von 60 Zellen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der SA β -Gal-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zu den nicht gefärbten Zellen ermittelt.

2.1.2 Dermale Fibroblastzellen

Humane dermale Fibroblastzellen (HDF), als primäre fetale Zellen, wurden von Pelobiotech (Planegg/Martinsried, Deutschland) bezogen. Die folgenden zur Zellkultivierung benötigten Reagenzien wurden bei PromoCell (Heidelberg, Deutschland) erworben. In der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena wurden diese primären Fibroblastzellen von Frau Doreen Winter kultiviert.

2.1.2.1 Kultivierung dermalen Fibroblastzellen

In 2D Zellkultur wurden HDF in DMEM mit 10 % FBS (v/v) und 1 % (v/v) antibiotischer/antimykotischer Lösung – bestehend aus Penicillin, Streptomycin und Fungizone – in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO_2 und bei 37 °C kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte alle 2–3 Tage. Die Zellen mit den Passagen 4, 6, 7 und 20 wurden mittels Trypsin-EDTA Behandlung geerntet, gezählt und auf CaF_2 -Objektträger in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml in eine 6-Kavitäten-Mikrotiterplatte mit frischem Medium ausgesät. Adhärente Zellen wurden mit vierprozentiger PFA-Lösung fixiert und für die Messungen in PBS bei 4 °C gelagert.

2.1.2.2 Erzeugung dreidimensionaler Hautmodelle

Um 3D Hautmodelle zu erzeugen, wurden HDF – wie oben beschrieben – in 2D-Zellkultivierung kultiviert, geerntet und auf $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml konzentriert. Davon wurden 750 μ l in die Zellkultureinsätze (ThinCert™, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) pro Kavität einer 12-Kavitäten-Mikrotiterplatten überführt. Die ausgesäten Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen wie HDF kultiviert (37 °C, 5 % CO_2) und der Medienwechsel erfolgte alle 2–3 Tage. Nach ca. 21 Tagen bildeten

die Zellen in ihrer 3D-Umgebung eine Fibroblast-derivierte (abgeleitete) Matrix (FDM) aus. Anschließend erfolgte die Fixierung mit vierprozentiger PFA-Lösung und die Lagerung der FDM erfolgte wie die von HDF.

2.1.2.3 Erzeugung von Sphäroiden

Sphärische 3D Fibroblast-Zellaggregate – Sphäroide – wurden mittels Poly-HEMA (Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat), Sigma-Aldrich, München, Deutschland) beschichteten Oberflächen in Kulturgefäßen durch eine Flüssigkeits-überlagernde Methode (*liquid overlay*) erzeugt¹⁴³. Pro Kavität einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte wurden minimal 2×10^4 BJ-Zellen ausgesät. Diese wurden zuvor, wie unter Kapitel 2.1.1.1 beschrieben, für zwei verschiedene PD kultiviert. Sphäroide aus Zellen der PD 28 (3×10^4 Zellen pro Kavität) wurden nach einem Tag mit Zellen der PD 56 (5×10^3 Zellen pro Kavität) eingekapselt. Die Morphologie der erzeugten Sphäroide wurde durch ein Konfokalmikroskop (Hellfeld-Modus, Zeiss LSM 510, Zeiss, Deutschland) und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen an $10 \mu\text{m}$ dicken Kryotomschnitten überprüft (Leica CM1510 S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany). Für nachfolgende Raman-spektroskopische Untersuchungen wurden die fixierten Sphäroide in 5 % Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet, um Tiefenscans und Scans in der x-y-Bildebene zu ermöglichen.

2.2 Raman-Spektroskopie

Zellen wurden an einem konfokalen Raman-Mikroskop (alpha300 R, WITec, Ulm, Deutschland) vermessen. Für Untersuchungen zur Seneszenz in Fibroblast-Zelllinien erfolgte die Anregung bei 488 nm über einen Argon-Ionen-Laser. Untersuchungen zur Seneszenz in 2D-3D-Umgebungen und zur Quieszenz erfolgten über einen Einzelmoden-Diodenlaser, ebenfalls bei einer Wellenlänge von 488 nm. Für alle Untersuchungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet (60x/NA 1,0 W, Nikon, Tokyo, Japan). Die nach dem Objektiv gemessene Anregungsleistung betrug $\sim 13 \text{ mW}$. Während der Messungen befanden sich die Proben in destilliertem autoklavierten Wasser. Der Mikroskopoptisch wurde mit konstanter Geschwindigkeit in x-y-Richtung verfahren, um ein Abrastern des Lasers auf den Zellen zu ermöglichen. Für die Seneszenz-Untersuchung an den Fibroblast-Zelllinien wurden die Raman-Spektren mit einer Schrittweite von $0,5 \mu\text{m}$ und einer Integrationszeit von 0,5 s aufgenommen. Während für die Quieszenz-Untersuchung die Schrittweite $1 \mu\text{m}$ und die Integrationszeit 1 s betrug, wurden für das Experiment zur Seneszenz in 2D-3D jeweils $3 \mu\text{m}$ und 5 s zur Bildgewinnung eingesetzt. Der Spektralbereich zwischen $200\text{--}4500 \text{ cm}^{-1}$, unter Verwendung eines Gitters mit 600 Linien/mm, führte zu einer spektralen Auflösung von ca. 6 cm^{-1} . Die mit 1024×127 Pixeln ausgestattete CCD-Kamera (Newton 970, Andor, Belfast, UK) wurde zum Auslesen der spektralen Daten bei $-67 \text{ }^\circ\text{C}$ verwendet. Einzig für das Quieszenz-Experiment wurde eine andere Kameraeinstellung gewählt (EMCCD-Kamera, engl. *electron multiplying charge-*

coupled device, Andor, Belfast, UK) und bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwendet. Der Vorteil dieser Kamera liegt in der zuverlässigen Detektion von Photonen bei geringer Belichtung aufgrund eines geringen Ausleserausens. Eine Übersicht über die Anzahl der mit bildgebender RS analysierten Zellen innerhalb der verschiedenen Experimente (Seneszenz, seneszente Zellen in 2D-3D-Umgebungen und Quieszenz) zeigt die Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über die Anzahl der mit bildgebender RS analysierten Zellen.

		Altersgruppen						Zellen gesamt	
		jung		mittelalt		seneszent			
Seneszenz	Zelllinien	Zellen	PD	Zellen	PD	Zellen	PD		
		BJ	22	28, 36	22	48, 64	22	70, 72	66
		IMR-90	23	27, 31	25	41, 47	24	53, 55	72
		MRC-5	21	32, 37	25	47, 56	24	68, 72	70
		WI-38	21	29, 36	13	41	21	46, 56	55
	Zellen gesamt	87		85		91		263	
		Altersgruppen						Zellen gesamt	
		jung				seneszent			
Seneszenz in 2D-3D	Zellkultivierung	Zellen	Passage			Zellen	Passage		
		2D (HDF)	24	4			24	20	48
			27	7					27
		3D (FDM)	28	4			41	20	69
			28	6					28
	Zellen gesamt	107				65		172	
		Tage						Zellen gesamt	
		0	7	14	14 R	100	100 R		220
Quieszenz	BJ - Zellzustände								
	G ₀ Kontaktinhibierung	78	92	125	61	105	95	556	
	G ₀ Serumentzug	47	55	53	35	49	37	276	
	Proliferation	34						34	
	Seneszenz							36	
	Zellen gesamt	159	147	178	96	154	132	902	

R – *Recovery* (Erlösung aus der Quieszenz); G₀ – Quieszenz

2.3 FT-IR-Spektroskopie

Vor den Untersuchungen am FT-IR-Spektrometer wurden die Proben für mindestens 30 min in getrockneter Luftatmosphäre belassen (K-MT 3 LAB mit OIL-X EVOLUTION, Parker Hannifin GmbH, Essen, Deutschland), um Wasserdampf-Beiträge zu minimieren. Zellen wurden an einem mit einem Mikroskop gekoppeltem FT-IR-Spektrometer (Varian Model 620 und 670-IR, Agilent, Santa Clara, CA, USA) im Transmissionsmodus gemessen. Das Mikroskop war mit einem Cassergrain-Objektiv (15x/NA 0,4) ausgestattet und die Zellen wurden mit einer ca. $50 \times 50\text{ }\mu\text{m}$ großen geöffneten Apertur vermessen. Pro Zelle wurde ein Spektrum mit einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} über insgesamt 64 Additionen von Einzelspektren aufgenommen. Dies erfolgte durch einen MCT-Detektor für einen Wellenzahlbereich von

900–4000 cm^{-1} . Hintergrundspektren wurden zu Beginn und während der Messreihen regelmäßig generiert, um das Rauschen und die Wasserdampfsignale während der eigentlichen Zellmessungen zu minimieren. Dazu wurden an zellfreien Stellen auf dem Objektträger Spektren gemessen. Diese wurden von den eigentlichen Zellspektren abgezogen. Tabelle 4 liefert eine Übersicht über die Anzahl der mit FT-IR-Spektroskopie untersuchten Zellen innerhalb der verschiedenen Experimente (Seneszenz, seneszente Zellen in 2D-3D-Umgebungen und Quieszenz).

Tabelle 4: Übersicht über die Anzahl der mit FT-IR-Spektroskopie analysierten Zellen.

		Altersgruppen						Zellen gesamt
		jung		mittelalt		seneszent		
Seneszenz	Zelllinien	Zellen	PD	Zellen	PD	Zellen	PD	
	BJ	187	28, 38	188	49, 52, 58	150	62, 70	525
	IMR-90	172	29, 33	125	43, 47	138	49, 53	435
	MRC-5	125	32, 38	95	46, 58	110	62, 70	330
	WI-38	115	29, 37	34	41	105	47, 53	254
	Zellen gesamt	599		442		503		1 544
		Altersgruppen						Zellen gesamt
		jung				seneszent		
Seneszenz in 2D-3D	Kultivierung	Zellen	Passage			Zellen	Passage	
	2D (HDF)	110	4			119	20	229
		116	7					116
	3D (FDM)	226	4			107	20	333
		116	6					116
	Zellen gesamt	568				226		794
		Tage						Zellen gesamt
Quieszenz	BJ - Zellzustände	0	7	14	14 R	100	100 R	220
	G ₀ Kontaktinhibierung	148	164	151	217	211	146	1 037
	G ₀ Serumentzug	159	112	124	239	279	133	1 046
	Proliferation	132						132
	Seneszenz							136
	Zellen gesamt	439	276	275	456	490	279	136

R – *Recovery* (Erlösung aus der Quieszenz); G₀ – Quieszenz

2.4 Datenanalyse

Die statistische Auswertung der mit Raman- und FT-IR-Spektroskopie gewonnenen Daten erfolgte in R¹⁴⁴, einer Software zur Datenverarbeitung und graphischen Darstellung. Für die Datenvorbehandlung und Analyse wurden v. a. die R-Pakete „hyperSpec“, „cbmodels“ und „ggplot2“ verwendet¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

2.4.1 Vorbehandlung der Raman-Spektren

Gemessene Zellspektren wurden in R eingelesen und die Datenvorbehandlung begann mit der Entfernung kosmischer Spikes¹⁴⁸. Aufgrund kleinerer Fluktuationen der Anregungswellenlänge wurden spektrale Verschiebungen in den Wellenzahlen beobachtet. Alle Spektren wurden daraufhin über das Ausrichten auf die prominente Phenylalanin-Bande (1004 cm^{-1}) korrigiert. Um Datenpunktabstände unterschiedlicher Spektren anzugleichen, erfolgte eine glättende Interpolation aller Spektren (`hyperSpec::spc.loess`) auf eine neue Wellenzahl-Achse von $400\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ mit einem Datenpunktabstand von 2 cm^{-1} . Dies stabilisierte die Modellbildung, da die Anzahl von Werten reduziert wurde. Untergrundsignale, z. B. vom Messgerät, Objektträgermaterial, Streulicht oder Fluoreszenz, wurden über die Methode der erweiterten multiplikativen Signal-Korrektur (engl. *extended multiplicative signal correction*, EMSC) herausgerechnet. Mittels linearer Kombination wurden alle Referenzspektren (Offset, linearer Anstieg, WITec-Untergrund, CaF_2 -Spektrum, reines Wasserspektrum und 2–3 Zell-Referenzspektren) an das Originalspektrum angepasst. Ausgewählte zellfreie Referenzspektren wurden als Basislinien herausgerechnet. In Abhängigkeit der Experimente, wurde der Spektralbereich auf $400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ bzw. $600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ und $2800\text{--}3020$ bzw. $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ gekürzt, um informative Spektralbereiche zu erhalten. Pro Zelle wurde ein Mittelwertspektrum berechnet und auf die Fläche normiert.

2.4.2 Vorbehandlung der FT-IR-Spektren

Gemessene Daten wurden in einem `spc`-Dateiformat abgespeichert und in R eingelesen. Zu Beginn wurden die Spektren auf einen Wellenzahlbereich von $900\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ und $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ gekürzt. Anschließend erfolgte eine Basislinienkorrektur mittels Ausgleichspolynom (`hyperSpec::spc.fit.poly.below`), separat für den unteren und oberen Wellenzahlbereich. Für $900\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ wurde eine quadratische und für $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ eine lineare Funktion verwendet. Beide Wellenzahlbereiche wurden anschließend zusammengefügt. Alle FT-IR-Spektren wurden auf die Fläche normiert.

2.4.3 Klassifikationsmodelle

Mittels nicht überwachter HCA wurden die bereits vorbehandelten und gemittelten Datensätze auf ihre spektrale Gemeinsamkeit analysiert. Vorwiegend wurden 10–15 Cluster anhand des Pearson-Abstands und Ward-Algorithmus generiert. In diesen Clustern wurden sichtbar abweichende Spektren, z. B. von kleineren Spikes, Bakterien oder aufgrund von Fluoreszenz, vollständig aus dem Datensatz entfernt. Auch konnten die jeweiligen Einzelzellen vor der Erzeugung des Mittelwerts in ihre jeweiligen Zellkompartimente geclustert werden, z. B. Zytoplasma, Nukleus, Nukleoli und lipidreiche Strukturen.

Zur Klassifikation wurde eine PLS-Regression gekoppelt mit einer LDA durchgeführt. Dieser im Paket „cbmodels“ implementierte Klassifikator basiert auf einer Kombination der Pakete „pls“ für PLS und „MASS“ für LDA^{146,149,150}. Für die Raman-Daten aller Experimente wurden 4 LV für die PLS ausgewählt. Für die FT-IR-Daten wurden sechs LV für Experimente zur Seneszenz- und zur Quieszenz in 2D-3D-Umgebungen verwendet. Experimente zur Quieszenz erfolgten mit vier LV. Da innerhalb der Seneszenz-Untersuchungen vier verschiedene Fibroblast-Zelllinien untersucht wurden, erfolgten zwei Modell-Berechnungen: zuerst eine Zellliniengetrennte Analyse und anschließend eine Analyse für alle Zelllinien gemeinsam. Aufgrund geringer Probenumfänge einzelner PD bzw. Altersgruppen im Seneszenz-Experiment, wurden die Stabilität der Modellparameter und die Vorhersage mittels k -facher Kreuzvalidierung bestimmt. Für diese Untersuchung erfolgte eine fünffache Kreuzvalidierung mit 100 Iterationen von jungen und seneszenten Zellen, bei der jeweils genau eine PD ausgelassen wurde. Die PD wurden in Relation zu den Messtagen gesetzt. Ebenfalls wurde für die Seneszenz-Untersuchung, aber auch für die Quieszenz in 2D-3D-Umgebungen, eine *leave-one-out*-Kreuzvalidierung durchgeführt. Hierfür wurden Daten aufgrund des begrenzten Probenumfangs gemischt. Jeweils die Hälfte der jungen und seneszenten Zell-Spektren wurde gemittelt. Anhand dieser Probenaufteilung erfolgten das Training und die Modell-Vorhersage. Für Quieszenz in 2D-3D-Umgebungen erfolgten Vorhersagen aus je einem Drittel Testdaten und zwei Drittel Trainingsdaten. Die Quieszenz-Daten wurden mittels zehnfacher Kreuzvalidierung mit insgesamt 100 Iterationen für die jeweiligen Fragestellungen (Zellzustände, Kultivierungsdauer, zurückgeführte Zellen und Art der quieszenten Induktion) validiert. Zusätzlich wurden Daten zurückgeführter Zellen und zur Art der quieszenten Induktion mittels *leave-one-out*-Kreuzvalidierungen mit 100 Iterationen vorhergesagt. ROC-Kurven wurden mit Hilfe des R-Pakets „ROCR“¹⁵¹ auf Grundlage der drei Raman- und zwei FT-IR-Batches quieszenter Proben kalkuliert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Unterscheidung der Proliferation und replikativen Seneszenz in primären Fibroblast-Zelllinien

Der Übergang in die zelluläre Seneszenz wurde an vier verschiedenen Fibroblast-Zelllinien untersucht und durch SA β -Gal-Färbung und Schwingungsspektroskopie identifiziert.

3.1.1 Wachstumsverhalten und Beobachtung der zellulären Seneszenz in Fibroblastzellen

Bei den vier verschiedenen Fibroblast-Zelllinien BJ, IMR-90, MRC-5 und WI-38 wurde der Übergang in die zelluläre Seneszenz über die Wachstumskurven und die SA β -Gal-Färbungen, die mit DAPI-Färbungen zur Detektion der Nuklei gekoppelt waren, erfasst. Das Wachstum der Zellen wurde durch Auftragen der Kultivierungsdauer in Tagen gegen die PD verfolgt. Zu Beginn der Kultivierung starteten alle Zellen mit einer PD von ca. 30 und diese proliferierenden Zellen wiesen ein exponentielles Wachstum auf. Ein linearer Anstieg der PD gegen die Tage konnte dabei beobachtet werden. In dieser Phase waren alle Zellen SA β -Gal-negativ. Der Seneszenz-bedingte Zellzyklusarrest, induziert durch replikative Erschöpfung, trat bei IMR-90- und WI-38-Zellen zwischen 53 und 56 PD ein, während MRC-5- und BJ-Zellen bei einem PD von ca. 72 arretierten. Diese Beobachtungen wurden durch frühere Untersuchungen zur replikativ induzierten Seneszenz, welche mittels SA β -Gal-Färbungen und RNA-Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden analysiert wurden, bestätigt^{90,91}.

Als Seneszenz-Marker für diese Zelllinien diene die relative Anzahl der SA β -Gal-positiv gefärbten Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. In IMR-90-Zellen mit niedrigem PD (ca. 32 PD) war dieser Marker bereits um das zweifache erhöht, im Vergleich zu den anderen Zelllinien. In BJ-Zellen wurden SA β -Gal-positive Zellen in höheren PD (ab ca. 42 PD) detektiert. WI-38- und MRC-5-Zellen konnten zwischen IMR-90- und BJ-Zellen hinsichtlich SA β -Gal-positiv gefärbter Zellen eingeordnet werden, in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten⁹¹. Als zusätzlicher seneszenten Marker nach Langzeitkultivierung von Fibroblastzellen dienten signifikante morphologische Veränderungen der Form und Größe, die mit einem Lichtmikroskop beobachtet wurden. Im Vergleich zu jungen proliferierenden Zellen, die v. a. klein und spindelförmig waren, vergrößerten sich Zellen mit hohen PD um mehr als die Hälfte unter Verlust der Spindelform. Gleichzeitig nahm die Anzahl der Nuklei in den Zellen zu (polyenergetische Zellen).

Die Zellen wurden in Abhängigkeit ihrer SA β -Gal-Positivfärbung und der Wachstumskurven in drei Altersgruppen eingeteilt: jung, mittelalt und seneszent (siehe Seneszenz Tabelle 3 und Tabelle 4). Der jungen Altersgruppe wurden Zellen mit einer PD von ≤ 38 zugeordnet. Die Wachstumsraten wiesen in diesem Bereich einen linearen Anstieg auf und SA β -Gal-positiv gefärbte Zellen wurden mit einem Anteil von $\leq 10\%$

an der Gesamtzellzahl ermittelt (siehe Abbildung 9). Mittelalte Zellen, in Abhängigkeit der Zelllinien, wurden mit einem PD zwischen 41 und 47 bzw. 64 zusammengefasst. In dieser Gruppe waren deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien BJ und MRC-5 gegenüber IMR-90 und WI-38 zu erkennen, was v. a. in den Wachstumskurven ab einer PD von ca. 42 deutlich wurde. Unterschiedlich lange PD charakterisierten sich als herausragendes Merkmal und stellten einen wesentlichen Unterschied zwischen den Zelllinien dar. Unklar bleibt die Ursache für die unterschiedlich langen PD. Mittelalte Zellen wiesen ein langsames Wachstum und eine Verdopplung des Anteils an SA β -Gal-positiv gefärbten Zellen gegenüber den als jung charakterisierten Zellen auf. Werte von 10 bis ca. 40 % für IMR-90 und WI-38 bzw. ca. 60 % für BJ und MRC-5 wurden erreicht.

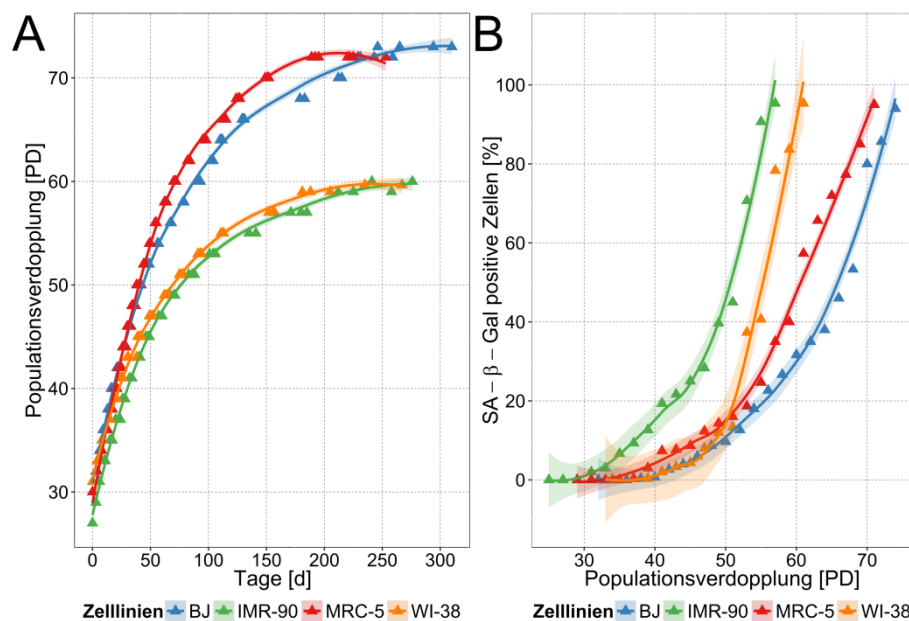


Abbildung 9: Wachstumskurven und SA β -Gal-Färbungen von Fibroblast-Zelllinien.

Die Tage gegen die PD sind für die Wachstumskurven (A) der untersuchten Zelllinien aufgetragen. Die dreimal gemessenen Werte für jede Kurve und die Mittelwerte sind aufgetragen, wobei der Messfehler für alle Zelllinien ca. $\pm 1,5$ PD beträgt. Der prozentuale Anteil an SA β -Gal-positiv gefärbten Zellen (B) ist im Vergleich zu den gezählten PD für die vier Zelllinien angegeben und spiegelt den Übergang in die Seneszenz wider. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Einzelmessung und der experimentelle Fehler aller Messwerte beträgt für die Zelllinien ca. ± 7 %. Daten wurden teilweise publiziert ⁹¹.

BJ- und MRC-5-Zellen ab einer PD ≥ 62 und IMR-90- und WI-38-Zellen ≥ 46 wurden als seneszent eingruppiert. Die zunehmende Stagnation der Proliferation wurde als limitiertes Wachstum mit einer anschließenden abflachenden Phase in den Wachstumskurven sichtbar. SA β -Gal-positiv gefärbte Zellen traten in dieser Phase mit relativen Häufigkeiten von > 10 % für IMR-90-Zellen und > 20 % für WI-38-Zellen bzw. > 35 % für BJ-Zellen und > 60 % für MRC-5-Zellen auf, bis annähernd 100 % in der jeweiligen Endphase der Seneszenz. Eine eindeutige und deutliche Eingruppierung der drei Altersgruppen über die PD, Größenzunahmen und SA β -Gal-Färbungen waren nicht möglich, da der Übergang in die Seneszenz fließend war. Besonders die als mittelalt und seneszent eingruppierten Zellen wiesen einen zunehmenden prozentualen

Anteil seneszenten Zellen auf, was eine Eingruppierung erschwerte. In diesen beiden Gruppen können individuelle Zellen zudem weiterhin proliferieren ohne seneszent zu sein bzw. seneszente Zellen werden nicht als solche über die SA β -Gal-Färbung detektiert: Durch Anreicherung von β -Galaktosidase können Zellen SA β -Gal-positiv gefärbt sein, ohne wiederum selbst den seneszenten Zustand erreicht zu haben. Aufgrund der Schwierigkeiten mit biologischen Markern und den bereits erwähnten Nachteilen dieser für die Detektion (siehe Kapitel 1.2.4), wurden die untersuchten Zellen mittels markierungs- und zerstörungsfreier Schwingungsspektroskopie untersucht.

3.1.2 Charakterisierung der Seneszenz mittels Raman-Spektroskopie

Zur morphologischen Überprüfung der Zellen unter einem Lichtmikroskop wurden die vier Fibroblast-Zelllinien mittels bildgebender RS erforscht. Nach Fixierung wurden die Zellen über ein definiertes Raster vermessen, das den Größen der Zelle angepasst wurde. Insgesamt wurden 263 Zellen untersucht. Erhaltene spektrale Informationen wurden mit den phänotypischen und biochemischen Veränderungen sowie den molekularen Zusammensetzungen der individuellen Zellen während des Übergangs von der Proliferation in die replikativ-induzierte Seneszenz assoziiert. Die Zellspektren an den einzelnen Messpunkten wurden mit einer Schrittweite von $0,5 \mu\text{m}$ gemessen. Um möglichst große und repräsentative Datenmengen zu ermitteln, trotz der abgeflachten und vergrößerten Zellmorphologie seneszenten Zellen, wurden kurze Integrationszeiten zur spektralen Aufnahme verwendet. Dies führte allerdings zu einem niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis. Anhand der Raman-Bilder von Zellen wurden die morphologischen Veränderungen infolge des Übergangs in die Seneszenz deutlich (siehe Abbildung 10). Als ein Beispiel verdeutlichen junge proliferierende gegen eine seneszente BJ-Zelle diese Veränderungen: eine sichtbare Größenzunahme und Verlängerung, die tropfenförmige Ansammlung von Lipiden im Zytoplasma und das Vorhandensein mehrerer Nuklei (siehe Abbildung 10B).

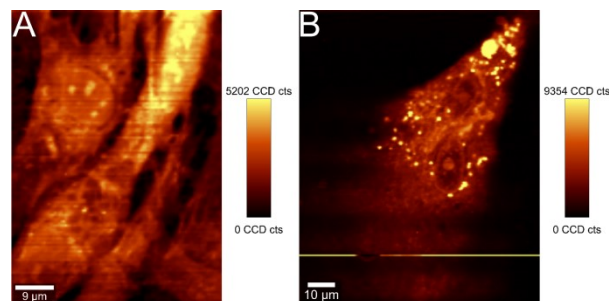


Abbildung 10: Raman-Bilder junger proliferierender Fibroblastzellen und einer seneszenten Zelle. Die Bildgebung basiert auf der Intensität der CH-Streckschwingung von $2800\text{--}3020 \text{ cm}^{-1}$. Beispielhafte Darstellung von jungen BJ-Zellen (PD 28; A) und einer seneszenten BJ-Zelle (PD 70; B).

Die gemittelten Raman-Spektren der vier Zelllinien zeigten typische spektrale Merkmale menschlicher Fibroblastzellen (siehe Abbildung 11). Wesentliche Raman-Banden im spektralen Bereich von $500\text{--}1800$ und $2800\text{--}3020 \text{ cm}^{-1}$ konnten den

Hauptbestandteilen der Zelle zugeordnet werden. Diese sind Proteine, Lipide und Nucleinsäuren, aber auch Kohlenhydrate, die aber innerhalb dieser Untersuchung von geringer Bedeutung waren. Die Zuordnung der Raman-Banden individueller Zellen wurde in der Literatur ausführlich beschrieben¹⁵². Einen Überblick über die auffälligsten spektralen Banden und deren Zuordnungen für die hier untersuchten Fibroblastzellen liefert Tabelle 5.

Tabelle 5: Ausgewählte Raman-Banden untersuchter Fibroblastzellen.
Zuordnung und biomolekulare Klassifikation basiert auf¹⁵².

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Banden-Zuordnung	Biomolekulare Klassifikation
3008	=CH-Streckschwingung	Lipide
2876 – 2940	CH-Streckschwingung	Proteine
2930	CH ₃ -symmetrische Streckschwingung	Lipide
2888	CH ₂ -Streckschwingung	Lipide
2850	CH ₂ -Streckschwingung	Lipide
1732	C=O	Lipide
1658	Amid I mit C=O-Streckschwingungen	Proteine
	C=C-Streckschwingung	Lipide
1580	Guanin, Adenin	Nucleinsäuren, DNA, RNA
1446	CH ₂ -Deformationsschwingung	Proteine
	CH ₂ -Biege- und Deformationsschwingung	Lipide
1338	Amid III und andere CH- Deformationsschwingungen	Proteine
1302	CH ₂ -twisting und -wagging Deformationsschwingungen	Proteine, Lipide
1254	Amid III und andere CH- Deformationsschwingungen	Proteine
	=CH-Deformationsschwingung	Lipide
1244	Adenin	Nucleinsäuren, DNA, RNA
1128	CN-Streckschwingung	Proteine
1090	PO ₂ ⁻ -Streckschwingung	Nucleinsäuren, DNA, RNA
1004	Phenylalanin	Proteine
724 und 786	PO ₂ ⁻ , Cytosin, Thymin, Uracil	Nucleinsäuren, DNA, RNA

Die dargestellten gemittelten Raman-Spektren aller Fibroblastzellen für die Altersgruppen jung, mittelalt und seneszent zeigten erhebliche Übereinstimmungen bezüglich biochemischer Zusammensetzungen in diesen Gruppen (siehe Abbildung 11A). Trotzdem wurden kleinere aber reproduzierbare Veränderungen wahrgenommen. Diese spiegeln kleinste Veränderungen in der biochemischen Gesamtzusammensetzung wider, welche mit Unterschieden im Metabolismus von jungen gegen alternde Zellen assoziiert wurden. Festgestellt wurde, dass Nucleinsäuren (1580 cm⁻¹) und Proteine (1658 cm⁻¹) in alternden Fibroblastzellen geringfügig herunterreguliert und Lipide (1732, 2850 und 2930 cm⁻¹) leicht hochreguliert wurden.

Demgegenüber wiesen die Spektren für die vier verschiedenen Zelllinien, welche über die Altersgruppen gemittelt wurden, beträchtliche Ähnlichkeiten untereinander auf (siehe Abbildung 11B). Dies wies auf gemeinsame biochemische Zusammensetzungen hin. Trotzdem konnten kleine aber reproduzierbare spektrale Änderungen zwischen den Zelllinien beobachtet werden.

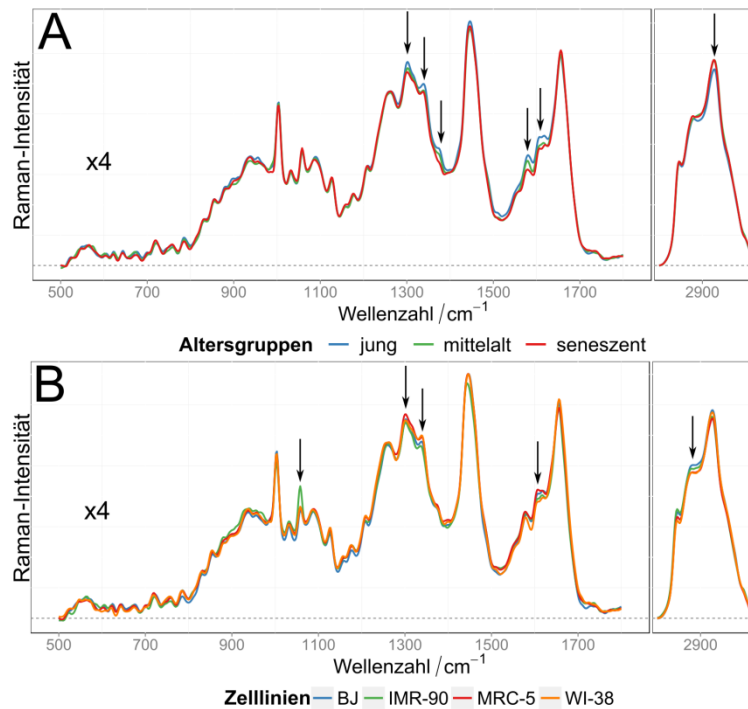


Abbildung 11: Raman-Mittelwertspektren zu den Altersgruppen und Fibroblast-Zelllinien.

Die gemittelten Einzelspektren aller Fibroblastzellen sind für die drei verschiedenen Altersgruppen (A) jung, mittelalt und seneszent dargestellt. Unabhängig der Altersgruppen sind Unterschiede zwischen den vier Fibroblast-Zelllinien (B) BJ, IMR-90, MRC-5 und WI-38 sichtbar. Pfeile visualisieren kleine spektrale Unterschiede im Übergang in die Seneszenz und zwischen den verschiedenen Zelllinien. Zur besseren Veranschaulichung ist der Spektralbereich von 500–1800 cm^{-1} um den Faktor vier erhöht.

Diese geringen aber signifikanten Unterschiede der spektralen Bandenpositionen und der Intensitäten wurden durch die Verwendung von chemometrischen Methoden in der Datenanalyse erkannt. Für die Klassifizierung mittels PLS-LDA wurden die einzelnen Mittelwertspektren aller 263 individuellen Fibroblastzellen verwendet. Die ersten vier PLS-Komponenten beschrieben 86 % der spektralen Varianz der Spektren. Ergänzend dazu bestätigten ermittelte Differenzspektren zwischen jungen und alten Fibroblastzellen bzw. den Zelllinien die analysierten Unterschiede (siehe Abbildung 12).

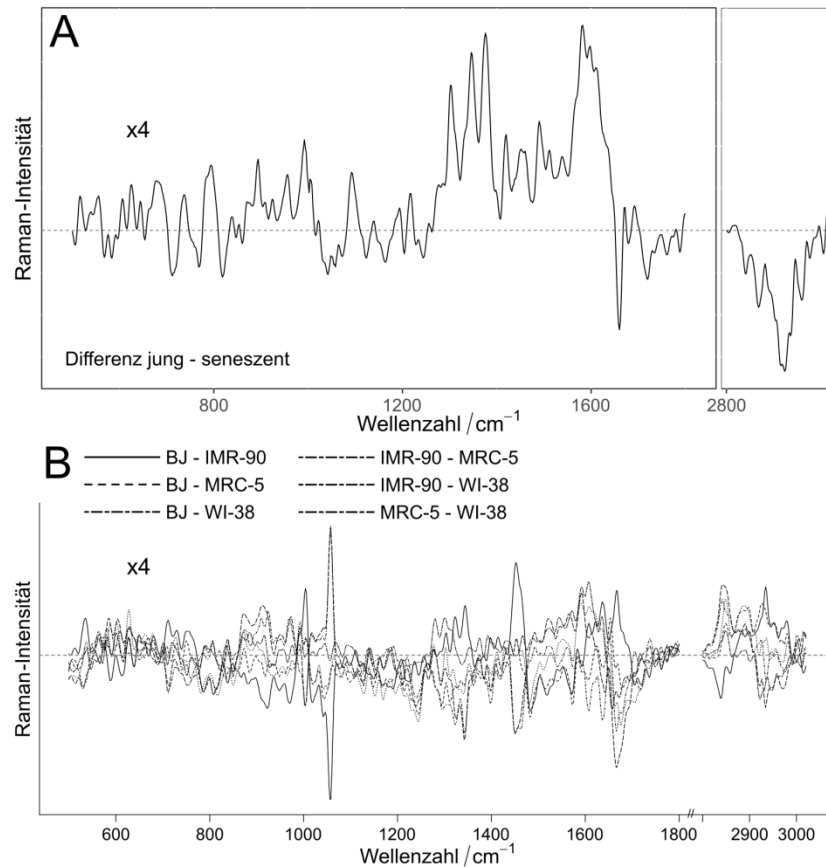


Abbildung 12: Differenzspektren der mit RS untersuchten Altersgruppen und Fibroblastzellen. Ermittelte Differenzspektren aller analysierten Zellen, dargestellt für junge gegen seneszente Zellen (A) und verschiedene Fibroblast-Zelllinien (B). Zur besseren Veranschaulichung ist der Spektralbereich von 500–1800 cm^{-1} um den Faktor vier erhöht.

Innerhalb der einzelnen Zelllinien konnten durch graphische Darstellung der *scores* der ersten PLS-linearen Diskriminante (PLS-LD1) gegen die zweite PLS-lineare Diskriminante (PLS-LD2) die Altersgruppen jung, mittelalt und seneszent separiert werden (siehe Abbildung 13). Trotz der unterschiedlichen Gruppierung der Altersgruppen im Streudiagramm wurden für alle vier Fibroblast-Zelllinien Trennungen zwischen jungen und seneszenten Zellen bereits mit der PLS-LD1 erzielt. Die PLS-LD2 separiert v. a. die mittelalten Zellen gegenüber den jungen und seneszenten Zellen. Besonders innerhalb der BJ- und WI-38-Zellen wurden einige Überschneidungen zwischen den einzelnen Altersgruppen beobachtet. Dies betrifft hauptsächlich die Zellen mit den PD, die sich in den Übergangsphasen zwischen jungen und seneszenten Zellen befanden (BJ PD 36 und 64 und WI-38 PD 41). Diese Heterogenität lässt Unterschiede in der temporären Reaktion der einzelnen Zellen beim Übergang in die Seneszenz erkennen. Dies wird durch frühere Beobachtungen unterstützt⁹⁰.

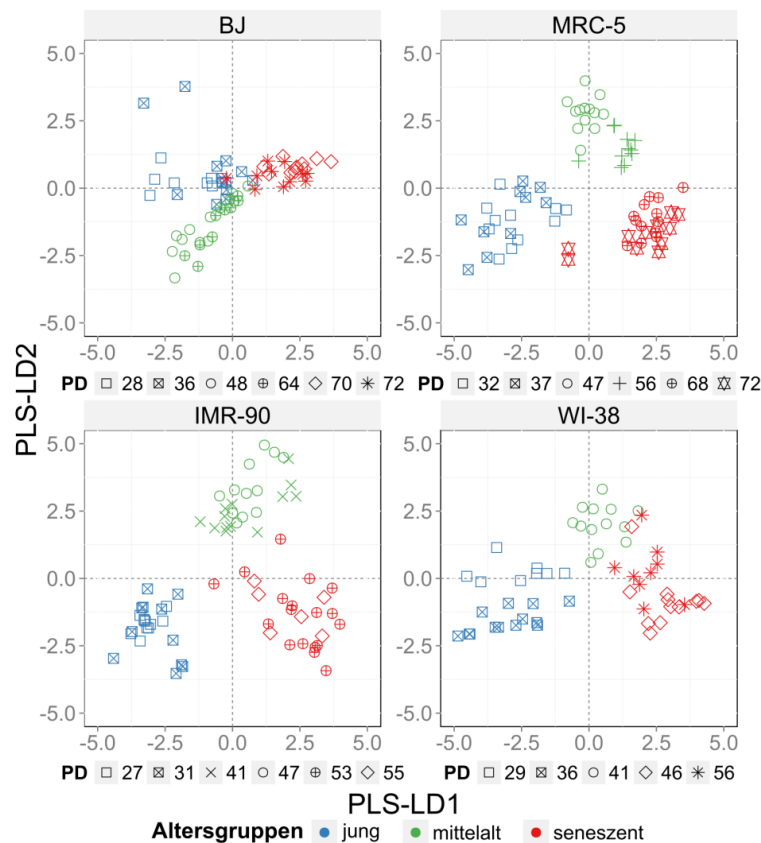


Abbildung 13: RS-Klassifikation einzelner Zelllinien anhand ihrer Altersgruppierung.

Für jede Zelllinie einzeln aufgetragene PLS-LD1 gegen PLS-LD2. Die drei Altersgruppen sind farblich geordnet (jung - blau, mittellalt - grün und seneszent – rot). Individuell untersuchte PD der jeweiligen Zelllinie BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38 sind durch Symbole unterhalb der Streudiagramme dargestellt.

Die Koeffizienten der PLS-LD1 und PLS-LD2 spiegeln die spektralen Eigenschaften wider, die mit der Unterscheidung der Altersgruppen innerhalb der einzelnen Zelllinien einhergehen (siehe Abbildung 14). Durch Auswertung der Banden-Intensitäten und -Positionen können Aussagen über die relative Konzentration oder Zusammensetzung gemacht werden. In allen Spektralbereichen der vier verschiedenen Zelllinien wurden deutliche Unterschiede gefunden. Zwischen 2800–3100 cm^{-1} wiesen die CH-Streckschwingung entweder auf Veränderungen in der Zusammensetzung von Proteinen oder von Lipiden hin. Die maximale spektrale Raman-Intensität von Proteinen ist normalerweise um 2930 cm^{-1} zentriert, während das Maximum von Lipide geringfügig unterhalb dieser Intensität liegt (um 2850 cm^{-1}). In den Koeffizienten der vier Zelllinien wurden innerhalb der Spektralbereiche Unterschiede mit dem Fortschreiten der Seneszenz assoziiert. Intensitätsänderungen wurden eher den veränderten Häufigkeiten der Moleküle zugeschrieben. Verschiebungen der Intensitätsmaxima wurden hingegen geänderten Zusammensetzungen v. a. in Proteinen und Lipiden zugeschrieben, welche in jungen gegen seneszente Zellen sichtbar wurden. Die Amid I-Bande im Raman-Spektrum ist besonders empfindlich gegenüber Konformationsänderungen von Proteinen, desgleichen gilt für das FT-IR-Spektrum. Obwohl keine eindeutige Bestimmung von individuellen Proteinen oder Proteinfamilien unter Berücksichtigung der gesamten Häufigkeit erfolgte, wurden Abweichungen

aufgrund von Konformationsänderungen in den Strukturproteinen angenommen. Weiterhin wurden spektrale Unterschiede in der ausgeprägten Amid III-Bande zwischen 1200 und 1350 cm^{-1} deutlich. Auch im Spektralbereich kleiner 1200 cm^{-1} wurden wesentliche Veränderungen für die vier Fibroblast-Zelllinien sichtbar, die aber nicht konsistent in allen Zelllinien waren. Dieser Bereich ist indikativ für Kohlenhydrate, Polyphosphate und kleinere Moleküle, wie z. B. Nukleinsäuren.

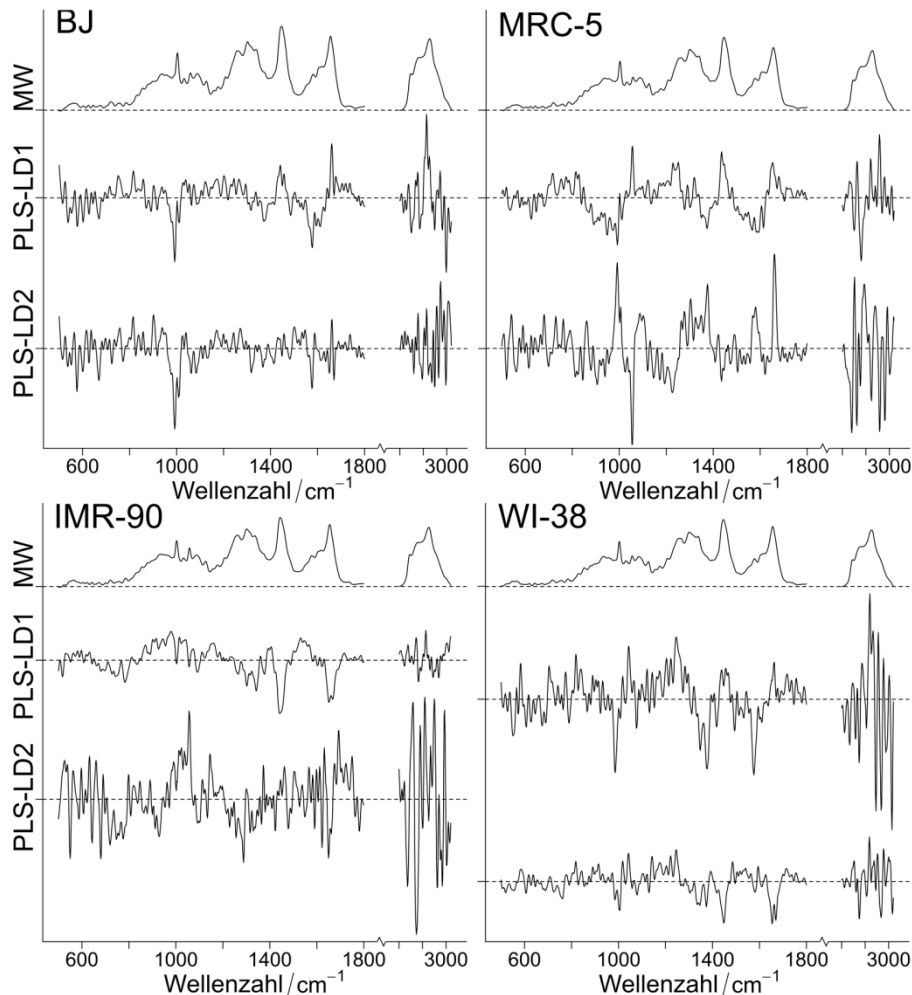


Abbildung 14: Raman-Mittelwertspektren und Koeffizienten nach Klassifikation der Altersgruppen. Dargestellte Mittelwertspektren („MW“, oben) und die auf die drei Altersgruppen berechneten PLS-LD1- (mittig) und PLS-LD2-Koeffizienten (unten), separat für die jeweiligen Zelllinien BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38. Zur besseren Visualisierung ist der Spektralbereich der Mittelwertspektren von 500–1800 cm^{-1} um den Faktor vier erhöht.

Innerhalb der Koeffizienten der Diskriminanzfunktion von BJ-, MRC-5- und WI-38-Zellen wurden auffällige spektrale Intensitäten um 990 cm^{-1} sichtbar, während diese für IMR-90-Zellen nicht vorhanden waren. Diese Bande wurde Proteinen zugeordnet. Innerhalb der MRC-5-Zelllinie wurde dieses spektrale Merkmal ebenfalls beobachtet, zusammen mit einem Extremum um 1056 cm^{-1} . Koeffizienten der IMR-90-Zellen enthielten in dieser Region keine auffälligen spektralen Merkmale. Im Vergleich mit allen anderen Zelllinien wiesen IMR-90-Zellen im gesamten Wellenzahlbereich die geringsten charakteristischen Merkmale innerhalb der Koeffizienten auf. Generell ähnelten keine der beobachteten Veränderungen bekannten Strukturen in der Region

kleiner 1200 cm^{-1} , wie z. B. von Kohlenhydraten, Polyphosphaten oder kleineren Molekülen.

Die PLS-LDA wurde neben der Verwendung als Klassifikationsmodell zur Validierung verwendet, um die *scores* in den Datenraum zu projizieren und anschließend eine Vorhersage zu den wahrscheinlichen Klassenzugehörigkeiten zu treffen. Das resultierende Klassifikationsmodell wurde innerhalb der einzelnen Zelllinien für die Altersgruppen getestet. Die Sensitivität und Spezifität richtig zugeordneter seneszenter Zellen (siehe Tabelle 6) betrug jeweils für BJ-Zellen 95 %, für MRC-5-Zellen 94 und 98 %, für IMR-90-Zellen 90 und 99 % und für WI-38-Zellen 89 und 99 %. Die Genauigkeit, seneszente Zellen innerhalb der vier Zelllinien als seneszent zu detektieren, betrug mehr als 90 %.

Tabelle 6: Kreuzvalidierung zu den Altersgruppen in den einzelnen Zelllinien.

Angegebene Werte beziehen sich auf richtig zugeordnete seneszente Zellen nach Klassifikation der Raman-Spektren. Berechnet anhand einer fünffachen Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen.

Zelllinien	Sensitivität				Spezifität				Genauigkeit			
	BJ	MRC-5	IMR-90	WI-38	BJ	MRC-5	IMR-90	WI-38	BJ	MRC-5	IMR-90	WI-38
[%]	95	94	90	89	95	98	99	99	90	96	96	94

Zwecks weiterer Erforschung des spektralen Kontrasts zwischen jungen und seneszenten Zellen wurde eine *leave-one-PD-out* Validierung für diese zwei Altersgruppen durchgeführt. Die mittelalten Zellen wurden dabei aufgrund der Überlagerungen mit jungen und seneszenten Zellen während des Übergangs in die Seneszenz nicht berücksichtigt. Die *scores* der PLS-LDA für die Test- und Trainings-Daten wurden über Wahrscheinlichkeitsdichten abgebildet (siehe Abbildung 15). Im Vergleich der individuellen Zelllinien wurden minimale Unterschiede in der Vorhersage von jungen und seneszenten Zellen für die Test- und Trainings-Daten ermittelt. Eine deutliche Trennung zwischen den zwei Altersgruppen wurde besonders innerhalb der BJ-Zellen sichtbar. Größere Überlagerungen der Altersgruppen wurden für MRC-5- und WI-38-Zellen erkannt, v. a. aber innerhalb der Trainingsdaten der IMR-90-Zellen. Die insgesamt 16 Kombinationen aus allen Zelllinien sowie den jungen und seneszent eingeteilten Zellen wurden als Koeffizienten der PLS-LDA dargestellt (siehe Abbildung 15B).

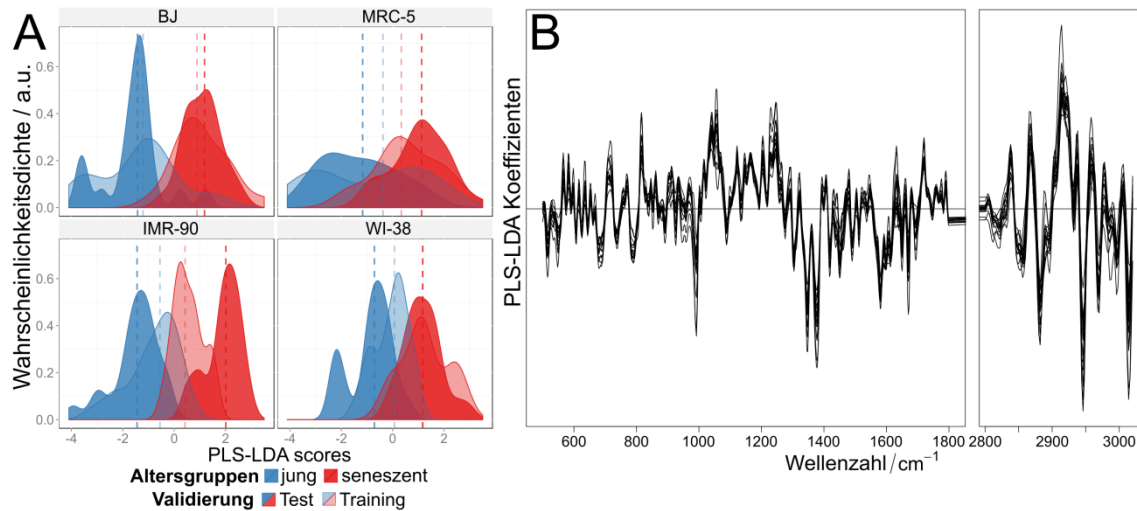


Abbildung 15: Vorhersage von Raman-spektroskopisch untersuchten jungen und seneszenten Zellen. Anhand einer *leave-one-PD-out*-Kreuzvalidierung dargestellte Wahrscheinlichkeitsdichten der *scores* der PLS-LDA (A). Für jede Zelllinie zur besseren Visualisierung einzeln abgebildet. Test (intensive Farbe) und Training (blasse Farbe) der jungen (blau) und seneszenten Zellen (rot). Gestrichelte vertikale Linien zeigen den Median der jeweiligen Wahrscheinlichkeitsdichte an. Aufgetragene PLS-LDA-Koeffizienten (B) anhand des Trainings.

Getestet wurden 15 verschiedene Kombinationen (aus Altersgruppen und Zelllinien) und mit der jeweils 16ten wurde trainiert, welche abgebildet wurde. Im Vergleich zur Berechnungen der PLS-LDA für alle Zelllinien zusammen, wurden schwache Banden während der Vorhersagen verstärkt und spektrale Unterschiede wurden im unteren Wellenzahlbereich deutlicher, insbesondere zwischen 900 und 1300 cm^{-1} .

Vorhersagen junger und seneszenter Zellen, aus allen Zelllinien zusammen, erfolgten innerhalb des Klassifikationsmodells durch eine *leave-one-PD-out*-Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen. Die Gesamtgenauigkeit lag bei 75 % (siehe Tabelle 7). Missklassifikationen aufgrund von älteren „jungen“ und die jungen „seneszenten“ Zellen beeinflussten die Validierung geringfügig. Insgesamt wurden seneszente Zellen mit einer Sensitivität von 93 % und einer Spezifität von 90 % vorhergesagt. Folglich wurden Raman-Spektren seneszenter Zellen von jungen proliferierenden Zellen mit einer hohen Zuverlässigkeit unterschieden.

Tabelle 7: Kreuzvalidierung und Vorhersage aller RS untersuchten seneszenten Zelllinien. Werte beziehen sich auf richtig zugeordnete seneszente Zellen. Berechnung erfolgte anhand einer gepoolten *leave-one-PD-out*-Kreuzvalidierung ohne mittelalte Zellen.

[%]	Kreuzvalidierung			Vorhersage		
	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit
	80	69	75	93	90	92

Um einen Einfluss der Fibroblast-Zelllinien auf die Spektren-basierte Klassifikation bezüglich der Altersgruppen auszuschließen, wurde das PLS-LDA-Klassifikationsmodell mit allen vermessenen Zellen der unterschiedlichen Zelllinien gleichzeitig als ein Datensatz berechnet. Im Unterschied zu den deutlichen altersassozierten spektralen Veränderungen innerhalb der einzeln analysierten

Zelllinien wurden junge, mittelalte und seneszente Altersgruppen weniger ausgeprägte gruppiert (siehe Abbildung 16).

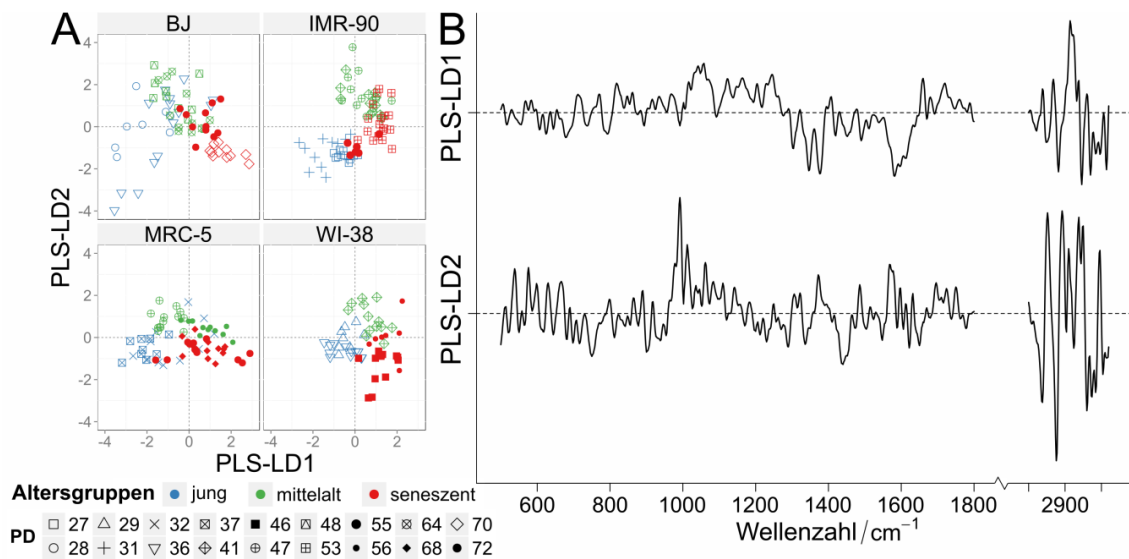


Abbildung 16: Klassifikation der Altersgruppen aller Zelllinien als ein gemeinsamer Datensatz.

Im Streudiagramm (A) dargestellte PLS-LD1 gegen PLS-LD2, Klassifikation der Altersgruppen nach Raman-spektroskopischer Untersuchung. Farbliche Ordnung der Altersgruppen: jung (blau), mittelalt (grün) und seneszent (rot). Durch Symbole dargestellte individuelle PD. Zur besseren Visualisierung der Klassifikation wurde jede Fibroblast-Zelllinie einzeln gezeigt, trotz gemeinsamer Berechnung aller Zelllinien. Aufgetragene Koeffizienten (B) der PLS-LD1 (oben) und PLS-LD2 (unten).

Dennoch konnten allgemeine molekulare Veränderungen während des seneszenten Prozesses für alle Zelllinien gleichermaßen ermittelt werden. Verglichen mit den separaten Berechnungen für jede einzelne Zelllinie, wurden spektrale Unterschiede in den Koeffizienten der PLS-LD1 bei 1122 und 1164 cm⁻¹ während der gemeinsamen Berechnung ermittelt. Diese wurden Proteinen zugeordnet. Auch bei 1720 und 2970 cm⁻¹ wurden Unterschiede beobachtet, welche auf Lipide bezogen wurden. Insgesamt bestätigten diese Daten den seneszenten Trend, wie bei der separaten Klassifikation einzelner Zelllinien auch, da die meisten und dominantesten Banden übereinstimmten (siehe Anhang Tabelle 19).

Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien wurden einzeln für die jeweiligen Altersgruppen ermittelt und spektrale Unterschiede wurden innerhalb der PLS-LD1 und PLS-LD2 beobachtet (siehe Anhang Abbildung 46). BJ- und IMR-90-Zellen wurden in allen Altersgruppen durch die PLS-LD1 deutlich voneinander getrennt. Für MRC-5- und WI-38-Zellen wurden große Überlagerungen beobachtet. Diese Zelllinien wurden ebenfalls mit kleineren Überlagerungen von den Zelllinien BJ und IMR-90 separiert. Innerhalb der mittelalten Altersgruppe wurden die deutlichsten Unterschiede im Vergleich zu den anderen Altersgruppen beobachtet. Dies lässt eine molekulare Varianz im Verhalten einzelner Zelllinien während des Übergangs in die Seneszenz erkennen. Insgesamt verursachten minimale spektrale Unterschiede innerhalb der Koeffizienten die Unterschiede zwischen den Zelllinien, was auf einige wenige Abweichungen in der biochemischen Zusammensetzung hindeutete (siehe Anhang Abbildung 47). Deutliche Raman-Banden innerhalb des unteren Wellenzahlbereichs

wurden in allen PLS-LD1 Koeffizienten für Nukleinsäuren (1056, 1484 und 1574 cm^{-1}), Proteinen (1012 cm^{-1} , 1656–1672 cm^{-1} für Amid I) und Lipiden (1056, 1440, 1656 und 1668 cm^{-1}) ermittelt. Folglich konnten durch RS geringfügige biomolekulare Unterschiede in der Häufigkeit und Zusammensetzung zwischen den vier humanen Fibroblast-Zelllinien festgestellt werden. Beim Übergang dieser Zelllinien in die Seneszenz wurden molekulare Veränderungen, durch z. B. Protein-Rückfaltung und Modifikation, hervorgerufen. Nur in geringem Maße wurden Änderungen zur molekularen Häufigkeit ermittelt.

3.1.3 Charakterisierung der Seneszenz mittels FT-IR-Spektroskopie

Der Übergang in die Seneszenz wurde neben der bildgebenden RS mit FT-IR-Spektroskopie für die gleichen vier Fibroblast-Zelllinien untersucht. Um dominante Banden von Wasser und Wasserdampf im IR-Spektrum zu vermeiden, wurden die fixierten Zellen auf den Objektträgern getrocknet. Dies verhinderte jedoch anschließende Untersuchungen dieser Proben. Im Vergleich zur RS erfolgte die Datengewinnung für diese Analysen schneller, da Spektren mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis bei geringen Belichtungszeiten aufgenommen wurden. Wichtige FT-IR-Banden sind in Tabelle 8 zusammengefasst¹⁵³.

Tabelle 8: Ausgewählte FT-IR-Banden untersuchter Fibroblastzellen.
Zuordnung und biomolekulare Klassifikation basiert auf¹⁵³.

Absorbanz [cm^{-1}]	Banden-Zuordnung	Biomolekulare Klassifikation
2800 - 3100	symmetrische und asymmetrische CH_2 und CH_3 -Streckschwingung	Lipide (Phospholipide)
1724 und 1736	C=O- und CH-Streckschwingung	Nukleinsäuren, Lipide (Phospholipide), Proteine
1652 und 1656	Amid I, α -Strukturen	Proteine
1640	Amid I, β -Strukturen	Proteine
1548	Amid II	Proteine
1400	symmetrische C=O-Streckschwingung	Lipide
1252 und 1312	Amid III	Proteine
900 – 1200	symmetrische P=O-Streckschwingung, C-O-C- und C-O-Ringschwingungen	Nukleinsäuren, Phosphatester, Kohlenhydrate

Das FT-IR-Mikroskop ermöglicht zur Gewinnung der Spektren eine geeignete Positionierung der Apertur um die zu untersuchenden Zellen. Zudem konnten die Zellen mikroskopisch visuell überprüft werden. Morphologische Änderungen während des Übergangs in die Seneszenz wurden beobachtet. Beispielhaft wurde die Vergrößerung des Zytoplasmas von seneszenten BJ-Zellen gezeigt (siehe Anhang Abbildung 48).

Im Vergleich zu den Raman-Untersuchungen wurden typische FT-IR-Spektren von der gesamten Zelle als Mittelwertspektren während einer Messreihe erfasst. Dies geschah durch eine geeignete Größen-Einstellung der Apertur, die für alle vermessenen Zellen – unabhängig der Zellgröße – in etwa beibehalten wurde. Effekte, die durch Mie-

Streuung hervorgerufen werden, wurden aufgrund der eher flachen, langgestreckten, spindelförmigen und anhaftenden Zellmorphologie der Fibroblastzellen nicht beobachtet. Im Vergleich dazu, trat Mie-Streuung bei kugelförmigen Zellen auf¹⁷. Die Mittelwertspektren aller Fibroblast-Zelllinien wurden für die einzelnen Altersgruppen dargestellt (siehe Abbildung 17A). Geringfügige, aber reproduzierbare spektrale Änderungen, wurden für junge, mittelalte und seneszente Gruppen beobachtet. Im Vergleich zum Raman-Datensatz fallen die FT-IR-spektroskopisch detektierbaren Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung der Zellen beim Übergang in die Seneszenz geringer aus.

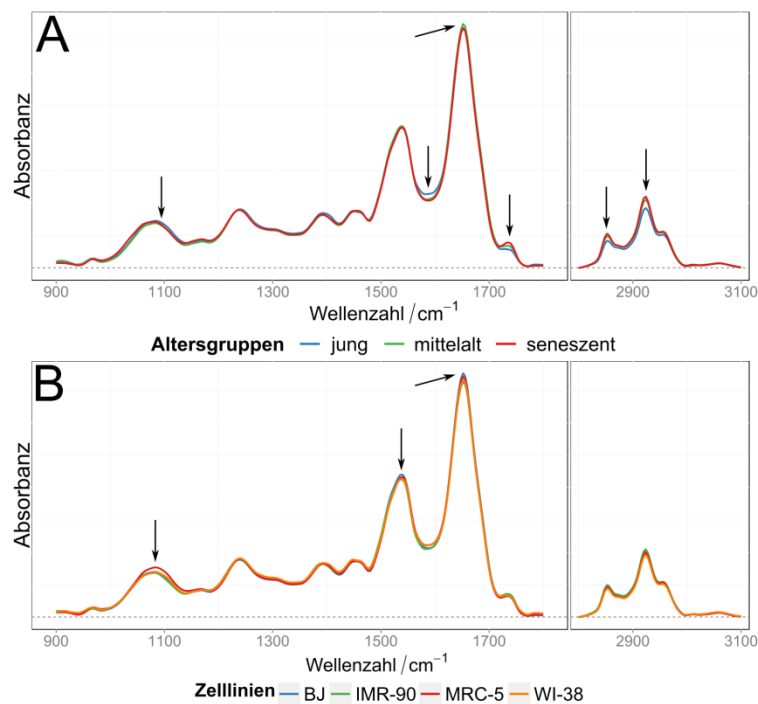


Abbildung 17: FT-IR-Mittelwertspektren der Altersgruppen und untersuchten Zelllinien.

Gemittelte und dargestellte Einzelspektren aller Fibroblastzellen für die drei verschiedenen Altersgruppen (A) jung, mittelalt und seneszent. Unabhängig der Altersgruppen sind Unterschiede zwischen den vier Fibroblast-Zelllinien (B) BJ, IMR-90, MRC-5 und WI-38 sichtbar. Pfeile visualisieren kleine spektrale Unterschiede im Übergang in die Seneszenz und zwischen den verschiedenen Zelllinien.

Quantitativ betrachtet waren die drei FT-IR-Mittelwertspektren sehr ähnlich zueinander. Dies deutete auf hohe Übereinstimmungen in der makromolekularen Zusammensetzung der drei Altersgruppen hin. Dennoch wurden geringe, jedoch reproduzierbare spektrale Änderungen beobachtet, die auf einen geänderten Metabolismus von jungen proliferierenden Zellen gegenüber seneszenten Zellen hindeuteten. In seneszenten Fibroblastzellen waren Nukleinsäuren (1080 cm^{-1}) und Proteine (1652 cm^{-1}) geringfügig herunterreguliert und Lipide (1732 , 2852 und 2920 cm^{-1}) schwach hochreguliert. Diese Ergebnisse bestätigten die Schlussfolgerungen anhand der Raman-spektroskopischen Daten. Zeitgleich wurden in den FT-IR-Mittelwertspektren der vier verschiedenen Zelllinien beträchtliche quantitative Übereinstimmungen beobachtet (siehe Abbildung 17B). Diese wurden einzeln für die Altersgruppen aufgetragen. Ähnlichkeiten in der biochemischen Zusammensetzung deuteten sich an. Geringe, aber

reproduzierbare spektrale Veränderungen wurden ebenfalls ermittelt. In den ermittelten Differenzspektren zwischen jungen und seneszenten Fibroblastzellen bzw. zwischen den verschiedenen Zelllinien wurden die beobachteten Unterschiede deutlicher, im Vergleich zu den Mittelwertspektren (siehe Abbildung 18).

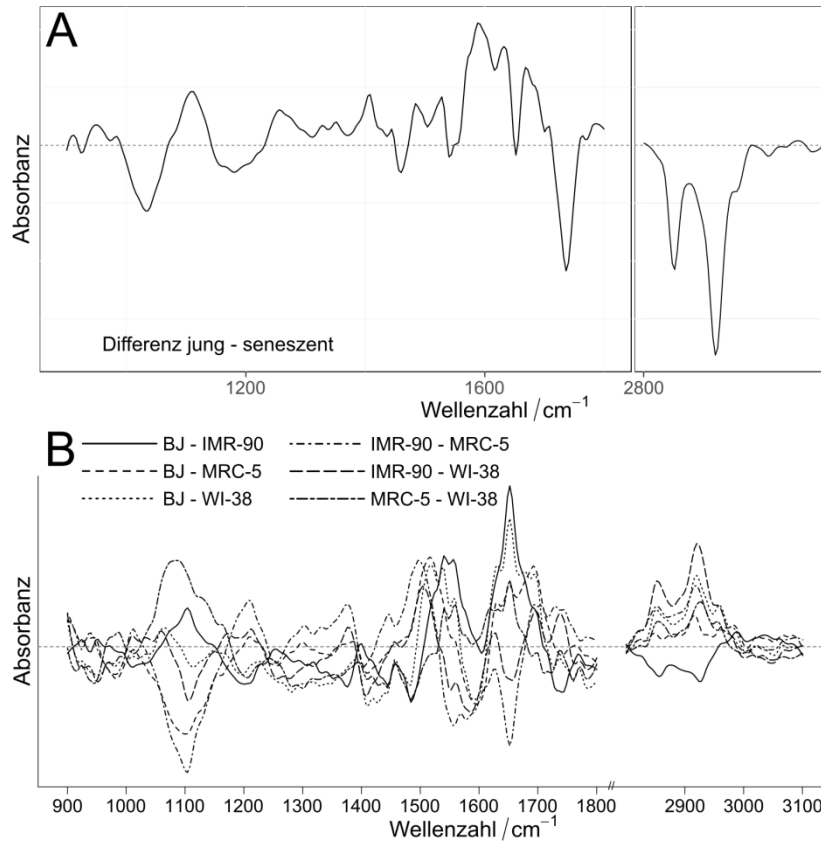


Abbildung 18: FT-IR-Differenzspektren der untersuchten Altersgruppen und Zelllinien. Ermittelte Differenzspektren aller analysierten Zellen, dargestellt für junge gegen seneszente Zellen (A) und verschiedene Fibroblast-Zelllinien (B).

Der FT-IR-Datensatz wurde ebenfalls mittels PLS-LDA modelliert. Sechs PLS Komponenten wurden als Optimum für das Modell identifiziert und beschrieben 80 % der spektralen Varianz. Die auf FT-IR basierende Klassifikation wurde für alle vier Zelllinien separat durchgeführt. Graphisch aufgetragene PLS-LD1 gegen PLS-LD2 trennte innerhalb der einzelnen Zelllinien die jungen, mittelalten und seneszenten Altersgruppen voneinander ab (siehe Abbildung 19).

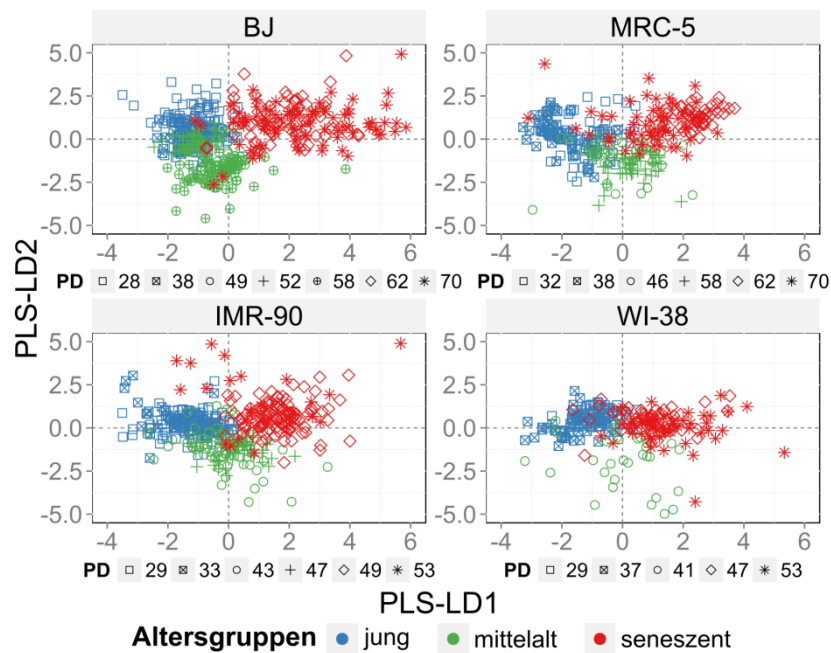


Abbildung 19: FT-IR-spektroskopische Klassifikation einzelner Zelllinien und ihrer Altersgruppen. Für jede Zelllinie einzeln aufgetragene PLS-LD1 gegen PLS-LD2. Klassifikation anhand der Altersgruppen, farbliche Zuordnung für junge (blau), mittelalte (grün) und seneszente (rot) Zellen. Individuell untersuchte PD der jeweiligen Zelllinie BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38 sind durch Symbole unterhalb der Streudiagramme dargestellt.

PLS-LD1 grenzte junge gegen seneszente Zellen ab, wohingegen mittelalte Zellen gegenüber den zwei anderen Altersgruppen durch die PLS-LD2 separiert wurden. Der biochemische Übergang von proliferierenden zu seneszenten Zellen konnte daher gut verfolgt werden. Unterschiede zwischen diesen Zellen wurden durch die Koeffizienten dargestellt (siehe Abbildung 20). FT-IR-Spektren wiesen ausgeprägte Absorptionen aufgrund der C-N-Streckschwingung der Amid II-Bande auf, welche in RS nicht sichtbar sind. Die Region der CH-Streckschwingung verdeutlichte die Änderungen in Protein- und Lipidzusammensetzungen. Ausgeprägte spektrale Eigenschaften wurden in dieser Region für die vier Zelllinien ermittelt. Diese Region ist im IR-Bereich sensitiv bezüglich spektraler Änderungen in der Zusammensetzung von Fettsäureketten. Fettsäuren, wie Phospholipide, sind amphiphile Moleküle, die in den Membranen vorkommen¹⁵⁴. Diese Beobachtung wurde durch die spektrale Charakteristik um 1750 cm^{-1} bestätigt, welche mit C=O-Streckschwingungen in Carboxylgruppen von Estern assoziiert wurden. Diese sind auch für Membranlipide, wie z. B. Triglyceride, typisch. Besonders die spektralen Koeffizienten von BJ, MRC-5 und WI-38 zeigten ausgeprägte Merkmale um die Ester-Bande herum an. Alle vier Koeffizienten wiesen Nulldurchgänge in der Amid I-Region auf, während der Amid II-Bereich um 1575 cm^{-1} weniger beeinträchtigt war. Typischerweise reagiert die Amid II-Bande sehr sensitiv auf Veränderungen in der β -Faltblattstruktur von Proteinen. Dies scheint für den Seneszenz-Prozess nicht von vorrangiger Bedeutung zu sein.

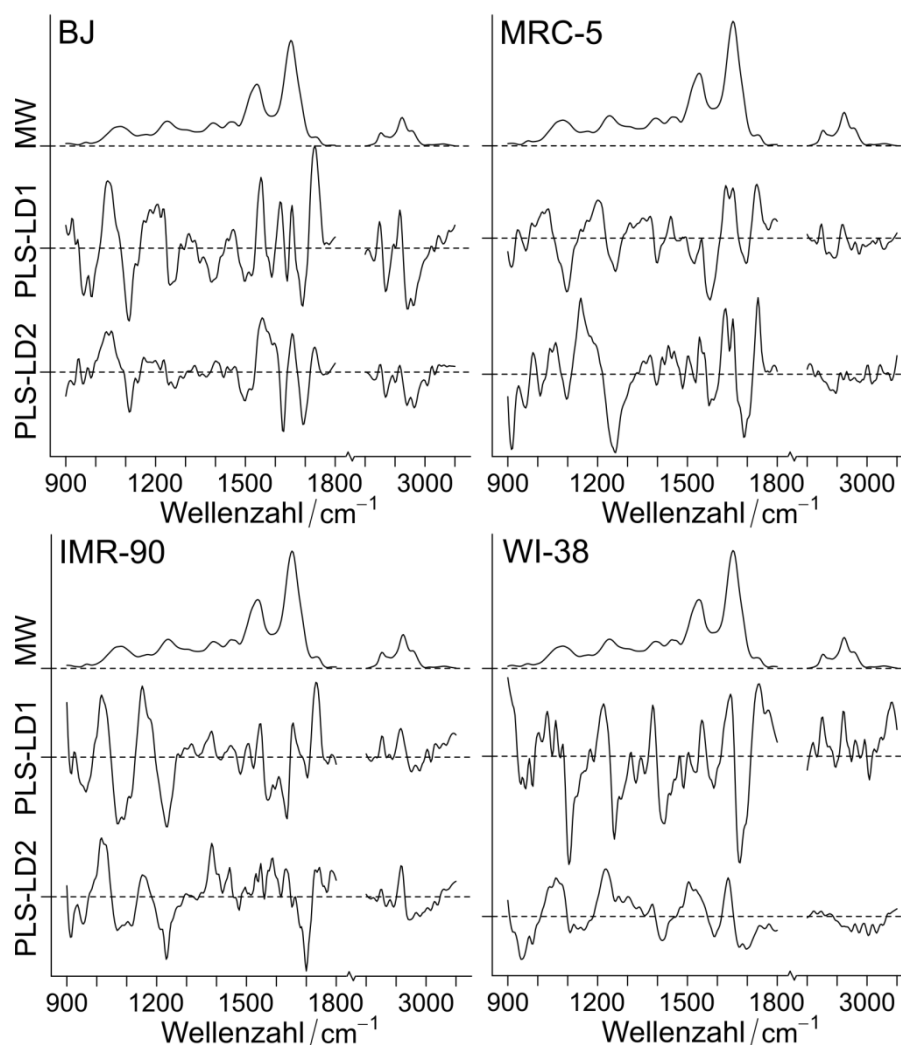


Abbildung 20: FT-IR-Mittelwertspektren und Koeffizienten nach Klassifikation der Altersgruppen. Dargestellte Mittelwertspektren („MW“, oben) und die auf die drei Altersgruppen berechneten PLS-LD1- (mittig) und PLS-LD2-Koeffizienten (unten), separat für die jeweiligen Zelllinien BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38.

Weitere Ähnlichkeiten zwischen den Zelllinien wurden im unteren Wellenzahlbereich sichtbar. Diese dominierten durch Ringschwingungen in Kohlenhydraten oder durch symmetrische Streckschwingungen von C-O-P- oder P-O-P-Gruppen, welche in Oligo- und Polysacchariden oder Nukleinsäuren vorkommen. Aufgrund asymmetrischer Streckschwingungen von Phosphodiesterverbindungen, wurden typische DNA- und RNA-Banden beobachtet. Die Koeffizientenmuster der Diskriminanzfunktionen lassen in diesem Wellenzahlbereich jedoch keine eindeutige Interpretation zu. Aufgrund der relativ geringen Menge an DNA/RNA pro Zellmasse (ca. 10 % w/w) werden Schwingungen dieser Bestandteile während spektroskopischer Untersuchungen von den größeren Mengen an Proteinen (ca. 60 % w/w) in der Zelle überlagert. Dadurch ist die Region der Konformations-sensitiven Amid I-Bande für die α -Helix-Struktur (um 1652 cm^{-1}) generell deutlich ausgeprägter. Diese kann u. a. zur Unterscheidung von Proteinen beitragen. Insgesamt wurden durch FT-IR-Spektroskopie Veränderungen in der biomolekularen Zusammensetzung und Modifikation in Lipiden und Proteinen, aber auch DNA/RNA, beim Übergang in die Seneszenz innerhalb der einzelnen Zelllinien

identifiziert. Nur geringfügige Änderungen wurden in der molekularen Häufigkeit ermittelt. Die Daten waren konsistent zu den RS Ergebnissen und erweiterten diese. Seneszente Zellen wurden mit einer entsprechenden Sensitivität und Spezifität von 82 und 100 % für BJ-, 87 und 97 % für MRC-5-, 88 und 99 % für IMR-90 und 86 und 94 % für WI-38-Zellen erkannt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Kreuzvalidierung der FT-IR-Daten zu den Altersgruppen.

Werte beziehen sich auf richtig zugeordnete seneszente Zellen für die jeweiligen Zelllinien, berechnet anhand einer fünffachen Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen.

Zelllinien	Sensitivität				Spezifität				Genauigkeit			
	BJ	MRC-5	IMR-90	WI-38	BJ	MRC-5	IMR-90	WI-38	BJ	MRC-5	IMR-90	WI-38
[%]	82	87	88	86	100	97	99	94	80	85	88	87

Die Gesamtgenauigkeit der Modellvorhersagen für alle Zelllinien, anhand einer *leave-one-PD-out*-Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen, lag bei 81 % (siehe Tabelle 10). Seneszente Zellen wurden in der Vorhersage mit einer Sensitivität von 84 % und einer Spezifität von 97 % erkannt.

Tabelle 10: Kreuzvalidierung und Vorhersage der FT-IR-Daten für alle Zelllinien.

Werte beziehen sich auf richtig zugeordnete seneszente Zellen. Berechnet anhand einer gepoolten *leave-one-PD-out*-Kreuzvalidierung ohne mittelalte Zellen.

	Kreuzvalidierung			Vorhersage		
	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit	Sensitivität	Spezifität	Genauigkeit
[%]	74	87	81	84	97	91

Die Wahrscheinlichkeitsdichte der *scores* der PLS-LDA wurde für beide Trainings- und Testdatensätze der jungen und seneszenten Altersgruppe aufgetragen (siehe Abbildung 21A). Erwartungsgemäß stimmten die Testdatensätze erheblich mit den Trainingsdatensätzen aufgrund der großen Stabilität der PLS-LDA-Koeffizienten überein (siehe Abbildung 21B). Im Vergleich zu den Raman-Daten wurden mit der FT-IR-Spektroskopie zur Diskriminierung junger und seneszenten Zellen bessere Trennungen erzielt.

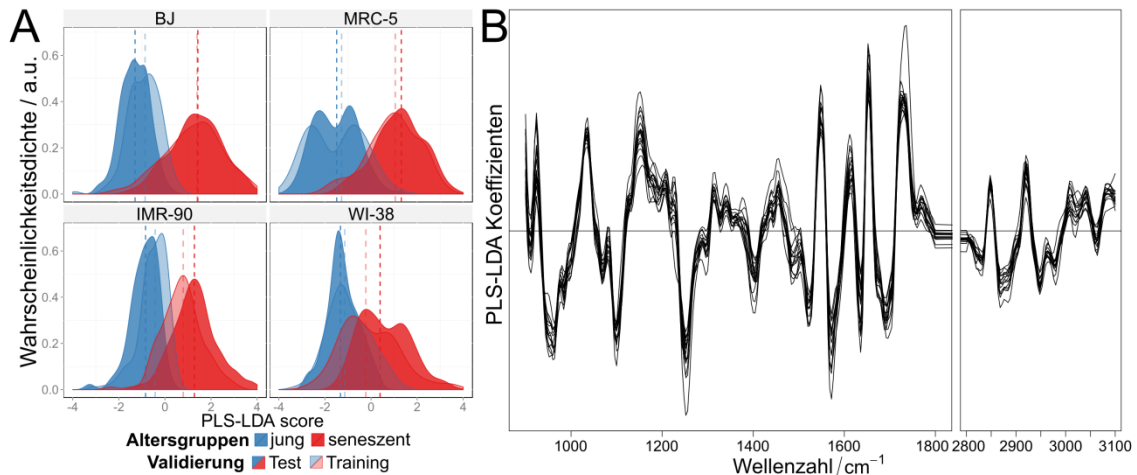


Abbildung 21: Vorhersage junger und seneszenten Zellen nach FT-IR-Spektroskopie.

Anhand einer *leave-one-PD-out*-Kreuzvalidierung dargestellte Wahrscheinlichkeitsdichten der *scores* der PLS-LDA (A). Für jede Zelllinie zur besseren Visualisierung einzeln abgebildet. Test (intensive Farbe) und Training (blasse Farbe) der jungen (blau) und seneszenten Zellen (rot). Gestrichelte vertikale Linien zeigen den Median der jeweiligen Wahrscheinlichkeitsdichte an. Während des Klassifikationsmodells gebildete und hier aufgetragene PLS-LDA-Koeffizienten (B). Diese entstanden aus dem Training von 15 Kombinationen (Altersgruppen und Zelllinien) und dem Test der jeweils 16ten.

Zusätzlich wurden alle Zelllinien als ein gemeinsamer Datensatz hinsichtlich des Übergangs in die Seneszenz klassifiziert (siehe Abbildung 22). Zwischen jungen, mittelalten und seneszenten Zellen wurden große Überlappungen im Vergleich zur separaten Klassifikation der Zelllinien beobachtet. Über die PLS-LD1 wurden hauptsächlich junge von seneszenten Zellen getrennt, während die PLS-LD2 die mittelalten Zellen von den anderen beiden Altersgruppen separierte. Die entsprechenden Koeffizienten wurden abgebildet (siehe Abbildung 22B). In Übereinstimmung mit den separaten altersassoziierten Klassifikationen der einzelnen Zelllinien wurden ähnliche Koeffizientenmuster ermittelt, besonders um 1032, 1252, 1736 und 2868 cm^{-1} ermittelt (siehe Anhang Tabelle 20). Aufgrund der geringeren Anzahl an untersuchten mittelalten WI-38-Zellen wurden mehr Datenpunkte als Ausreißer beobachtet. Die Überlagerungen mit seneszenten Zellen erschienen dadurch größer. Generell können die Ergebnisse, in Kombination mit den Raman-spektroskopischen Untersuchungen, als in den Zelllinien auftretende gemeinsame molekulare Änderungen während des Übergangs in die Seneszenz ausgelegt werden.

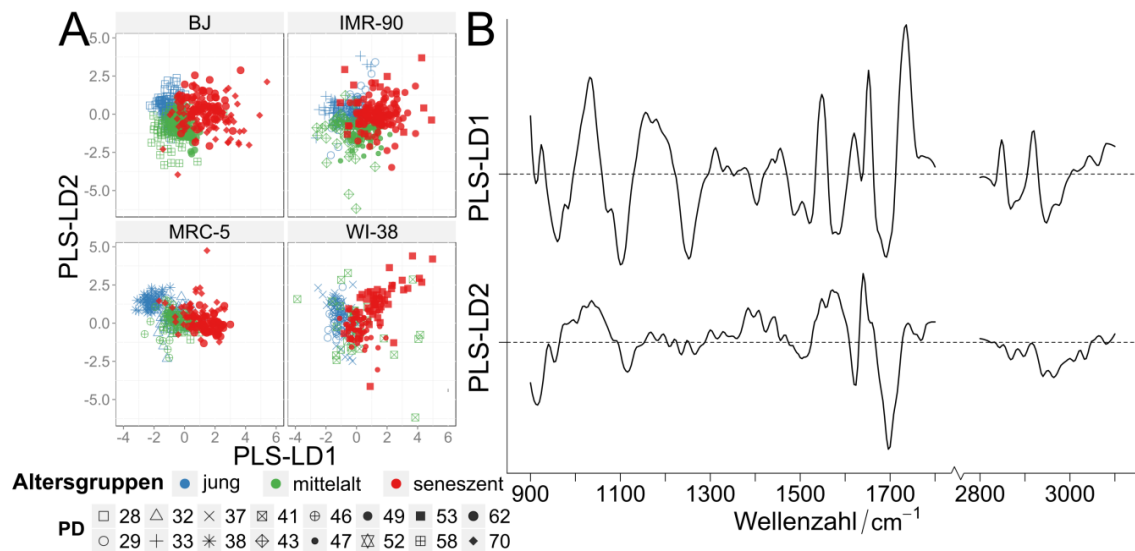


Abbildung 22: FT-IR-spektroskopische Klassifikation der Altersgruppen aller Zelllinien.

Im Streudiagramm (A) dargestellte PLS-LD1 gegen PLS-LD2, nach Klassifikation der Altersgruppen aller Zelllinien als ein gemeinsamer Datensatz. Farbliche Zuordnung der Altersgruppen jung (blau), mittelalt (grün) und seneszent (rot). Durch Symbole dargestellte individuelle PD. Zur besseren Visualisierung der Klassifikation wurde jede Fibroblast-Zelllinie einzeln dargestellt. Aufgetragene Koeffizienten (B) der PLS-LD1 (oben) und PLS-LD2 (unten).

Zelllinien-bezogene Unterschiede wurden gesondert für die jeweiligen Altersgruppen durch die graphische Gegenüberstellung der PLS-LD1 gegen die PLS-LD2 beobachtet (siehe Anhang Abbildung 49). Besonders junge und mittelalte BJ-, IMR-90- und MRC-5-Zellen konnten voneinander unterschieden werden. Ähnlich zu den Raman-spektroskopischen Ergebnissen variierten die Eigenschaften der Zelllinien während der Seneszenz. Spektrale Unterschiede zwischen den Koeffizienten wiesen auf Abweichungen in den biochemischen Zusammensetzungen zwischen den Zelllinien hin. Deutliche Bandenunterschiede wurden in den Koeffizienten innerhalb des gesamten analysierten Wellenzahlbereichs ermittelt (siehe Anhang Abbildung 50). Diese wurden zellulären Makromolekülen zugeordnet. Banden zwischen 900 und 1200 cm^{-1} wurden Kohlenhydraten (1020, 1076, 1100 und 1150 cm^{-1}) und Nukleinsäuren (einschließlich 1230 cm^{-1}) zugeordnet. Zwischen 1300 und 1500 cm^{-1} wurden Banden Proteinen (Phenylalanin 1486 cm^{-1}) und Lipiden (Phospholipiden 1384 cm^{-1}) zugewiesen, während markante Amid I- und Amid II- Banden zwischen 1500 und 1800 cm^{-1} mit Proteinen (Tyrosin 1520 cm^{-1}) assoziiert wurden. Weitere Schwingungen, aufgrund funktionaler Estergruppen in Lipiden, wurden um 1740 cm^{-1} ermittelt. Zwischen 2848 und 2992 cm^{-1} vorkommende Schwingungsbanden der CH_3 - und CH_2 -Gruppen wurden hauptsächlich Phospholipiden zugeordnet.

Insgesamt wurden altersassoziierte Unterschiede hauptsächlich in Proteinen und Lipiden, in geringerem Ausmaß auch in Nukleinsäuren, festgestellt. Diese Unterschiede bezogen sich v. a. auf veränderte Zusammensetzung in den vier humanen Zelllinien. Dies ermöglichte die Identifizierung der zellulären Zustände, entweder die der Proliferation oder die der Seneszenz. Letztere war besonders gekennzeichnet durch Rückfaltungen und Modifikationen in Proteinen.

3.1.4 Diskussion der spektroskopischen Ergebnisse zur replikativen Seneszenz

Mittels markierungsfreier Raman- und FT-IR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass in den untersuchten Einzelzellen der vier verschiedenen Zelllinien die Seneszenz-bedingten Variationen identifiziert und seneszente Zellen deutlich von proliferierenden Zellen abgegrenzt wurden. Dies lieferte neuartige und umfassende Erkenntnisse zu den altersassoziierten biochemischen Veränderungen. Da die Intensitäten der Raman-Spektren von der Anzahl der Moleküle im Probenvolumen abhängt, stellen quantitative Zellanalysen mit großen morphologischen Unterschieden eine Herausforderung dar. Quantitative Unterschiede können sich auch auf morphologische Differenzen innerhalb der Zellen während des Übergangs in die Seneszenz beziehen. Spektrale Unterschiede in seneszenten Zellen ergaben sich daher entweder durch molekulare oder räumlich-strukturelle (topographische) Änderungen. Mittels Kalibrierungsmodellen für Moleküle konnte durch Kombination von bildgebender RS und Rasterkraftmikroskopie das Potenzial zur Abbildung von Konzentrationen in Zellen mit großen morphologischen Unterschieden gezeigt werden ¹⁵⁵.

Ein bestimmtes Minimum an lokalen Stichproben wurde als ausreichend für adäquate spektrale Probennahmen erachtet, um ein Raman-Spektrum einer ganzen Zelle nachzubilden ¹⁵⁶. Gezeigt wurde, dass das gleiche Diskriminierungs-Maß im Vergleich zur bildgebenden RS erreicht wurde. In einer früheren Studie wurden einzelne Punktmessungen in verschiedenen Bereichen der Zelle durchgeführt und trotz zunehmender Zellpassagen konnte kein seneszenter Verlauf identifiziert werden ¹⁵⁷. Das Problem eines geringen Datendurchsatzes und zeitaufwendiger Messungen aufgrund hoher räumlicher Auflösungen kann durch Mittelung von Einzelspektren einer gesamten Zelle überwunden werden ¹⁵⁸. Daher wurden als Grundlage für die Statistik aufgenommenen Raman-Spektren von Einzelzellen gemittelt. Aufgrund des experimentellen Ansatzes der hier vorliegenden Arbeit mit den engen Rasterscans während der bildgebenden RS, der spektralen Mittelung und der Anzahl an gemessenen Zellen wurden morphologische und chemische Änderungen innerhalb der Zellen angemessen berücksichtigt. Obwohl die spektralen Unterschiede während des Übergangs in die Seneszenz als sehr gering wahrgenommen wurden, waren diese reproduzierbar und konsistent. Basierend auf diesen Unterschieden waren multivariate Modelle in der Lage, zwischen diesen Zellen zu differenzieren. Die nachfolgenden FT-IR-Untersuchungen lieferten komplementäre biochemische Informationen, welche die Ergebnisse der RS-Experimente bestätigten.

Im Vergleich von gesund- und krankhaft-proliferierenden Zellen, z. B. Krebszellen, sind messbare Veränderungen des Wassergehaltes mittels markierungsfreier spektroskopischer Techniken bekannt ^{159,160}. Da die Proliferation bei seneszenten Zellen gestoppt ist, Zellen aber einen normalen Metabolismus aufweisen, wurden trotz der signifikanten Größenzunahmen zwischen jungen proliferierenden und seneszenten Zellen vergleichbare intrazelluläre Wassergehalte angenommen. In einer nachfolgenden Studie könnte diese Frage Bestandteil eines Untersuchungsprojektes werden.

In den Raman- und FT-IR-Spektren wurde der Übergang in die Seneszenz nicht mit einzelnen wenigen ausgewählten Markerbanden assoziiert. Stattdessen wurde festgestellt, dass die Seneszenz ein multifaktorieller und komplexer Prozess ist. Dabei spielten weniger Veränderungen hinsichtlich der molekularen Häufigkeit eine Rolle, sondern erhebliche Veränderungen in der Zusammensetzung. Dies gilt hauptsächlich für Proteine und Lipide, die zusammen einen Anteil von ca. 75 % am gesamten Zellbestand ausmachen, und in geringerem Maße für Nukleinsäuren und Kohlenhydraten, welche ca. 25 % aufweisen¹⁵³. Grundsätzlich ist eine genaue Interpretation der spektralen Unterschiede, die sich aus den Oberklassen der zellulären Bestandteile und nicht aus individuellen (bio-) chemischen Spezies ergeben, herausfordernd, da Unterschiede aus einer Vielzahl an Substanzen entstammen können. Dennoch wurden Seneszenz-induzierte Veränderungen in Proteinen und Lipiden, z. B. aufgrund von intrazellulären Schädigungen, über andere analytische Verfahren ermittelt¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Ferner lösen ROS die replikative Seneszenz intrazellulär aus¹⁶⁵. Durch Färbung mit lichtsensitiven Farbstoffen und unter Verwendung von laserbasierten Techniken, wie konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie oder Durchflusszytometrie wurden höhere Level an ROS in seneszenten Zellen im Vergleich zu proliferierenden gefunden¹⁶⁶. Dies kennzeichnet ROS als bedeutenden alternsassozierten Einflussfaktor, v. a. hinsichtlich der Biomembranen.

Erhöhte Raman-Intensitäten und IR-Absorbanz wurden zuvor in seneszenten Zellen aufgrund von Ansammlungen veränderter Moleküle, z. B. durch DNA-Schäden, beobachtet^{167,168}. Das spektrale Verhältnis der in mesenchymalen Stammzellen ermittelten Raman-Banden von 1157 zu 1174 cm^{-1} wurde als möglicher Seneszenz-Marker diskutiert¹⁶⁹. Diese Banden werden Schwingungen in aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin zugeordnet. Die PLS-LDA-Klassifizierung einzelner Zelllinien, ausgenommen IMR-90-Zellen, ergab eine schwache Veränderung um 1170 cm^{-1} . In der Literatur werden Erhöhungen beider Aminosäuren mit der Seneszenz beschrieben und als Ursache für die Autofluoreszenz diskutiert¹⁶⁹. Eine mit zunehmender Seneszenz steigende Autofluoreszenz wurde in aufgenommenen Raman-Spektren beobachtet. Darüber hinaus deuten Veränderungen in den Protein-Banden auf lysosomale Akkumulationen von zellulären Abfällen und auf fehlgefaltete Proteine hin. In den gleichen untersuchten Fibroblast-Zelllinien wurden signifikante alternsassozierte Hochregulierungen von lysosomalen Signalwegen detektiert⁹¹, welche mit den hier gewonnenen spektroskopischen Daten übereinstimmten. Die mit dem Altern verbundene Aggregation biologischer Abfälle regt die Akkumulation von Lipofuszin innerhalb der Lysosomen an, welche als Biomarker für die Seneszenz fungieren^{115,170}. Diese Granulate bestehen v. a. aus oxidierten oder fehlgefalteten Proteinen und Lipiden, beispielsweise aus Triglyzeriden, freien Fettsäuren oder Cholesterin. Lipofuszin besitzt eine zytotoxische Wirkung auf Zellzyklus-arretierte Zellen. Dadurch kann die Lebensdauer begrenzt werden. Die Amplifikation mitochondrialer und lysosomaler Veränderungen resultiert in weiteren Aggregatbildungen, aufgrund der Entwicklung weiterer anomaler intermolekularer Wechselwirkungen, welche zusätzlich zu Oxidationen und Vernetzungen beitragen¹⁷¹. Auch mitochondriale DNA-Schäden

korrelieren mit der Produktion von ROS, welche für die zelluläre Seneszenz ursächlich sein kann⁵⁹.

Altersassoziierte Konformationsänderungen von Lipiden können anhand der Raman-Bandenverschiebungen bei 2850 und 2882 cm^{-1} abgeleitet werden. Bei der zellulären Seneszenz, die durch Aktivierung von Onkogenen mittels Doxycyclin-Behandlungen einer Brustkrebs-Zelllinie induziert wurde, konnten zelluläre Veränderungen in den Phospholipiden von Kernmembranen mittels RS um 1656 cm^{-1} beobachtet werden¹⁷². Diese Veränderungen wurden in den hier untersuchten Fibroblast-Zelllinien ebenfalls festgestellt. Die beschriebenen Unterschiede wurden C=C-Streckschwingungen von *cis*-Isomeren zugeordnet, was vorwiegend auf instabile strukturelle Modifikationen während der Seneszenz hindeutete. Auch durch Kernspinresonanz-Spektroskopie wurde in replikativen seneszenten Zellen und in Seneszenz-induzierten Zellen ein erhöhter Phospholipid-Stoffwechsel festgestellt¹⁷³. Aufgrund von wahrscheinlichen Membran-Reaktionen mit ROS wurden in älteren Patienten gesteigerte Lipidperoxidationen mittel FT-IR-Spektroskopie ermittelt¹⁷⁴. Als Konsequenz wurde die Induktion von oxidativem Stress auf zellulärer Ebene beobachtet. Diese allgemeine Zunahme von Seneszenz-assoziierten Strukturänderungen und Desorganisationen in Biomembranen wird durch die in dieser Arbeit ermittelten spektralen Änderungen bestätigt. Zudem werden Konzentrationsänderungen von Acylketten ($-(\text{C}=\text{O})-$ als funktionelle Gruppe) in Lipiden (CH_2) durch zelluläres Wachstum oder Apoptose reguliert^{35,175}. Darüber hinaus verursachen Stimulationen zur Krebsbildung in Fibroblasten signifikante Änderungen in den Lipiden und Nukleinsäuren¹⁷⁶.

Mit beiden spektroskopischen Techniken (RS und FT-IR-Spektroskopie) wurden deutliche und ausgeprägte spektrale Unterschiede in allen vier Fibroblast-Zelllinien mit der Seneszenz assoziiert. Spektrale Abweichungen zwischen jungen und gealterten Zellen wurden für jede Zelllinien einzeln sowie in der Kombination dieser bestimmt und analysiert. Für alle untersuchten Zelllinien konnte auf einen gemeinsamen zugrundeliegenden seneszenten Prozess geschlossen werden, welcher auch in altersassoziierten Änderungen auf der mRNA-Expressionsebene festgestellt wurde¹⁷⁷. Erhebliche Überschneidungen von unterschiedlich exprimierten Genen und deren üblichen Proteinexpressionsprofilen wurden in den Transkriptom-Analysen von verschiedenen Zelllinien gezeigt. Dabei deutete sich an, dass eine Reihe ausgewählter Gene und Signalwege von zentraler Bedeutung für den Übergang in die Seneszenz sind. Der Gehalt an Proteinen in diesen Fibroblast-Zelllinien unterliegt verstärkt altersassoziierten Veränderungen, mit nur einigen wenigen Zelllinien-spezifischen Beiträgen⁹¹.

Interessanterweise wurden unter Verwendung von Raman-Punktmessungen an verschiedenen Zellpositionen keine signifikanten Änderungen beim Übergang in die Seneszenz hinsichtlich aufsteigender Zellkulturpassagen beobachtet¹⁵⁷. Die Bildgebung oder spektrale Erfassung ganzer Zellen ist deshalb für eine statistische Auswertung unerlässlich, wenn der Übergang in die Seneszenz untersucht werden soll. Nachteile, wie z. B. durch einen geringen Datendurchsatz oder zeitaufwendige Messungen

aufgrund hoher räumlicher Auflösungen, können überwunden werden, indem ein integrierter Modus zur Aufnahme der Spektren verwendet wird¹³⁴. Für eine solide statistische Grundlage ist eine große Anzahl an analysierten Zellen entscheidend für die Zuverlässigkeit der Daten. Die Klassifizierung von Raman-spektroskopischen Daten ergab höhere Kenngrößen in der Validierung im Vergleich zu den FT-IR-Daten. Andererseits wurden über FT-IR-Spektroskopie höhere Signal-Rausch-Verhältnisse ermittelt, keine Fluoreszenz beobachtet, schnellere Messungen durchgeführt und dadurch größere Datenmengen gewonnen. Im Unterschied zur RS erfordern FT-IR-Messungen üblicherweise getrocknete Zellproben. Daher ist die RS grundsätzlich zur Untersuchung bei klinischen Fragestellungen, aufgrund der *in vivo*-Anwendbarkeit, besser geeignet. Dagegen scheint die FT-IR-Spektroskopie (in Abhängigkeit der Fragestellung) für die Identifikation und Klassifikation von *in vitro*-Experimenten optimaler zu sein. Ein detailliertes Verständnis von molekularen Änderungen beim Übergang in die Seneszenz würde sich durch genauere Untersuchungen von einzelnen Zellkompartimenten, wie z. B. von Zellkernen oder Lipidvesikeln sowie Einflüssen der Mikroumgebung auf alternde Zellen verbessern. Solche Untersuchungen, wie die in dieser Arbeit gezeigten spektroskopischen Analysen, zusammen mit den genannten Transkriptom-Untersuchungen⁹¹, helfen, den auslösenden biomolekularen Prozess, zu dem seneszente Zellen durch die Abnahme der Gewebeintegrität und -Funktion beitragen, zu offenbaren.

Insgesamt wurde gezeigt, dass mit markierungsfreier RS und FT-IR-Spektroskopie, in Kombination mit multivariater Datenanalyse, sich proliferierende von seneszenten Zellen in verschiedenen Fibroblast-Zelllinien auf Einzelzell-Ebene unterscheiden. Molekulare Differenzen zwischen den vier Zelllinien und deren individueller Übergang in die Seneszenz wurden in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen identifiziert^{90,177}. Ermittelte Unterschiede beruhten nicht auf veränderten Mengen der Biomoleküle, da eher vergleichbare biomolekulare Häufigkeiten in allen vier Zelllinien und zwischen proliferierenden und seneszenten Zellen beobachtet wurden. Beim Übergang dieser Zelllinien in die Seneszenz wurden stattdessen gemeinsame dominierende molekulare Unterschiede festgestellt, die auf Modifikationen in Proteinen und Lipiden beruhten. Diese biochemischen Ergebnisse ergänzten Beobachtungen, in der die Alterung eine Verschiebung im mRNA-Transkriptionsmuster auslöste⁹¹. Dies wies auf veränderte zelluläre Aktivitäten in den Zelllinien hin. Folglich induziert die Alterung in den Zellen eher Veränderungen im Erscheinungsbild bzw. auf biomolekularer und biochemischer Ebene, als in der vorhandenen Molekülmenge. Veränderungen treten hauptsächlich in Proteinen und Lipiden auf, einschließlich der Degeneration und Speicherung von Abfallprodukten.

3.2 Unterscheidung seneszenten Fibroblastzellen in zwei- und dreidimensionalen Zellmodellen

3.2.1 Voruntersuchungen an Sphäroiden

Zu Beginn wurde geprüft, ob RS tatsächlich für eine Untersuchung von 3D Fibroblast-Zellaggregaten geeignet war. Dafür wurden Sphäroide aus primären humanen BJ-Zellen (PD 28) erzeugt, welche nach einem Tag durch PD 56 BJ-Zellen eingekapselt und mittels RS analysiert wurden (siehe Abbildung 23A und B). Vergleichend dazu erfolgten Hämatoxylin-Eosin-Färbungen zur morphologischen Untersuchung der feinzelligen Struktur innerhalb der Sphäroide. Die Hämatoxylin-angefärbten Zellkerne (dunklere und runde Form), verglichen mit dem Eosin-angefärbten Zytoplasma (heller), wurden sichtbar (siehe Abbildung 23B). Ein Tiefenscan (x-z-Ebene), von $\sim 20 \mu\text{m}$ in den Sphäroid hinein, zeigte im Intensitätsprofil der CH-Streckschwingungen von $2800\text{--}3020 \text{ cm}^{-1}$ die Oberfläche und den Beginn des Zellaggregats (siehe Abbildung 23C). Hohe Intensitäten wurden Farb-abhängig im Falschfarbenbild angezeigt. Anhand der DNA-Banden ($722, 786, 1094, 1242, 1478$ und 1578 cm^{-1}) wurden Nuklei innerhalb des aufgenommenen Sphäroids sichtbar (siehe Abbildung 23D). Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Aufnahmen und die Raman-Falschfarbenbilder stimmten hinsichtlich des Auftretens und der Verteilung der Nuklei im Sphäroid überein. Dies zeigt, dass markierungsfreie bildgebende RS für die Aufklärung von morphologischen Strukturen, die sich an und unterhalb der untersuchten Oberflächen befinden, geeignet ist.

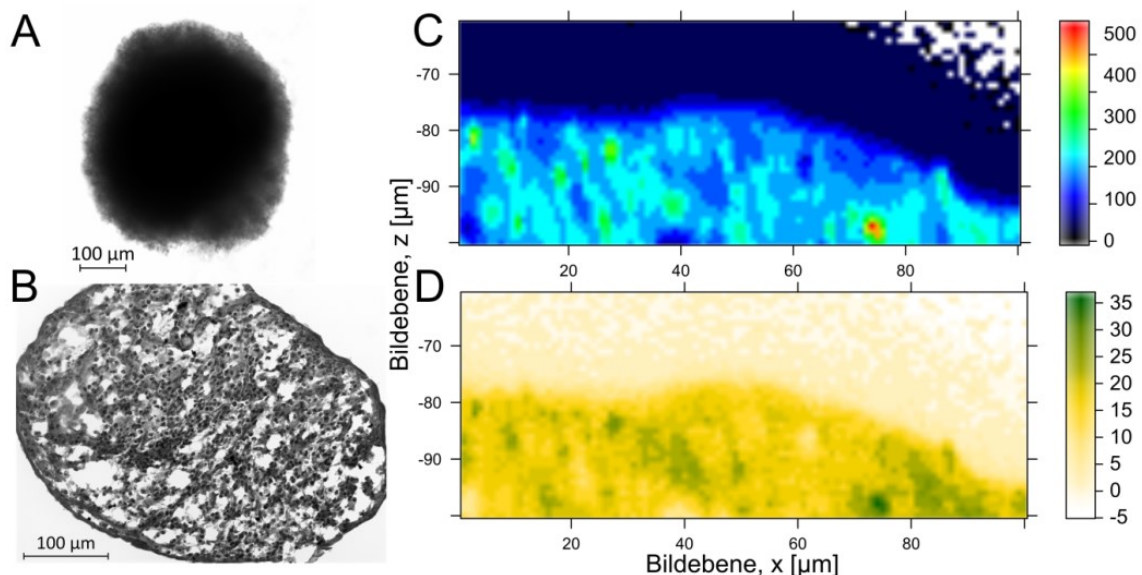


Abbildung 23: Graphische Darstellungen von Sphäroid-Untersuchungen.

Ein vollständiger und Formaldehyd-fixierter Sphäroid (A), bestehend aus aggregierten Fibroblastzellen (BJ, PD 28) bzw. aus Zellen zweier PD (PD 28 eingekapselt mit PD 58). Ein $10 \mu\text{m}$ dicker Kryotomnschnitt (B) wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Das Raman-Bild (C) eines Sphäroid-Tiefenprofils basiert auf der Intensität der CH-Streckschwingung von $2800\text{--}3020 \text{ cm}^{-1}$. Das Intensitätsprofil der DNA-Banden (D) zeigt die Nuklei (dunkelgrün).

Eine HCA der Raman-Daten, unter Verwendung der Methode von Ward, erlaubte die visuelle Identifizierung der Zellen und zellulären Kompartimente innerhalb der Bildebene des eingekapselten Sphäroids (siehe Abbildung 24).

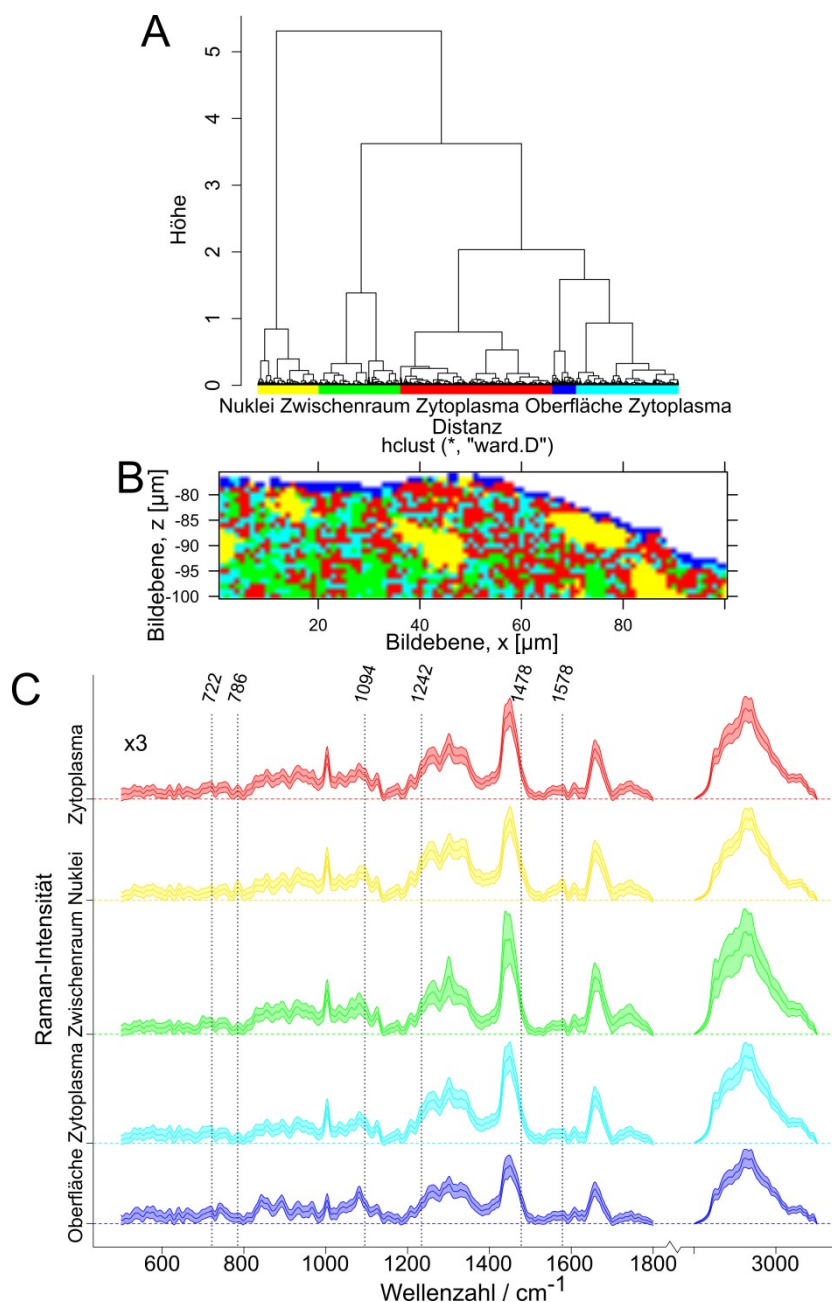


Abbildung 24: Clusteranalyse eines Sphäroids mittels Raman-Spektren.

Fünf ausgewählte Cluster der HCA beschreiben die Zellregionen des Tiefenscans und geben die spektralen Ähnlichkeiten im (A) Dendrogramm (definiert über deren euklidische Distanz der Clustermediane) wieder. Räumliche Verteilungen der Cluster sind im Falschfarbenbild (B) erkennbar. In den Raman-Mittelwertspektren (C) mit zugehörigen Standardabweichungen sind DNA-bezogene Banden hervorgehoben. Zur besseren Veranschaulichung ist der Spektralbereich von 500–1800 cm^{-1} um den Faktor drei erhöht.

Solche Clusteranalysen wurden zuvor bereits erfolgreich bei medizinischen Diagnosen von Tumorzellen im Gewebe und Krebszelllinien eingesetzt, z. B. zum Vergleich der Raman-Falschfarbenbilder mit dem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebe oder zur

Detektion von Mikrometastasen¹⁷⁸. Für die Bildanalyse wurde die äußere Schicht, bestehend aus verstreut liegenden Zellfragmenten, entfernt. Die HCA gruppierte Einzelspektren aus dem Raman-Bild entsprechend ihrer Ähnlichkeiten bzw. Unähnlichkeiten. Folglich konnten die zellulären Lagen innerhalb des Sphäroids abgebildet werden. Fünf Cluster wurden ausgewählt, um die Schicht der Sphäroid-Oberfläche zu visualisieren. Die sich ergebende hierarchische Struktur zwischen den ausgewählten Gruppen von Nuklei, Zytoplasma (zweifach ausgewählt), lipidreicheren Zellzwischenräumen und der Sphäroid-Oberfläche wurde in einem Dendrogramm dargestellt (siehe Abbildung 24A). Basierend auf den Spektren wurden diese Gruppen eindeutig voneinander getrennt und waren in sich homogen. Darauf basierend, wurden Falschfarben-Clusterbilder des Sphäroids erzeugt, in denen entsprechende Einzelzellstrukturen mit den jeweiligen Nuklei identifiziert wurden (siehe Abbildung 24B). Die dazugehörigen Raman-Spektren (siehe Abbildung 24C) verdeutlichten die schwachen Gruppen-spezifischen Unterschiede, die jedoch zur Unterscheidung der Kompartimente ausreichend waren. Insgesamt erwies sich die RS für Analyse von 3D Fibroblast-Zellaggregaten als geeignet, da zelluläre Strukturen in oberflächennahen Schichten in 3D-Umgebungen aufgelöst und identifiziert wurden. Darauf aufbauend wurden 3D-Modelle aus jungen und seneszenten primären Fibroblastzellen untersucht.

3.2.2 Spektrale Analyse der Raman- und FT-IR-Daten von 2D- und 3D-kultivierten Zellen

Fixierte primäre dermale Fibroblastzellen (HDF), wurden mittels RS und FT-IR-Spektroskopie untersucht, wobei für FT-IR-Untersuchungen dieselben Zellproben zusätzlich getrocknet wurden. Die Zellkultivierung in 2D- und 3D-Umgebungen wurde miteinander verglichen und der Übergang in die Seneszenz wurde für beide Kultivierungsmethoden verfolgt. Die Seneszenz in den Fibroblastzellen (Passage 20) wurde durch mikroskopische Kontrollen und die SA β -Gal-Färbung nachgewiesen. Während des Übergangs in die Seneszenz wurden bereits beschrieben morphologische Veränderungen (siehe Kapitel 3.1.1) im Erscheinungsbild wahrgenommen. Für 2D-kultivierte HDF-Zellen (siehe Abbildung 25A) wurden ähnliche Seneszenz-assoziierte Veränderungen bezüglich der Morphologie im Vergleich zu den untersuchten Fibroblast-Zelllinien festgestellt, jedoch in einem geringeren Ausmaß. In den Raman-Bildern wurden tropfenförmige Akkumulationen von lipidhaltigem Material im Zytoplasma sichtbar. Dagegen konnten in hellfeldmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 25C und D) schwache Größenzunahmen und Verlängerungen der Zellen beobachtet werden. Größenzunahmen der seneszenten Zellen innerhalb des 3D-Modells (siehe Abbildung 25B) wurden nicht beobachtet. Vielmehr nahm die Akkumulation von lipidhaltigen Tröpfchen zu, ähnlich wie in 2D-kultivierten seneszenten Zellen. In 3D-kultivierten Zellen wurden leicht unterschiedliche morphologische Veränderungen im Vergleich zu den 2D-kultivierten Zellen festgestellt.

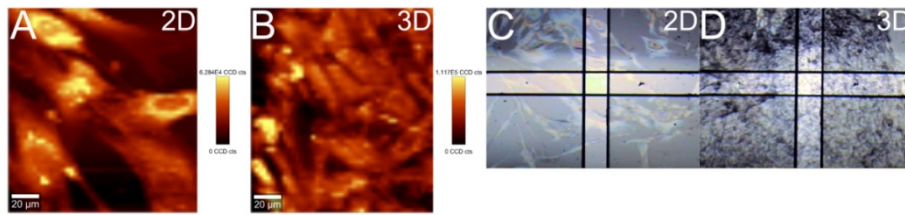


Abbildung 25: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen 2D- und 3D-kultivierter Zellen. Die Bildgebung der Raman-Bilder (A, B) basiert auf der Intensität der CH-Streckschwingung von $2800\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$. Aufnahmen seneszenten (Passage 20) 2D-kultivierter Zellen (HDF; A) und dieser Zellen in einer 3D-Umgebung (FDM; B). Mikroskopaufnahmen (Reflektionsmodus) seneszenten Fibroblastzellen (Passage 20), kultiviert in einer 2D- (C) und 3D-Umgebung (D). Die Öffnung der Blende (ca. $50\times 50\text{ }\mu\text{m}$) ist als schwarze Linie innerhalb der Aufnahmen (C, D) sichtbar.

Die gemittelten Raman- und FT-IR-Spektren sowie die zugehörigen Standardabweichungen der 2D- und 3D-kultivierten jungen und seneszenten Zellen wurden dargestellt (siehe Abbildung 26). Wichtige Raman- und FT-IR-Banden wurden spezifischen Biomolekülen zugewiesen. Bekannte Banden, im Wellenzahlbereich von $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ und $2800\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$ für Raman-Daten bzw. von $900\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ und $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ für FT-IR-Daten, wurden Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren als den Hauptbestandteilen der Zelle zugeordnet. Eine genaue Beschreibung befindet sich im Anhang in Tabelle 21. Allgemein waren die Raman- und FT-IR-Spektren junger und seneszenten 2D-kultivierter Zellen sehr ähnlich zueinander (siehe Abbildung 26A und Abbildung 27A).

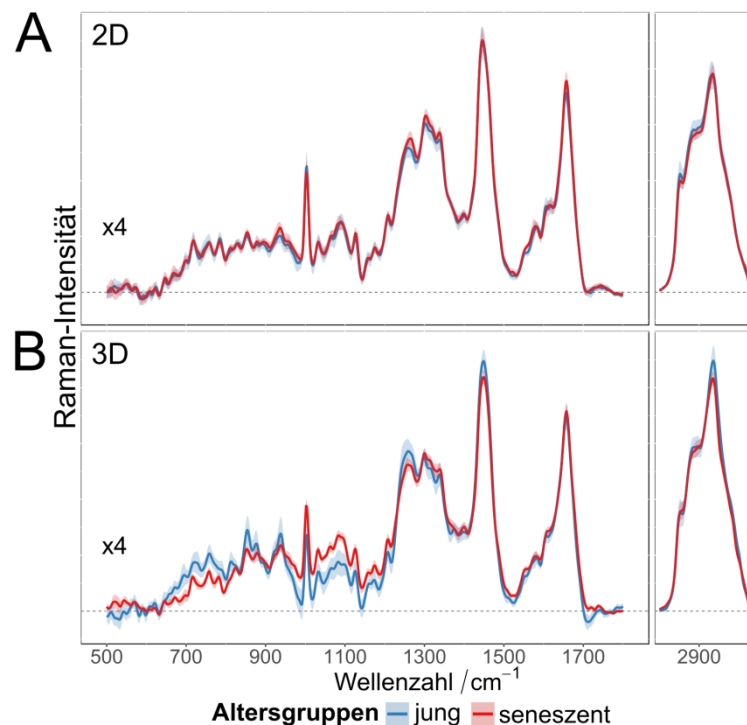


Abbildung 26: Raman-Mittelwertspektren junger und seneszenten 2D- und 3D-kultivierter Zellen. Mittelwertspektren und dazugehörige Standardabweichungen der zwei Altersgruppen jung (blau) und seneszent (rot) innerhalb der jeweils 2D- (A) und 3D-kultivierten Zellen (B). Zur besseren Veranschaulichung ist der Spektralbereich von $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ um den Faktor vier erhöht.

Dies deutete auf erhebliche Ähnlichkeiten bezüglich der biochemischen Zusammensetzung in beiden Altersgruppen hin. Vorangegangene Untersuchungen zur zellulären Seneszenz an vier humanen Fibroblast-Zelllinien bestätigten diese beschriebenen Ähnlichkeiten (siehe Kapitel 3.1). Interessanterweise wurden in den Raman- und FT-IR-Spektren 3D-kultivierter Zellen keine charakteristischen Bandenprofile von Kollagen ermittelt (siehe Abbildung 26B und Abbildung 27B). Bekannt ist, dass v. a. junge Fibroblastzellen in der Haut, einer natürlichen 3D-Umgebung, Kollagen produzieren und die Menge an produziertem Kollagen mit dem Altern signifikant abnimmt¹⁷⁹. Scheinbar war Kollagen keine dominante Komponente, in Übereinstimmung zu früheren Erkenntnissen^{180,181}.

In den FT-IR-Spektren wurden nur geringe Änderungen (um 1060 und 1650 cm^{-1}) zwischen jungen und seneszenten 3D-kultivierten Zellen sichtbar (siehe Abbildung 27B). Dagegen wurden innerhalb der Raman-Daten von 3D-kultivierten Zellen erhebliche spektrale Unterschiede im Vergleich zu den FT-IR-Spektren beobachtet (siehe Abbildung 26B). Die RS-Daten der 3D-Modelle waren auch zu den 2D-kultivierten Zellen verschieden. In jungen Zellen war die Intensität in der Amid III-Region (um 1260 cm^{-1}) und in der Region zwischen 600 und 900 cm^{-1} erhöht, während diese für seneszente Zellen zwischen 930 und 1230 cm^{-1} erhöht war. Im Vergleich der 2D- mit den 3D-kultivierten Zellen zeigten sich erhöhte Banden um 1310 cm^{-1} .

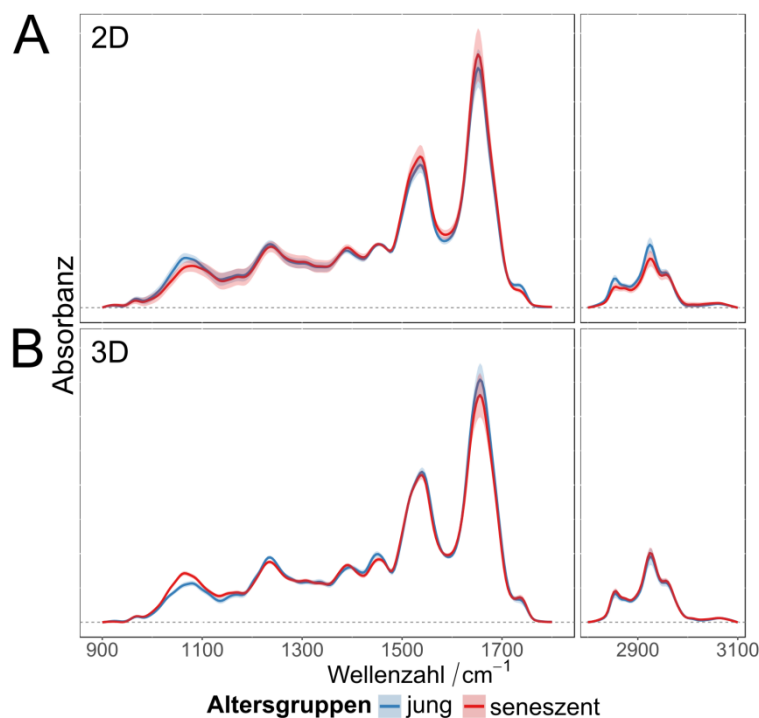


Abbildung 27: FT-IR-Mittelwertspektren junger und seneszenter 2D- und 3D-kultivierter Zellen. Mittelwertspektren und dazugehörige Standardabweichungen der zwei Altersgruppen jung (blau) und seneszent (rot) innerhalb der jeweils 2D- (A) und 3D-kultivierten Zellen (B).

Um die spektralen Unterschiede zwischen jungen und seneszenten sowie 2D- und 3D-Zellkulturen zu verdeutlichen, wurden Raman- und FT-IR-Differenzspektren anhand der Mittelwertspektren berechnet (siehe Abbildung 28). Innerhalb der 3D-kultivierten

Zellen, aber nicht in 2D-kultivierten, wurden kleine aber erhebliche Änderungen in der biomolekularen Häufigkeit, besonders von Proteinen, zwischen jungen und seneszenten Zellen oberhalb von 1200 cm^{-1} festgestellt. Dies deutete auf eine unterschiedliche biochemische Zusammensetzung zwischen 3D- und 2D-kultivierten Zellen hin. Die gemittelten Differenzspektren junger versus seneszenten Zellen in 2D- oder 3D-Umgebungen sowie 2D- versus 3D-kultivierten Zellen in den zwei Altersgruppen zeigten deutliche Unterschiede im gesamten Wellenzahlbereich. Spektrale Änderungen zwischen jungen und seneszenten Zellen legten nahe, dass sich während der Alterung kaum quantitative Änderungen aufgrund geringer Intensitätsveränderungen ergaben. Vielmehr änderte sich die biomolekulare Zusammensetzung der Nukleinsäuren, Proteine und Lipide in den Zellen. Dies bestätigten vorangegangene Seneszenz-Untersuchungen an Fibroblast-Zelllinien. Zudem waren altersassoziierte Veränderungen zwischen 2D- und 3D-kultivierten Zellen bezüglich der Quantität von Molekülen deutlich verschieden. Darüber hinaus wurden in den FT-IR-Daten keine Effekte durch Mie-Streuung beobachtet. Die eher flache und adhärente Morphologie der HDF-Zellen schien diese zu verhindern, im Gegensatz zu eher sphärischen Zellen¹⁷.

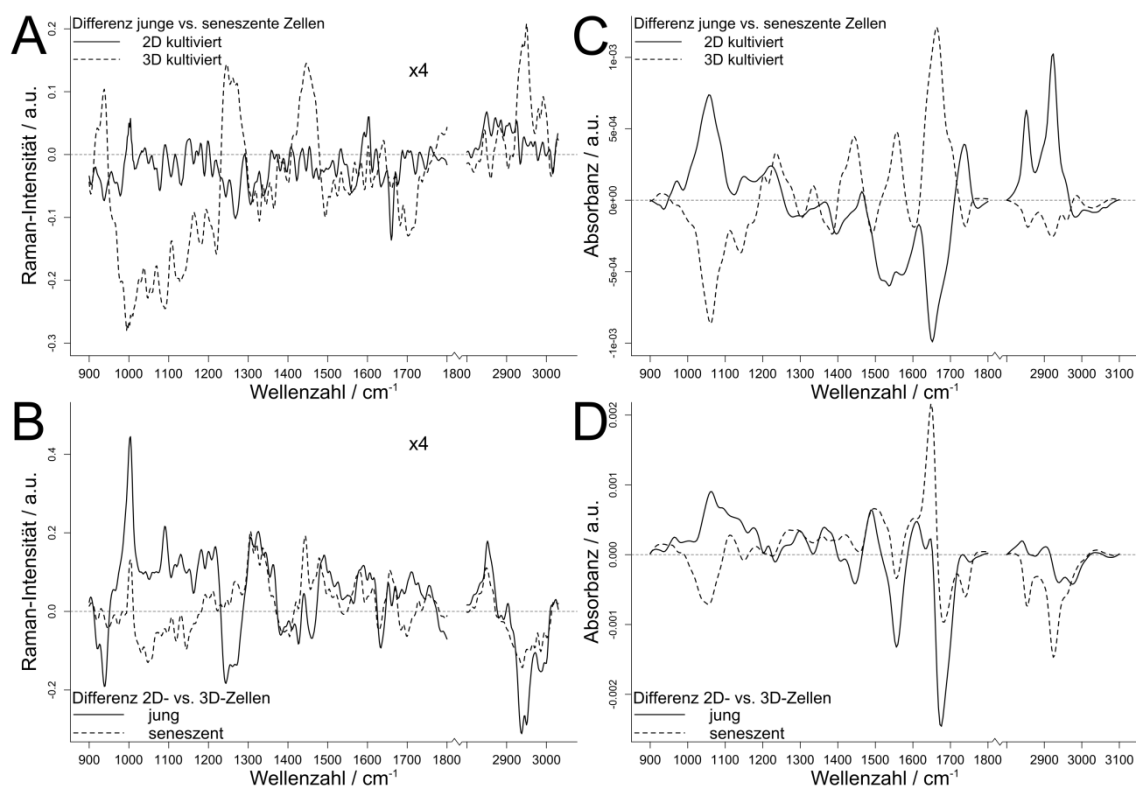


Abbildung 28: Raman- und FT-IR-Differenzspektren 2D- und 3D-kultivierter seneszenten Zellen.

Raman- (A, B) und FT-IR-Differenzspektren (C, D) aller 2D- bzw. 3D-kultivierter jungen gegen seneszenten Zellen (A, C) und aller jungen bzw. seneszenten 2D- gegen 3D-kultivierten Zellen (B, D). Zur besseren Veranschaulichung der Raman-Differenzspektren (A, B) ist der Spektralbereich von $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ um den Faktor vier erhöht.

3.2.3 Chemometrische Auswertung zu 2D- und 3D-kultivierten Zellen

Für die chemometrische Datenauswertung wurde ein PLS-LDA-Modell verwendet, um geringe spektrale Änderungen zwischen den zwei verschiedenen Kultivierungsumgebungen und beim Übergang in die Seneszenz zu identifizieren.

3.2.3.1 Vergleich der 2D- gegen die 3D-Zellkultivierung

Für die Raman- und FT-IR-Daten der 2D- und 3D-Zellkultivierungen wurde eine PLS-LDA durchgeführt. Die Koeffizienten, die mit der Separierung assoziiert wurden, konnten analog zu den Differenzspektren interpretiert werden. In Abhängigkeit der spektralen Bedeutung wurden die Koeffizienten gewichtet. Insgesamt wurden deutliche Unterschiede zwischen den zwei Kultivierungsmethoden beobachtet (siehe Abbildung 29). Die 2D- und 3D-kultivierten Zellen wurden ohne Überlagerung im LD-Raum deutlich voneinander separiert, entsprechend ihrer Koeffizienten (siehe Abbildung 29A und B). Negative Koeffizienten wurden 2D-kultivierten Zellen und positive Koeffizienten 3D-Modellen zugeordnet, unabhängig der Raman- oder FT-IR-Spektren. Über den gesamten Wellenzahlbereich der Raman- und FT-IR-Daten wurden ausgeprägte Koeffizienten ermittelt (siehe Abbildung 29C und D). Diese zeigten, dass sich die biochemischen Moleküle in den Zellen deutlich änderten. Innerhalb der Raman-Koeffizienten wurden spektrale Abweichungen um die Amid I-Bande (zwischen 1650 und 1500 cm^{-1}) und in der Amid III-Region (zwischen 1400 und 1200 cm^{-1}) deutlich, was auf Änderungen in der Proteinzusammensetzung hindeutete. Eine signifikante Intensitätsänderung wurde um 788 cm^{-1} ermittelt, assoziiert mit einer prominenten DNA-Bande, die häufig um 785 cm^{-1} zu beobachten ist. Weitere Koeffizienten wurden mit Nukleinsäuren in 2D-Zellkultivierungen um 1482 und 1578 cm^{-1} assoziiert. Die Koeffizienten der FT-IR-Daten bestätigten die offensichtlichen Unterschiede in der Proteinzusammensetzung. Besonders deutlich wurde dies im Nulldurchgang der Amid I-Bande (bei 1658 cm^{-1}) und der Amid II-Bande (um 1536 cm^{-1}). Ausgeprägte spektrale Änderungen zwischen 2D- und 3D-Zellkultivierungen wurden unterhalb von 1300 cm^{-1} beobachtet. Änderungen in Nukleotiden, Phosphaten und DNA-Gehalten wurden sichtbar, welche als verstärkte oder reduzierte Aktivität der Proliferation interpretierbar sind ¹⁸²⁻¹⁸⁴.

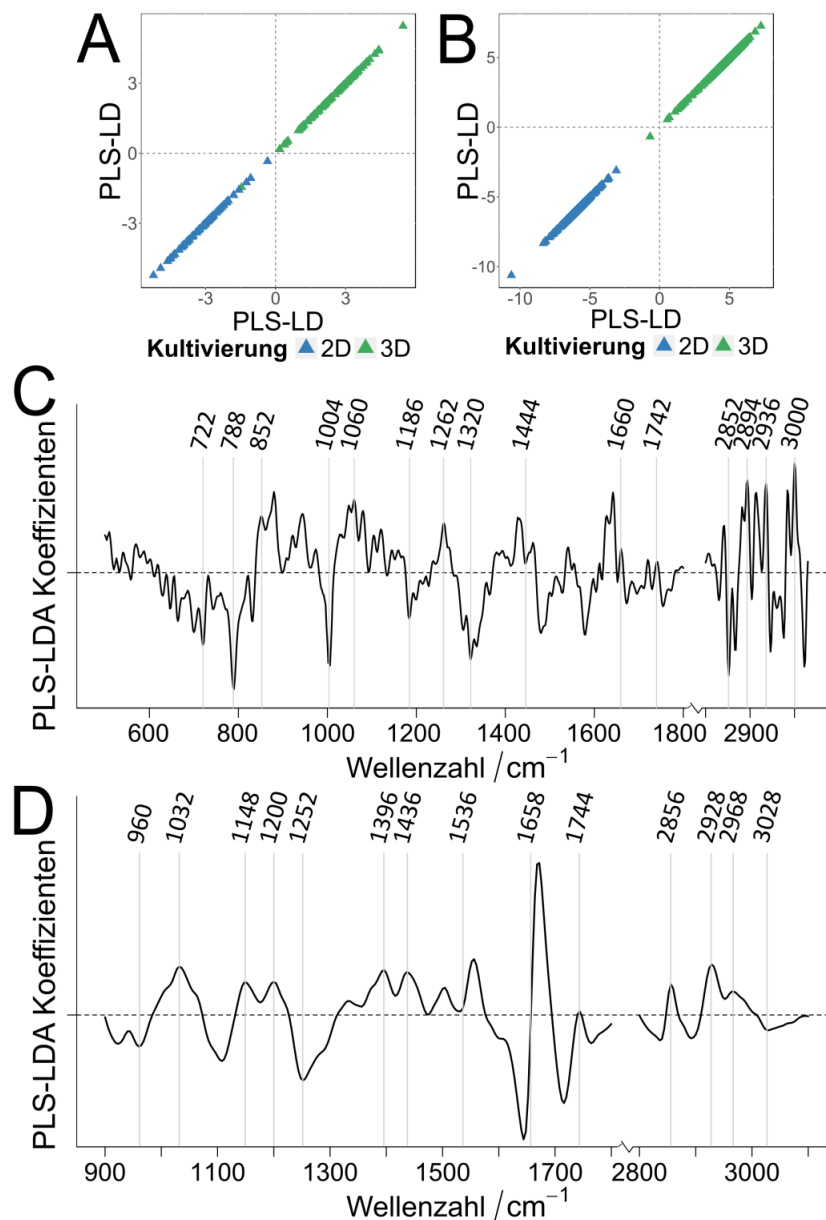


Abbildung 29: Altersgruppen-unabhängige Klassifikation 2D- gegen 3D-kultivierter Zellen. 2D- gegen 3D-kultivierte Zellen, klassifiziert mittels PLS-LDA für die Raman- (A, C) und FT-IR-Spektren (B, D). Darstellung der 2D- (blau) gegen die 3D-kultivierten Zellen (grün) im Streudiagramm (A, B), unabhängig der Altersgruppen (Passagen 4, 6, 7 und 20). Darstellung der Koeffizienten für die Raman- (C) und FT-IR-Daten (D). Gestrichelte Linien (A–D) zeigen die Nullwerte innerhalb der Graphen: Positive Koeffizienten sind oberhalb und negative unterhalb abgebildet (C, D).

Um Unterschiede zwischen 2D- und 3D-klassifizierten Zellen detaillierter zu betrachten, wurden für einzelne Passagen die Modellberechnungen separat durchgeführt (siehe Abbildung 30). Für die jungen (Passage 4) und seneszenten Zellen (Passage 20), im Vergleich der 2D- gegen die 3D-kultivierten Zellen, korrelierten erneut alle positiven Koeffizienten mit dem 3D-Modell und alle negativen mit den 2D-kultivierten Zellen (Streudiagramme nicht gezeigt). Die Klassifikation seneszenten Zellen nach RS ergab im Wellenzahlbereich kleiner 1200 cm⁻¹ deutlich ausgeprägtere und besser interpretierbare Klassifikationsmuster als die von proliferierenden Zellen (siehe Abbildung 30A).

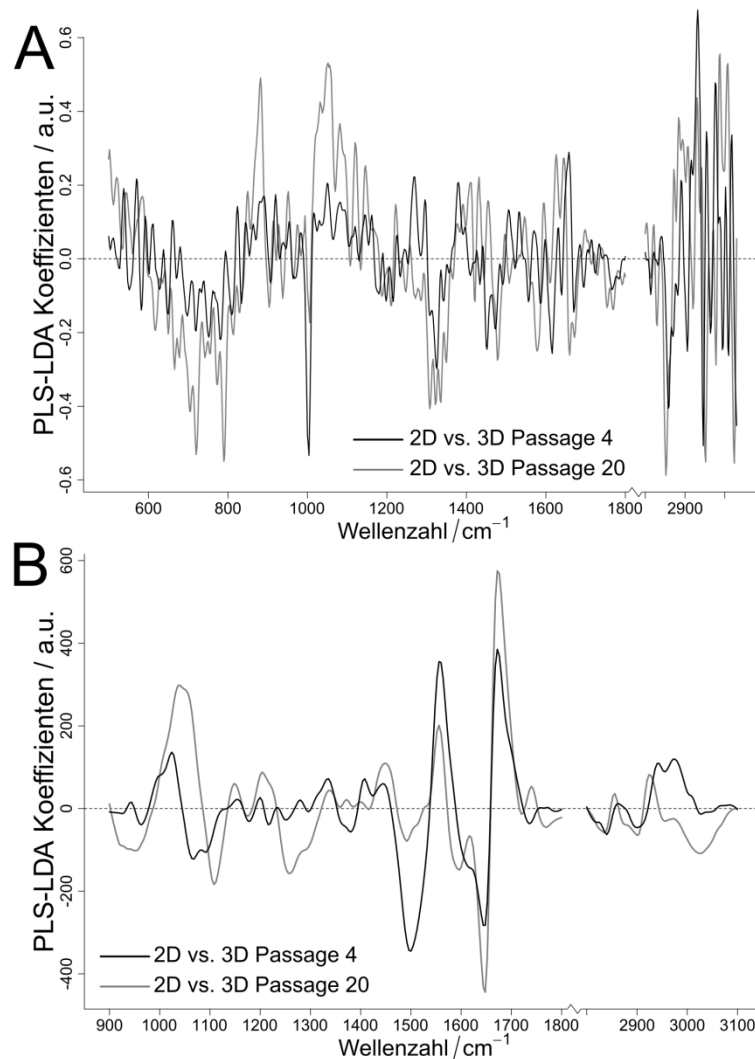


Abbildung 30: Passagen-abhängige Klassifikation 2D- gegen 3D-kultivierter Zellen.

Separate Klassifikation der 2D- gegen die 3D-kultivierten Zellen der Passage 4 (schwarz) und Passage 20 (grau) mittels PLS-LDA, für die Raman- (A) und FT-IR-Spektren (B). Gebildete Koeffizienten sind dargestellt.

Im Vergleich zur 2D-3D-Klassifikation aller Altersgruppen wurden deutlich ausgeprägtere Koeffizienten um 720 und 882 cm^{-1} und um die DNA-Bande um 788 cm^{-1} sichtbar. Das um 720 cm^{-1} für seneszente 2D-kultivierte Zellen charakteristische negative Koeffizientenmuster wurde mit RNA assoziiert. Die Bande um 1052 cm^{-1} wurde mit beiden Kultivierungsmethoden assoziiert, aber verstärkt für 3D-Modelle wahrgenommen. Diese Bande kann auf spektrale Proteinbeiträge zurückgeführt werden und kommt in Kollagen vor. 3D-kultivierte Zellen wiesen kleinere Koeffizientenwerte im Amid III-Bereich (um 1294 cm^{-1}) auf, welche Lipiden und Proteinen zugeordnet wurden.

Der Vergleich der FT-IR-Spektren, hinsichtlich der 2D- gegen die 3D-kultivierten Zellen der Passagen 4 und 20, ergab ebenfalls Unterschiede, die über den gesamten Wellenzahlbereich beobachtet wurden (siehe Abbildung 30B). Im Vergleich zu den Raman-Daten waren diese jedoch geringer. Die Region kleiner 1350 cm^{-1} wies auf Veränderungen im Gehalt und/oder der Zusammensetzung der DNA hin¹⁸²⁻¹⁸⁴. Weitere altersassoziierte Änderungen wurden mit Abweichungen in Proteinen

(Amid B um 3028 cm^{-1}) assoziiert. Im Vergleich der 2D- mit den 3D-kultivierten Zellen waren die spektralen Änderungen in Bezug auf Proteinzusammensetzungen nahezu identisch. Die Nulldurchgänge waren an identischen Positionen für die Amid I und II-Bande (jeweils um 1660 und 1540 cm^{-1}). Das war ein starkes Indiz dafür, dass die beobachteten Variationen im Proteingehalt der Zellen eher mit der Seneszenz einhergingen und unabhängig von den gewählten Kultivierungsbedingungen waren. Diese für einzelne Passagen berechnete PLS-LDA bestätigte die Veränderungen in den biochemischen Zusammensetzungen und Kompositionen. Zwar lieferte sie mehr spektrale Details, allerdings auf Kosten des Signal-Rausch-Verhältnisses, da weniger Spektren dem Modell zur Verfügung standen.

3.2.3.2 Vergleich des Übergangs in die Seneszenz in 2D- und 3D-kultivierten Zellen

Endogene und exogene Einflüsse verursachen die zelluläre Seneszenz und letztendlich die Hautalterung. Um die biochemischen Änderungen während des Übergangs in die replikative Seneszenz, d. h. endogen induzierte Änderungen, bei HDF Zellen zu bestimmen, wurden proliferierende und seneszente Zellen über aufsteigende Passagen innerhalb der 2D-Zellkultivierung verglichen. Gleichzeitig wurden die 2D-kultivierten seneszenten Zellen mit denen im 3D-Modell verglichen. Raman- und FT-IR-Spektren wurden anhand der PLS-LDA-Koeffizienten (PLS-LD1 und PLS-LD2) analysiert. Spektrale Unterschiede, assoziiert mit den biochemischen Veränderungen aufgrund des Alterungsprozesses, wurden individuell für junge (Passage 4, 6 bzw. 7) und seneszente Passagen (Passage 20) erforscht.

Der Alterungsprozess in den 2D-kultivierten Zellen wurde über die Passagen 4, 7 und 20 durch die PLS-LD1 gegen PLS-LD2 differenziert. Durch SA β -Gal-Färbung wurde die seneszente Passage identifiziert. Innerhalb der Raman- und FT-IR-Spektren separierte die PLS-LD1 die proliferierenden von den seneszenten Zellen, aufgrund negativer und positiver Koeffizienten (siehe Abbildung 31A und B). Die PLS-LD2 trennte die „reiferen“ jungen (Passage 7) von den sehr jungen Zellen (Passage 4). Der wesentliche Beitrag zur Differenzierung anhand der Koeffizienten im Raman-basierten Modell (siehe Abbildung 31C) wurde veränderten Proteinzusammensetzungen zugeschrieben. Diese waren durch Nulldurchgänge gekennzeichnet, hauptsächlich in der Amid I-Region. Das niedrige Signal-Rausch-Verhältnis der Raman-Daten verhinderte eine detailliertere Interpretation. Die Ursache des intrinsisch hohen Rauschens lag an der Morphologie der adhären 2D-kultivierten Zellen, welche ein weitestgehend stark ausgebreitetes und sehr dünnes Zytoplasma aufwiesen. Selbst das Mitteln der Raman-Spektren über die gesamte Zelle verbesserte nicht wesentlich das Signal-Rausch-Verhältnis. Dieser Nachteil der Raman-Daten wurde durch die Analyse der FT-IR-Daten überwunden.

Die Abgrenzung der Passagen 4, 7 und 20 durch die PLS-LDA wurde im Streudiagramm sichtbar, zusammen mit den assoziierten FT-IR-Koeffizienten (siehe Abbildung 31D). PLS-LD1 und PLS-LD2 zeigten die spektralen Veränderungen in den Positionen und Intensitäten der Koeffizienten, besonders in der Amid I und II-Region,

jeweils zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} und 1600 und 1500 cm^{-1} . Zusätzlich wurden erhebliche Änderungen in der PLS-LD2 bei Wellenzahlen kleiner als 1250 cm^{-1} wahrgenommen, welche in diesem Zusammenhang mit Veränderungen im Nukleinsäuregehalt assoziiert wurden. FT-IR-Koeffizienten bestätigten die in den Raman-Daten ermittelten Änderungen im Proteingehalt (Amid I und II jeweils um 1652 und 1576 cm^{-1}). In Übereinstimmung mit vorangegangenen Seneszenz-Untersuchungen in verschiedenen 2D-kultivierten Fibroblast-Zelllinien (BJ, IMR-90, MRC-5 und WI-38) waren die Untersuchungen der HDF-Zellen. Übergänge in die Seneszenz beruhten vorwiegend auf Änderungen im biomolekularen Erscheinungsbild von Proteinen und Lipiden, die Menge der Moleküle in den Zellen wurde weniger beeinflusst. Die spektralen Änderungen in den Raman-Daten wurden v. a. Änderungen in der Konformation von Strukturproteinen und vermuteten Lipidoxidationen zugeschrieben. Auch innerhalb der FT-IR-Spektren wurden Änderungen im Gehalt von Nukleinsäuren bzw. von DNA/RNA sichtbar, obwohl innerhalb der Koeffizienten keine direkte Zuweisung erfolgte.

Der Alterungsprozess von Zellen, die in einer 3D-Umgebung kultiviert wurden, konnte ebenfalls mittels Raman- und FT-IR-Spektroskopie verfolgt werden. Für die mit RS in einer wässrigen Umgebung vermessen Zellen innerhalb der 3D-Modelle variierten die Signalintensitäten innerhalb definierter räumlicher Bereiche (ca. 10 bis $20\text{ }\mu\text{m}$ unterhalb der Oberfläche des Modells) kaum. Diese wiesen besonders interzellulär ähnliche Signale auf. In dem bildgebenden spektroskopischen Verfahren wurden individuelle Zellen in der Bildebene von ca. $15\text{ }\mu\text{m}$ Eindringtiefe identifiziert. Anhand sichtbarer Zellkonturen wurden Einzelzellen identifiziert. An diesen erfolgte die Kalkulation der Raman-Mittelwertspektren für die Klassifikation zu den verschiedenen Passagen. Individuelle Zellkompartimente, z. B. Nuklei mit Nukleoli, wurden jedoch weniger deutlich innerhalb der Raman-Bilder der 3D-Modelle identifiziert im Vergleich zu den 2D-Zellkulturen.

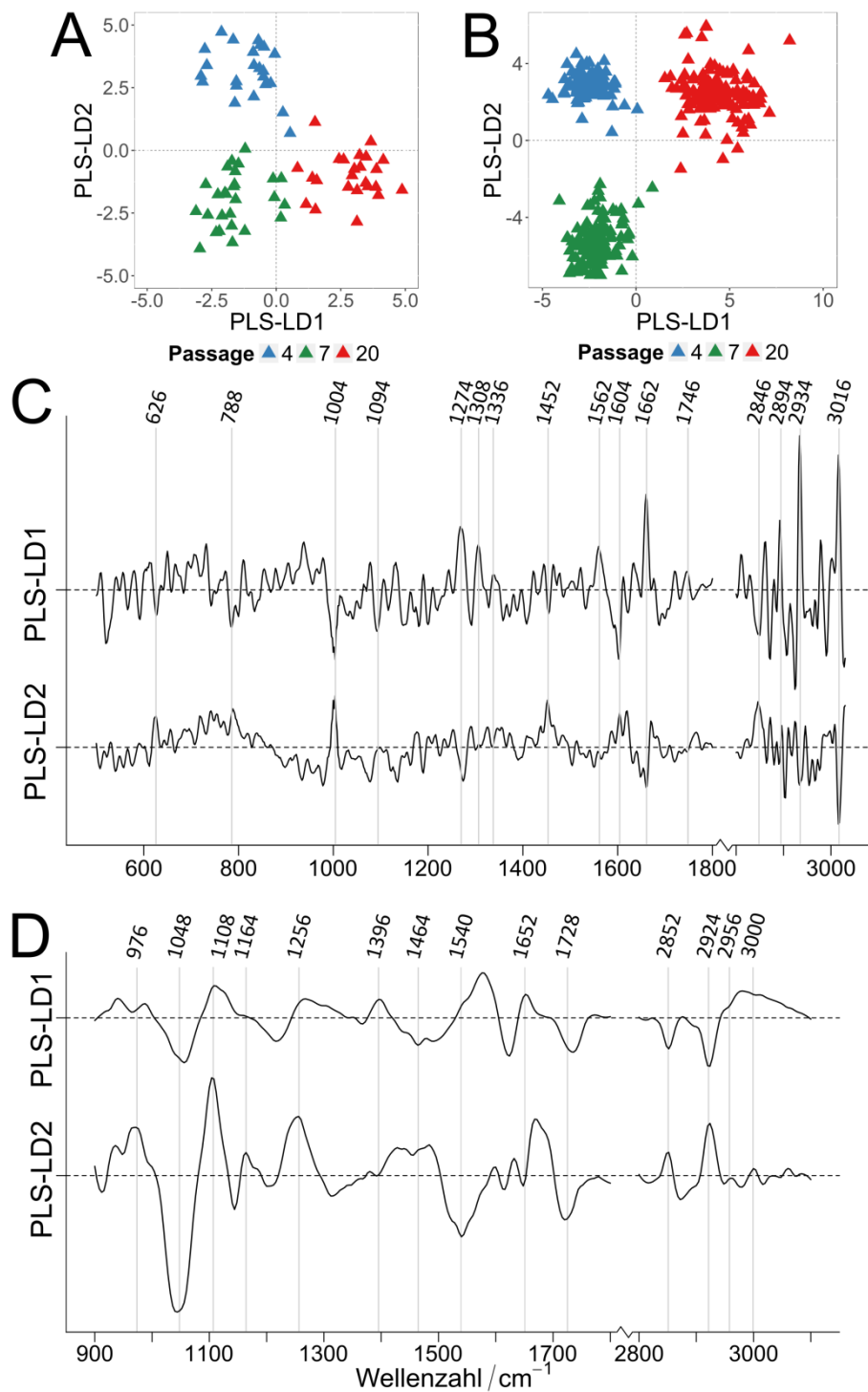


Abbildung 31: Klassifikation seneszenter 2D-kultivierter Zellen.

Klassifikation der 2D-kultivierten Fibroblastzellen (HDF) der Passagen 4, 7 und 20 der Raman- (A, C) und FT-IR-Spektren (B, D) mittels PLS-LDA. Im Streudiagramm graphische Darstellung der PLS-LD1 gegen die PLS-LD2 (A, B). Entsprechende Koeffizienten (C, D) der PLS-LD1 (oben) und PLS-LD2 (unten) sind abgebildet.

Die PLS-LDA-Klassifikation der Raman- und FT-IR-Daten der jungen (Passage 4 und 6) gegen die seneszenten HDF-Zellen (Passage 20) innerhalb des 3D-Modells (siehe Abbildung 32A und B) ähnelten der Klassifikation der 2D-kultivierten Zellen. Die Trennung der Raman-Spektren war allerdings in dem seneszenten 3D-Modell im Streudiagramm ausgeprägter (siehe Abbildung 32A) als mit 2D-Zellkultivierungen.

Dies galt besonders hinsichtlich abnehmender Intensitäten in den Koeffizienten (siehe Abbildung 32C). In beiden spektroskopischen Datensätzen wurden seneszente von jungen Zellen anhand positiver PLS-LD1 Koeffizienten separiert. Die Seneszenz-assoziierte Trennung innerhalb der Raman-spektroskopischen Daten offenbarte im 3D-Modell erneut geringe, aber reproduzierbare spektrale Unterschiede, die mit Proteinen (Amid I um 1682 cm^{-1}) assoziiert wurden. Im FT-IR-Datensatz wurden hinsichtlich der Klassifikation der 3D-Modelle große Ähnlichkeiten zu den Daten aus der 2D-Zellkultivierung im Streudiagramm ermittelt (siehe Abbildung 32B). Veränderungen in der Proteinzusammensetzung wurden in den Regionen der Amid I- und II-Banden sichtbar (siehe Abbildung 32D). Drastische spektrale Unterschiede wurden in der Wellenzahlregion kleiner 1250 cm^{-1} ermittelt. Das Bandenprofil der Koeffizienten ähnelte dem der 2D-kultivierten Zellen. Positive FT-IR-Koeffizienten, die mit seneszenten Zellen assoziiert wurden, wiesen auf höhere Gehalte von Nukleinsäuren (um 1060 und 1140 cm^{-1}) hin. Proteine, die der Amid II-Bande zugeordnet wurden, wurden bei 1524 cm^{-1} zusammen mit kleineren Merkmalen um 1600 und 1684 cm^{-1} ermittelt. Kombinationen aus Proteinen und Lipiden wurden um 1388 cm^{-1} beobachtet. In der Region der CH-Streckschwingung wurden keine dominanten Merkmale für seneszente Zellen (Passage 20) ermittelt, während negative Koeffizienten bei 2852 und 2924 cm^{-1} beiden proliferierenden Passagen (Passage 4 und 6) zugeordnet wurden. DNA/RNA-Bestandteile wurden ebenfalls mit diesen Passagen assoziiert. Ursächlich schienen funktionelle Gruppen in Phosphodiester-Verbindungen (um 1236 cm^{-1}) und Phospholipiden (um 1440 cm^{-1}) zu sein. Seneszenz-bezogene Unterschiede zwischen den 2D- gegen die 3D-kultivierten Zellen wurden innerhalb der Klassifikation für beide schwingungsspektroskopisch-gewonnen Datensätze sichtbar. Während 2D-kultivierte seneszente Zellen positive PLS-LD1 Koeffizienten für Lipide (1078 und um 1130 cm^{-1}) aufwiesen, wurden innerhalb der im 3D-Hautmodell untersuchten Zellen keine dieser charakteristischen Koeffizientenmuster beobachtet. Dies deutete auf deutliche Unterschiede in der alterungsbedingten biochemischen Regulierung zwischen 2D- und 3D-kultivierten Zellen hin.

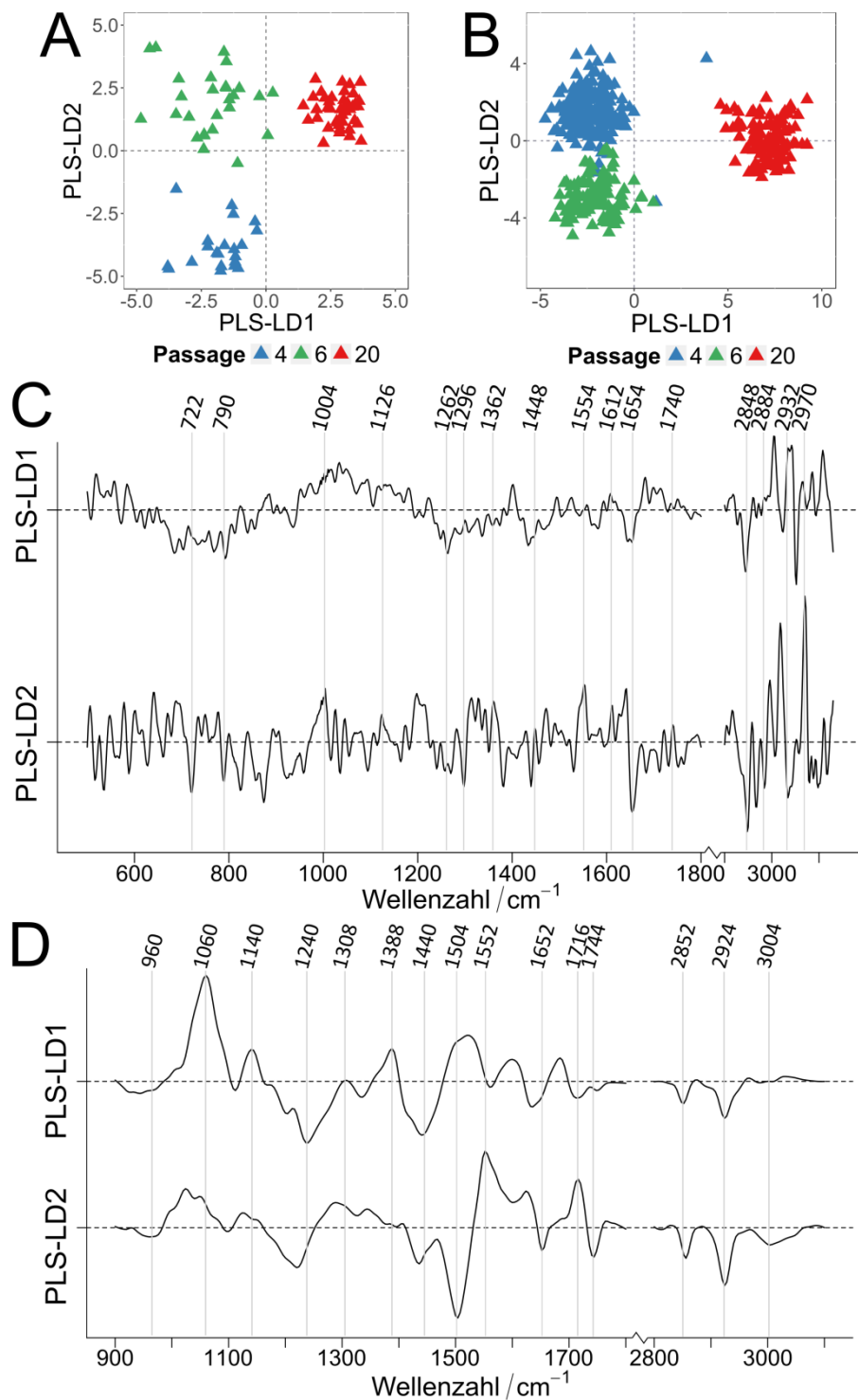


Abbildung 32: Seneszenz-abhängige Klassifikation der 3D-kultivierten Zellen.

Klassifikation der Raman- (A, C) und FT-IR-Spektren (B, D) mittels PLS-LDA der 3D-kultivierten Fibroblastzellen (FDM) der Passagen 4, 6 und 20. Im Streudiagramm (A, B) aufgetragene PLS-LD1 gegen PLS-LD2 und die jeweiligen Koeffizienten (C, D) der PLS-LD1 (oben) und PLS-LD2 (unten).

Basierend auf den Raman- und FT-IR-Daten wurden proliferierende und seneszente Zellen (Passage 4 und 20) vorhergesagt (siehe Abbildung 33A und B). Das PLS-LDA-Modell mit den zwei verschiedenen Passagen wurde mit 3D-kultivierten Zellen trainiert und auf 2D-kultivierte Zellen getestet. Die 2D-kultivierten Zelldaten wurden in das Modell der 3D-kultivierten Zelldaten projiziert. Passage 6 und 7 wurden aus der

Vorhersage ausgeschlossen, da diese trotz der tendenziell höheren Passagen als junge proliferierende Zellen eingeordnet wurden und zu falschen Vorhersagen führten. Proliferierende und seneszente Zellen konnten umgekehrt nicht für 3D-kultivierte Zellen vorhergesagt werden, wenn mit 2D-kultivierten Zellen trainiert wurde. Zusätzlich ergab eine Kreuzvalidierung der Passagen 4 und 20 der Raman-Daten eine Genauigkeit von 96 % für seneszente Zellen. Die Sensitivität und Spezifität dieser vorhergesagten Zellen betragen jeweils 95 und 98 %. Proliferierende Zellen, im Vergleich zu seneszenten Zellen, konnten unabhängig der Kultivierungsmethode minimal besser vorhergesagt werden. Die Genauigkeit der FT-IR-Daten betrug 98 % und die Sensitivität und Spezifität lag jeweils bei 97 und 100 %. Individuelle Berechnungen der seneszenten Zellen in 2D- oder 3D-Umgebungen ergaben eine Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % für die Raman- und FT-IR-Daten.

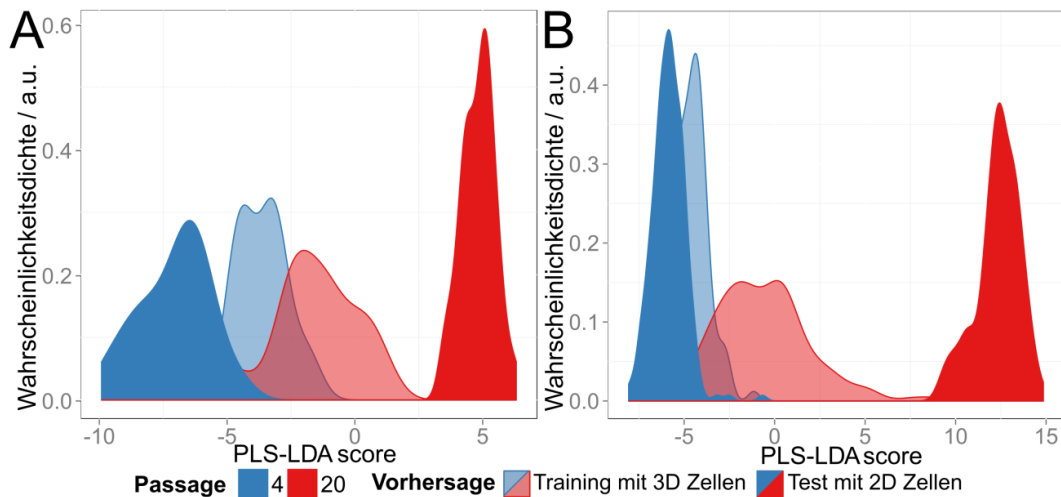


Abbildung 33: Vorhersage proliferierender und seneszenten 2D-kultivierter Zellen.

Vorhersage von Raman- (A) und FT-IR-spektroskopisch (B) vermessenen jungen (Passage 4 und 6; blau) und seneszenten (Passage 20; rot) 2D-kultivierten Zellen (HDF; intensive Farbe), welche anhand der 3D-Modelle (FDM) mittels PLS-LDA trainiert wurden (blasse Farbe).

3.2.4 Diskussion zur Seneszenz in 3D-Hautmodellen

Insgesamt bestätigten und erweiterten die statistischen Ergebnisse dieser Untersuchung die vorangegangenen Seneszenz-Untersuchungen an etablierten Fibroblast-Zelllinien in 2D-Zellkultivierungen. Verschiedene biochemische Effekte wurden in den Fibroblasten innerhalb der 3D-Modelle gegenüber der herkömmlichen 2D-Zellkultivierung identifiziert. Zudem bilden Zellen in 3D-Modellen phänotypische 3D-Strukturen aus, die den Strukturen in der Unterschicht der Haut entsprechen, einschließlich einer eher verkleinerten und bi-polarisierten, spindelförmigen Morphologie^{185,186}. Die Morphologie spiegelt Verlängerungen entlang größerer Kollagenbündel wider, die in dieser Form im Gewebe auftreten.

Gezeigt wurde, dass 3D-Hautmodelle aus Fibroblastzellen mittels markierungsfreier, nicht-invasiver und zerstörungsfreier Techniken zur Untersuchung

der replikativen zellulären Seneszenz geeignet sind. Beide hier verwendeten spektroskopischen Verfahren unterschieden 2D- und 3D-kultivierte Zellen. Verglichen mit den Raman-Daten war die Klassifikation anhand der FT-IR-Daten aufgrund des größeren Datensatzes und höherem Signal-Rausch-Verhältnis besser. Bestimmte spektrale Merkmale konnten auf die Kultivierungsmethode zurückgeführt werden. Unabhängig von der Messtechnik wurden Seneszenz-assoziierte Veränderungen hauptsächlich in den Proteinen und deren Zusammensetzungen festgestellt. Die Unterschiede aufgrund der Zellkultivierung waren in proliferierenden Zellen im Vergleich zu seneszenten weniger ausgeprägt. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass sich dermale Fibroblastzellen in einer 3D-Matrix biochemisch anders verhalten und anders altern als in einer 2D-Umgebung. Das deutet darauf hin, dass die Zellen in der menschlichen Haut erkennbare metabolische Unterschiede aufweisen, im Unterschied zu *in vitro* kultivierten Zellen.

Deutliche Unterschiede wurden in den Spektren hinsichtlich der Proteine beobachtet. Die spektroskopischen Auswertungen der 2D- und 3D-kultivierten Zellen sowie deren Alterungs-Effekte hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung individueller Zellen ergaben Änderungen in den Amid I- und III-Banden der Raman-Spektren sowie in den Amid I- und II-Banden der FT-IR-Spektren. In anderen Studien wurden Veränderungen in der Proteinzusammensetzung in alternden Zellen beobachtet. Mit zunehmendem Alter nimmt die mitochondriale ROS-Produktion zu, da die mitochondriale Funktion abnimmt und sich Mutationen in der mitochondrialen DNA anhäufen¹⁸⁷. Dies führt zu weiterer Beeinträchtigung der Funktion und letztendlich zu zusätzlicher Produktion von ROS. Große Mengen an ROS verursachen DNA- und Protein-Schäden¹⁸⁸. Auch Lipidperoxidationen werden ausgelöst. Zusammengenommen verursachen diese Schäden funktionelle und strukturelle Veränderungen. Dagegen werden durch Oxidation zellulärer Phospholipide und Proteine mitochondriale Dysfunktionen induziert¹⁸⁹. In älterer Haut nimmt der Umsatz in den Lipidmembranen ab¹⁹⁰. Dies wird als Konsequenz der ROS-Produktion und aufgrund verminderter Aktivitäten von Antioxidantien diskutiert. Das trägt zur chronologischen (Haut-) Alterung bei. Erhöhte Level an ROS induzieren in dermalen Fibroblasten Zellschädigungen, welche wiederum Seneszenz verursachen¹⁹¹. Tatsächlich wurden höhere Aktivitäten von Sauerstoffradikalen in älterer Haut festgestellt¹⁹⁰. Während der Zellalterung verursacht ROS verstärkt Bildungen von Proteinschäden durch Formierung von Carbonylproteinen und strukturellen Modifikationen in den Aminosäureseitenketten, wie z. B. Vernetzung, Entfaltung und Fragmentierung^{192,193}. Diese Veränderungen beeinflussen die Ordnung, Verteilung und Aktivität der Proteine und führen zu veränderten zellulären Funktionen. In alten Menschen liegen ca. 20–50 % des Gesamtproteins oxidiert vor und erhöhte Carbonylgehalte wurden beobachtet¹⁹⁴. Carbonylgruppen in Proteinen werden angesichts ihrer relativ frühen Bildung und Beständigkeit als geeignetere Moleküle zur Messung des oxidativen Stresses diskutiert als vergleichsweise Produkte der Lipidperoxidation¹⁹⁵. Folglich können Carbonylgehalte in Proteinen als Marker der Proteinoxidation verwendet werden¹⁹⁶. In der hier vorliegenden Arbeit wurden

Carbonyl-Änderungen innerhalb der damit assoziierten Amid I-Bande sichtbar, insbesondere innerhalb des Bereichs zwischen 1540 und 1660 cm^{-1} . Mittels FT-IR-Spektroskopie wurden zelluläre Schäden durch Oxidation festgestellt¹⁹⁷. Aufgrund möglicher ROS-Aktivitäten konnten Abnahmen in der Sekundärstruktur der Proteine, zusammen mit DNA-Veränderungen, beobachtet werden. In den 3D-Modellen der hier vorliegenden Arbeit wurden ähnliche spektrale Änderungen wahrgenommen, wie auch in den 2D-kultivierten Zellen, da radikal-induzierte DNA- und Protein-Oxidationen während der Seneszenz angenommen wurden.

Die Interpretation spektraler Veränderungen des Wellenzahlbereichs kleiner 1250 cm^{-1} ist schwieriger. Wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Kohlenhydrate konnten ausgeschlossen werden, da weder die Raman- noch die FT-IR-Koeffizienten typische spektrale Merkmale von Kohlenhydraten aufwiesen. Dieser Bereich ist charakteristisch für Nukleinsäuren und zeigt Änderungen aufgrund von Zellzyklus-assoziierten Übergängen und der Proliferation¹⁹⁸. Intensitätsveränderungen in den Banden der FT-IR-Koeffizienten um 1108 und 1252 cm^{-1} bzw. im Mittelwertspektrum um 1072 und 1236 cm^{-1} ähneln den Änderungen, die zuvor beobachtet wurden^{183,184}. Diese Banden sind sensitiv gegenüber dem enzymatischen RNA-Verdau¹⁸². Bekannt ist, dass oxidativ-bedingte DNA-Schäden in dermalen Fibroblastzellen mit dem Altern akkumulieren¹⁹⁹. ROS kann zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen²⁰⁰. Die Kapazität diese zu reparieren, nimmt mit zunehmendem Alter ab. Dies führt zu Chromatinveränderungen, welche wiederum Seneszenz induzieren. Raman- und FT-IR-Banden von DNA sind empfindlich gegenüber exogenem oxidativen Stress, welcher zu DNA-Schäden führt²⁰¹. In einem künstlichen Hautmodell führten strahleninduzierte Schäden in Zellen der Basalschicht zu charakteristischen Veränderungen in den DNA Raman-Banden²⁰². In der hier vorliegenden Arbeit wurde diese DNA-Bande ebenfalls beobachtet, allerdings für die 2D- und nicht für die 3D-kultivierten seneszenten Zellen. Ähnliche DNA-Veränderungen wie in der Seneszenz wurden in Raman-Banden nach Exposition mit Chemotherapeutika ermittelt²⁰³. Diese wurden mit DNA-Schäden assoziiert und indirekte Veränderungen wurden dem oxidativen Stress zugeordnet. Proteine und Lipide (um 1450 und 1665 cm^{-1}) werden zusätzlich beeinflusst. Während des Übergangs in die Seneszenz können die oxidativen Schäden der Ursprung dieser Veränderungen sein. Diese Unterschiede waren hauptsächlich in den 2D- und wesentlich geringer in den 3D-kultivierten Zellen sichtbar, was auf einen potentiellen Zellschutz in der 3D-Umgebung hindeutet. Mittels FT-IR-Spektroskopie wurden chemisch-induzierte Oxidationen besonders mit Veränderungen in Banden um 1013 und 1080 cm^{-1} korreliert, welche der nuklearen DNA-Fragmentierung zugeordnet wurden²⁰¹.

Voraussagen proliferierender und seneszenten Zellen demonstrierten die zelluläre Komplexität aufgrund der Umgebungs-abhängigen Kultivierung. Verglichen mit 2D-kultivierten Zellen wiesen proliferierende und senescente Zellen schärfere Kontraste innerhalb der 3D-Modelle auf. Dadurch konnten mit 3D-Strukturen trainierte Modelle 2D-kultivierte Zellen vorhersagen. Umgekehrt konnten jedoch die

komplexeren 3D-Modelle nicht vorhergesagt werden. Die metabolischen Eigenschaften der 2D-kultivierten Zellen waren zu verschieden, um diese als Modell für 3D-Zellsystemen zu verwenden. Die Daten der hier vorliegenden Arbeit demonstrierten, dass für die *in vivo* Nachahmung menschlicher Zellzustände wie der Seneszenz 3D-Zellstrukturen geeigneter sind, um altersassoziierte Veränderungen zu untersuchen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass markierungsfreie schwingungsspektroskopische Techniken, RS und FT-IR-Spektroskopie, die Analyse von 3D Zellaggregaten ermöglichten, insbesondere von humanen Hautmodellen. Innerhalb der 3D-kultivierten Zellen wurden senescente von proliferierenden Zellen deutlich mittels RS und FT-IR unterschieden. Seneszenz-assoziierte Veränderungen in Proteinen und Nukleinsäuren wurden mit beiden Techniken detektiert. Ein verändertes biochemisches Verhalten der 3D- verglichen mit den 2D-kultivierten Zellen wurde identifiziert. Aufgrund der 3D-Struktur verhalten sich menschliche Zellen demzufolge *in vivo* anders als in der (2D) Zellkultivierung *in vitro*. Verglichen zu den 2D-kultivierten Zellen wiesen in 3D-Modellen die Zellen schärfere Kontraste zwischen proliferierenden und seneszenten Zuständen auf. Diese beruhten hauptsächlich auf biochemischen Änderungen im gesamten Proteom. Die Ergebnisse demonstrierten, dass 3D-Hautmodelle aus Fibroblastzellen zur Untersuchung induzierter replikativer zellulärer Seneszenz mittels markierungsfreier und prinzipiell nicht-invasiver und zerstörungsfreier Techniken geeignet sind, da diese *in vivo*-ähnliche Hautstrukturen nachahmen. Weil mittels RS auch Tumorzellen von gesunden Zellen unterschieden werden können, eignet sich diese Technik für nicht-invasive medizinische Hautdiagnostikstudien²⁰⁴.

3.3 Vergleich der Quieszenz gegen die Proliferation und Seneszenz innerhalb einer Fibroblast-Zelllinie

Junge BJ-Fibroblastzellen (PD 28) wurden durch Kontaktinhibierung oder Serumentzug in die Quieszenz überführt. Genau wie proliferierende und senescente Zellen wurden kontaktinhibierte Zellen unter gleichen Mediumbedingungen inkubiert. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der molekularen Signaturen innerhalb der Raman- und FT-IR-Spektren. Zell-Zell-Kontakte bewirkten den Zellzyklusarrest. Für den Serumentzug wurde FBS im Medium von 10 auf 0,1 % reduziert. Die veränderten Wachstumsbedingungen führten, einschließlich des Zellzyklusarrests, zu erheblichen Umprogrammierungen in den Zellen. Dies wiederum beeinflusste die Häufigkeit und Zusammensetzung von Biomolekülen.

3.3.1 Beobachtungen zu quieszenten Zellen

Der Übergang proliferierender BJ-Zellen in die kurzfristig- (7 und 14 Tage) und langfristig-induzierte (100 Tage) Quieszenz, entweder durch Kontaktinhibierung oder Serumentzug, wurde durch prozentuale Messungen SA β -Gal-positiv gefärbter Zellen verfolgt (siehe Abbildung 34). Die Zellzustände Proliferation, Quieszenz und Seneszenz wurden verglichen. Kurzfristig-induzierte Quieszenz wies im Vergleich zur Proliferation geringfügig höhere Anteile an SA β -Gal-positiv gefärbten Zellen auf, unabhängig von der Induktion. Nach 14 Tagen waren ca. 15 % aller quieszenten Zellen positiv gefärbt. Aus der Quieszenz nach 14 Tagen zurückgewonnene Zellen nahmen die Proliferation innerhalb der nächsten drei Tage wieder auf. SA β -Gal-positiv gefärbte zurückgewonnene Zellen wiesen Werte von jeweils <6 und <2 % nach Kontaktinhibierung und Serumentzug auf. Nach 100 Tagen langfristig-induzierter Quieszenz, durch Kontaktinhibierung und Serumentzug waren mehr als 60 % der Zellen SA β -Gal-positiv gefärbt. Im Vergleich dazu, erreichten permanent proliferierende BJ-Zellen den seneszenten Zustand bei einer PD von ~ 72 . Mehr als 85 % dieser Zellen waren SA β -Gal-positiv gefärbt (nicht gezeigt; ähnlich der Abbildung 9B). Die am häufigsten gefärbten Zellen, einschließlich der SA β -Gal-Färbung, wurden für Fibroblastzellen im seneszenten Zustand ermittelt⁸⁹. Nach 100 Tagen Quieszenz und weiteren drei Tagen unter normalen Zellkulturbedingungen reduzierten sich die Anteile an SA β -Gal-positiv gefärbten Zellen innerhalb der Kontaktinhibierung und des Serumentzugs auf jeweils <5 und <15 %. Insgesamt wurden mit zunehmender quieszenter Kultivierung zelluläre Vorgänge und daher molekulare Eigenschaften stärker beeinflusst, sichtbar anhand der Zunahmen der positiv-gefärbten Zellen. Kurzfristig-induzierte und nach jeweils 14 und 100 Tagen zurückgewonnene quiescente Zellen waren vergleichbar mit den Zellen, die sich im Übergang in die Seneszenz (von PD 42 zu 52) befanden. Die SA β -Gal-Färbungen entsprachen denen „später“ mittelalter Zellen während des Übergangs in die Seneszenz, verglichen mit den Seneszenz-Untersuchungen in verschiedenen Fibroblast-Zelllinien. Langfristig-induzierte Quieszenz, verglichen anhand der SA β -Gal-Werte, erreichte nach 100 Tagen einen zur

Seneszenz-entsprechenden PD von ≥ 68 . Dies entsprach den „jüngsten“ seneszenten Zellen.

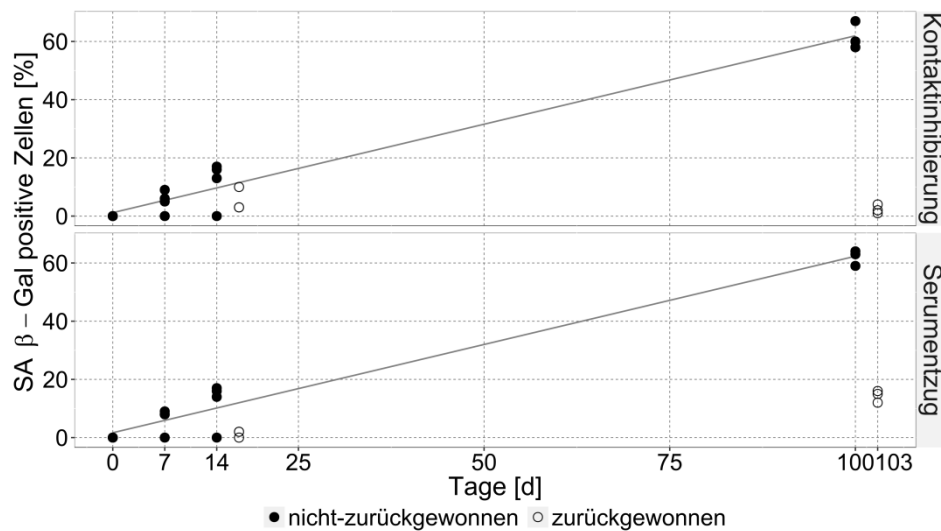


Abbildung 34: SA β -Gal-Färbungen quieszenter Fibroblastzellen.

Angegebener prozentualer Anteil an SA β -Gal-positiv gefärbten quieszenten Zellen nach der Kultivierungsdauer in Tagen. Induktion erfolgte durch Kontakthibrierung (oben) und Serumentzug (unten). Nach 14 und 100 Tagen aus der Quieszenz „zurückgewonnene“ Zellen (ungefüllte Kreise). Erneute Proliferation erfolgte durch Kultivierung für drei Tage unter normalen Bedingungen. Vergleich mit den in der Quieszenz verbliebenen Zellen („nicht zurückgewonnen“; gefüllte Kreise). Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Einfachmessung und der experimentelle Fehler aller Messwerte beträgt ca. $\pm 10\%$.

3.3.2 Raman- und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen verschiedener Zellzustände

Fixierte Zellen wurden mit bildgebender RS sowie nach anschließender Trocknung mit FT-IR-Spektroskopie untersucht. Die von den Einzelzellen gemittelten Raman-Spektren sowie die FT-IR-Spektren wurden mittels PLS-LDA nach den zu untersuchenden Zellzuständen Proliferation, Seneszenz und Quieszenz, der Kultivierungsdauer in Tagen und der Art der quieszenten Induktion (Kontakthibrierung gegen Serumentzug) klassifiziert. Da die Quieszenz mit der Proliferation und Seneszenz verglichen werden sollte, bezog sich die folgende Auswertung auf kontakthibrierte quieszente Zellen. Diese wurden unter gleichen Medienbedingungen wie proliferierende und seneszente Zellen kultiviert, was einen direkten Vergleich zwischen zellulären und molekularen Veränderungen ermöglichte. Der Serumentzug wurde dennoch im Vergleich zur Kontakthibrierung experimentell analysiert.

3.3.2.1 Kontaktinhibierte quieszente Zellen im Vergleich zur Proliferation und Seneszenz

Mittels bildgebender RS und Aufnahmen am FT-IR-Mikroskop wurden morphologische Veränderungen von proliferierenden im Vergleich zu seneszenten und quieszenten Zellen beobachtet (siehe Abbildung 35). Deutlich sichtbar waren Zellgrößenänderungen. Zunahmen wurden von proliferierenden hin zu seneszenten Zellen beobachtet, während Abnahmen für kontaktinhibierte quieszente Zellen beobachtet wurden. Langzeitkultivierte, kontaktinhibierte quieszente Zellen wiesen im Vergleich zu kurzzeitkultivierten Zellen die gleiche Zellkonfluenz von mehr als 90 % auf. Seneszente Zellen wiesen dagegen eine geringe Konfluenz auf den Objektträgern auf (ca. 50 %). Innerhalb der Raman-Bilder wurden lipidhaltige Akkumulationen in Form von Tröpfchen, angeordnet um den Nukleus herum, in seneszenten aber auch langzeitkultivierten quieszenten Zellen detektiert.

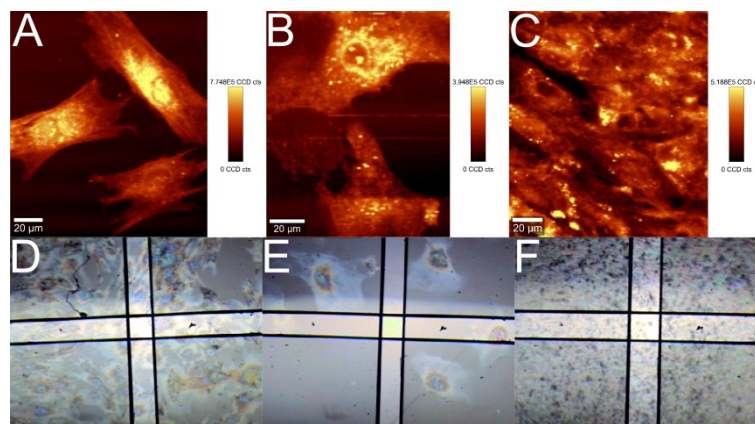


Abbildung 35: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen verschiedener Zellzustände.

Raman-Bilder (A–C) und mikroskopische Aufnahmen (Reflektionsmodus; D–F) proliferierender (PD 28; A, D), seneszenten (PD 70; B, E) und langfristig-induzierter quieszenten Zellen (100 Tage Kontaktinhibierung; C, F). Die Bildgebung der Raman-Bilder (A–C) basiert auf der Intensität der CH-Streckschwingung von $2800\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$. Die Öffnung der Blende (ca. $50\times 50\text{ }\mu\text{m}$) ist als schwarze Linie innerhalb der Aufnahmen sichtbar (D–F).

Gegenüber den langzeitkultivierten quieszenten Zellen wiesen die im Vergleich als Kontrollzellen untersuchten proliferierenden bzw. seneszenten Zellen charakteristische spektrale Banden innerhalb der gemittelten Raman-Spektren und der FT-IR-Spektren auf (siehe Abbildung 36). Zwischen $600\text{--}1800$ und $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ wurden Raman-Banden bzw. zwischen $900\text{--}1800$ und $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ FT-IR-Banden den Hauptbestandteilen der Zelle zugeordnet: Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten. Die Zuordnung der jeweiligen Raman- und FT-IR-Banden ist im vorherigen Kapitel 3.1 bereits als Überblick dargestellt (siehe Tabelle 5 und Tabelle 8, sowie siehe Anhang Tabelle 21) und in der Literatur ausführlich beschrieben^{152,153}.

Gemittelte Raman-Spektren proliferierender Fibroblastzellen zeigten gegenüber langzeitkultivierten quieszenten Zellen im gesamten Wellenzahlbereich Übereinstimmungen, aber auch Intensitäts-bedingte Unterschiede bezüglich der biochemischen Zusammensetzung (siehe Abbildung 36A). Besonders um 786, 938 und

958 cm^{-1} , zwischen 1032 und 1126 cm^{-1} und zwischen 1304 und 1338 cm^{-1} , 1576, 2888 und 2934 cm^{-1} wurden Veränderungen deutlich. Assoziationen mit den Phasen des Zellzyklus bzw. (reversiblen) Zellzyklusarrests wären möglich, da diese Unterschiede im Zellmetabolismus bedingen. Ebenfalls in der Phase des (irreversiblen) Zellzyklusarrests befanden sich seneszente Zellen. Im unteren Wellenzahlbereich wiesen diese jedoch große Abweichungen gegenüber den beiden anderen Zellzuständen auf. Deutlich sichtbar dominierten Untergrundbeiträge im Bereich von ca. 800–1140 cm^{-1} , 1200–1400 cm^{-1} und 1500–1640 cm^{-1} auf, welche durch Fluoreszenz verursacht sein könnten. Andererseits wurden gute spektrale Übereinstimmungen seneszenten Zellen im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen ermittelt (siehe Kapitel 3.1). Insgesamt wurden Abweichungen seneszenten Zellen gegenüber proliferierenden bzw. quieszenten Zellen um 1264, 1304, 1334, 1448, 1576, 1606, 1656, 2888, 2932 und 3004 cm^{-1} deutlich. Festgestellt wurde, dass Nukleinsäuren (788 und 1576 cm^{-1}) in quieszenten Zellen gegenüber proliferierenden und seneszenten Fibroblastzellen herunterreguliert wurden. Proteine (1658 cm^{-1}) und Lipide (2934 cm^{-1}) wurden leicht hochreguliert.

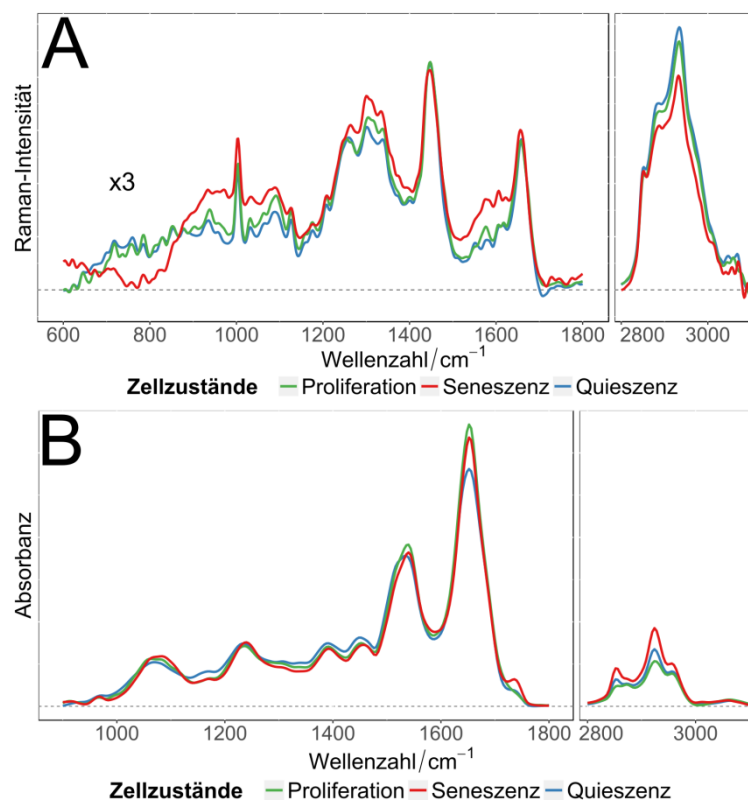


Abbildung 36: Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren verschiedener Zellzustände.

Raman- (A) und FT-IR-Mittelwertspektren (B) proliferierender (PD 28; grün), seneszenten (PD 70; rot) und quieszenten (100 Tage Kontaktinhibierung, PD 28; blau) Zellen. Zur besseren Veranschaulichung der Raman-Spektren (A) ist der Spektralbereich von 600–1800 cm^{-1} um den Faktor drei erhöht.

Dagegen wiesen die FT-IR-Spektren proliferierender, seneszenten und quieszenten Zellen geringfügige Änderungen im gesamten Wellenzahlbereich auf (siehe Abbildung 36B). Besonders um 1068, 1168, 1392, 1450, 1540, 1652, 1732, 2852, 2924 und 2956 cm^{-1} wurden Veränderungen in der biochemischen Gesamtzusammensetzung

beobachtet. Diese können, wie bei den Raman-Spektren auch, mit Phasen des Zellzyklus bzw. Zellzyklusarrests verbunden werden. Seneszente Zellen wiesen innerhalb der FT-IR-Spektren keine großen Abweichungen auf. Auch wurden erhebliche spektrale Übereinstimmungen seneszenten Zellen im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen an verschiedenen Fibroblastzellen beobachtet (siehe Kapitel 3.1). Insgesamt wurden in quieszenten Zellen gegenüber proliferierenden Zellen Nukleinsäuren (um 1080 cm^{-1}) geringfügig und Proteine (1652 cm^{-1}) stärker herunterreguliert. Lipide (1732 , 2852 und 2924 cm^{-1}) wurden hochreguliert. Gegenüber seneszenten Zellen waren die quieszenten Zellen bezüglich dieser im Mittelwertspektrum sichtbaren Protein- und Lipid-Veränderungen weniger stark hoch- bzw. herunterreguliert. Dies deutete auf veränderte biochemische Zusammensetzungen in Abhängigkeit der Zellzustände hin. Für die erwartungsgemäß schwerer zu interpretierenden Mittelwertspektren erwies sich die Regressionsanalyse aufgrund der Datenreduktion und der einfacher zu interpretierenden Komponenten als geeigneter.

Für die chemometrische Datenauswertung mittels PLS-LDA wurden vier LV verwendet, welche die spektrale Varianz der Raman-Daten mit $\sim 88\%$ bzw. die der FT-IR-Daten mit $\sim 94\%$ beschrieben. Die drei verschiedenen Zellzustände Proliferation, Seneszenz und Quieszenz wurden durch die PLS-LD1 gegen die PLS-LD2 anhand der Raman- und FT-IR-Spektren deutlich voneinander separiert (siehe Abbildung 37A und B). Beide Datensätze stimmten in der Klassifikation überein. Jedoch spiegelten die FT-IR-Daten, aufgrund des größeren Datenumfangs, Abweichungen vom jeweiligen Klassenmittelpunkt besser wider. Die innerhalb der Raman-Spektren beobachteten Abweichungen der Basislinie (unterhalb von 1200 cm^{-1}) hatten keinen Einfluss auf die Klassifikation der drei Zellzustände, als dieser Wellenzahlbereich aus der Modellbildung herausgelassen wurde (nicht gezeigt). Zudem wurden die quieszenten Zellen in der Klassifikation der drei Zellzustände unabhängig der Art der quieszenten Induktion separiert (nicht gezeigt). Für die drei Zellzustände wurden insgesamt deutliche Unterschiede im gesamten Spektralbereich gefunden. Die PLS-LD1 separierte die seneszenten Zellen gegenüber den proliferierenden und quieszenten Zellen. Die PLS-LD2 trennte v. a. die quieszenten Zellen gegenüber den beiden anderen Zuständen ab. Deutlich wurde der Seneszenz-bedingte Fluoreszenzuntergrund im unteren Wellenzahlbereich der PLS-LD1 in den Raman-Daten (siehe Abbildung 37C). Veränderungen zu den Molekül-Häufigkeiten und den Konformationsänderungen wurden aufgrund von Intensitätsänderungen und geänderter Bandenpositionen ermittelt. Quieszenz-assoziierte Unterschiede wurden den negativen Koeffizienten der PLS-LD2 zugeordnet und innerhalb der Raman-Daten über den gesamten Wellenzahlbereich wahrgenommen, während für die FT-IR-Daten diese v. a. ab 1500 cm^{-1} beobachtet wurden. Auffällig waren Änderungen in den Proteinen quieszenter gegenüber proliferierender und seneszenten Zellen. Innerhalb der Raman-Koeffizienten wurden Kollagen-bezogene Banden (662 cm^{-1} und Amid I um 1662 cm^{-1}) und eine ausgeprägte Amid III-Bande (1260 cm^{-1}) beobachtet, welches auf Strukturänderungen hindeutete. Änderungen wurden besonders in den Aminosäureseitenketten (Tyrosin um 1512 cm^{-1}) und weniger in der Amid I-Bande (um 1624 cm^{-1}) der FT-IR-Daten erfasst. Besonders

im oberen Wellenzahlbereich wiesen Änderungen der CH-Streckschwingungen auf Lipidveränderungen zwischen den Zellzuständen hin.

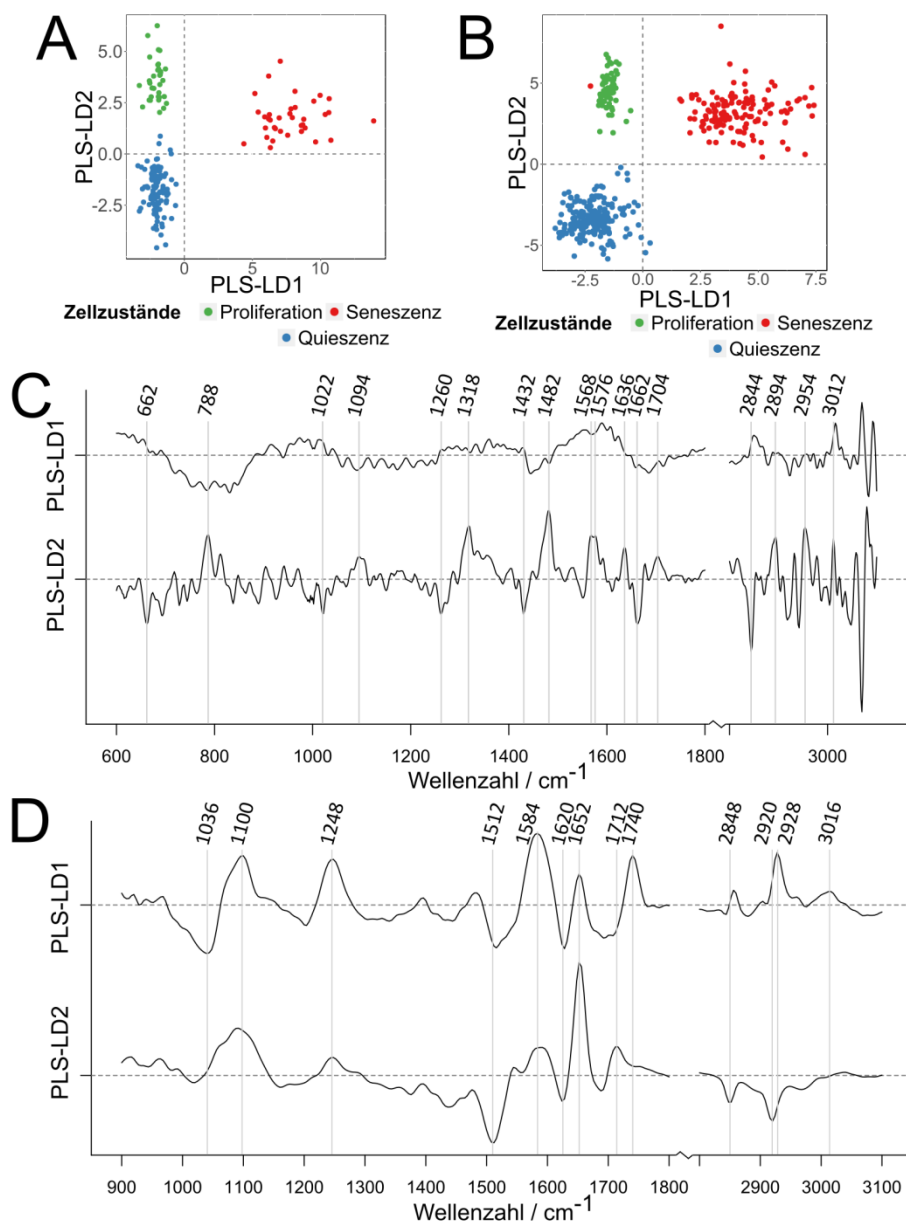


Abbildung 37: Klassifikation quieszenter Zellen gegen proliferierende und seneszente Zellen. Klassifikation mittels PLS-LDA der Raman- (A, C) und FT-IR-Daten (B, D) von verschiedenen Zellzuständen in Fibroblastzellen: Proliferation (PD 28; grün), Seneszenz (PD 70; rot) und Quieszenz (100 Tage Kontaktinhibierung, PD 28; blau). PLS-LD1 gegen PLS-LD2 im Streudiagramm (A, B) und die jeweiligen Koeffizienten (C, D): PLS-LD1 (oben) und PLS-LD2 (unten).

In quieszenten Zellen wurden deutliche Lipid-Banden innerhalb der RS- und FT-IR-Koeffizienten beobachtet (RS ab 2800 cm^{-1} bzw. FT-IR um 1436 cm^{-1} , 2848 und 2920 cm^{-1}). Beiträge aus DNA und/oder RNA (1428 cm^{-1}) und geringfügig von Glykogen (1022 cm^{-1}) wurden zusätzlich innerhalb der RS-Klassifikation beobachtet. Dagegen wurden für proliferierende und seneszente Zellen Änderungen innerhalb der positiven Koeffizienten der PLS-LD2 und PLS-LD1 erfasst. Diese bezogen sich vorwiegend auf Protein- und Lipid-Bestandteile. Besonders für Proteine wurden

Veränderungen in den Amid I-Strukturen (RS-Daten: 1636 cm^{-1} ; FT-IR-Daten: 1652 cm^{-1}) und in Aminosäureseitenketten (Asparagin- und Glutaminsäuren, RS-Daten: 1704 cm^{-1} ; FT-IR-Daten: 1584 cm^{-1}) ermittelt. Die Amid I-Bande wurde innerhalb der FT-IR-Daten mit α -helikalen Strukturen assoziiert, während in den RS-Daten diese in Kombination mit β -Faltblattstrukturen auftraten. Im oberen Wellenzahlbereich wurden geänderte Lipidzusammensetzungen ermittelt, woraufhin seneszente (RS-Daten 2848 und 3012 cm^{-1} bzw. FT-IR-Daten um 1740 , 2852 und 2928 cm^{-1}) gegenüber proliferierenden Zellen (RS-Daten 2894 und 2954 cm^{-1}) unterschieden wurden. Zudem wurden Beiträge von Nukleinsäuren (RS-Daten: 788 , 812 , 1094 , 1318 , 1482 und 1572 cm^{-1} ; FT-IR-Daten: 1248 cm^{-1}) ermittelt. Diese wurden mit proliferierenden Zellen assoziiert. Einzig in den FT-IR-Koeffizienten wurden ausgeprägte Kohlenhydrat-Banden beobachtet (1036 und 1100 cm^{-1}) und den proliferierenden Zellen zugeordnet.

Die Kreuzvalidierung für die proliferierenden, seneszenten und kontakthibierten 100 Tage alten quieszenten Zellen ergab eine Genauigkeit von jeweils 99 % für die Raman- und FT-IR-Daten (siehe Tabelle 11). Sensitivität und Spezifität dieser Zellen wurden mit mindestens 99 % innerhalb beider Datensätze ermittelt.

Tabelle 11: Kreuzvalidierung zu den untersuchten Zellzuständen.

Berechnet anhand der Raman- und FT-IR-Daten mittels zehnfacher Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen.

Zellzustände	Sensitivität			Spezifität			Genauigkeit
	Proliferation	Seneszenz	Quieszenz	Proliferation	Seneszenz	Quieszenz	
Raman [%]	99	100	99	99	100	99	99
FT-IR [%]	100	99	99	99	99	100	99

Die in den ROC-Kurven gezeigte Sensitivität und Spezifität der proliferierenden, seneszenten und quieszenten Zellen bezog sich auf die getestete Modellstabilität der drei bzw. zwei unabhängigen Proben-Batches innerhalb der Raman- und FT-IR-Datensätze (siehe Anhang Abbildung 51). Die Vorhersagen wurden anhand des zugrundeliegenden PLS-LDA-Modells mittels *leave-one-Batch-out*-Kreuzvalidierung durchgeführt. Im Modell ermittelte *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeiten gaben an, welche Spektren in die spezifischen Klassen gehörten. Überschritten die Wahrscheinlichkeitswerte einen bestimmten Schwellenwert, wurden Spektren in entsprechende Klassen zugeordnet. Anhand der variierenden Schwellenwerte wurden die ROC-Kurven erzeugt. Bezüglich der Zellzustände wurden verschiedene Modellqualitäten sichtbar, von ideal bis zufällig ratend, wobei letzteres dominierte. In Raman-basierten Modellen wurden seneszente Zell-Batches nahezu fehlerfrei eingeordnet, während bei FT-IR-Modellen dies für quieszente aber nicht für seneszente Zell-Batches der Fall war. Insgesamt lieferten die Modelle hinsichtlich der Raman- und FT-IR-Untersuchungen ähnlich Klassifikationsergebnisse, jedoch waren diese inkonsistent bezüglich der Untersuchungstechniken. Möglicherweise trägt der dominante Untergrund in den Raman-Spektren zu den Unterschieden zwischen Raman- und FT-IR-Daten bei.

3.3.2.2 Zeitlicher Verlauf kontaktinhibierter quieszenter Zellen

Durch Kontaktinhibierung erzeugte quieszente Zellen wurden über einen Zeitraum von 100 Tagen in der Phase des reversiblen Zellzyklus belassen und spektroskopisch untersucht. Durch die unterschiedliche Kultivierungsdauer konnte der Beginn (0 Tage), die kurzfristig- (7 und 14 Tage) und langfristig-induzierte Quieszenz (100 Tage) anhand von Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren verglichen werden. Geringfügige Abweichungen zwischen den kurz- und langzeitkultivierten quieszenten Zellen wurden innerhalb der jeweiligen Mittelwertspektren beobachtet (siehe Abbildung 38).

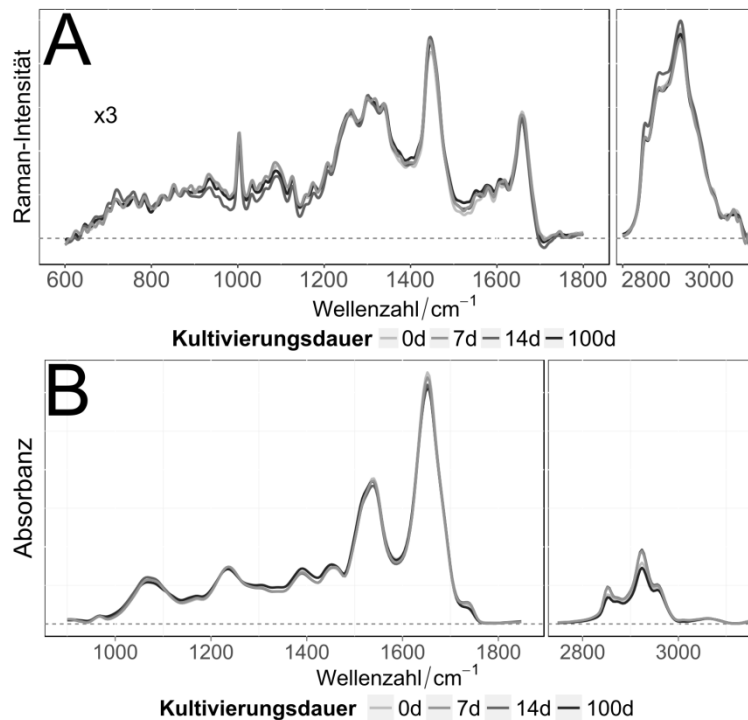


Abbildung 38: Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren kurz- und langzeitkultivierter quieszenter Zellen. Raman- (A) und FT-IR-Mittelwertspektren (B) quieszenter Zellen (nach Kontaktinhibierung, PD 28). Aufgetragene Kultivierungsdauer von 0 Tagen (Beginn der Kurzzeitkultivierung), 7 und 14 Tagen (jeweils Kurzzeitkultivierung) sowie 100 Tagen (Langzeitkultivierung). Zur besseren Veranschaulichung der Raman-Spektren (A) ist der Spektralbereich von 600–1800 cm⁻¹ um den Faktor drei erhöht.

Vor allem oberhalb von 1500 cm⁻¹ wurden innerhalb der FT-IR-Daten geringfügige Intensitätsabnahmen in den Amid I- und Amid II-Banden sowie im Bereich der CH-Streckschwingungen mit zunehmender Kultivierungsdauer sichtbar. Dies spiegelt vorwiegend Veränderungen in Protein- und Lipidbestandteilen wider. Kultivierungsdauer-bedingte Intensitätsänderungen, die auf veränderte Molekülmengen hindeuteten, wurden innerhalb der Raman-Daten weniger deutlich beobachtet. Änderungen konnten jedoch nicht schrittweise (über die Tage) verfolgt werden. Unterhalb von 1200 cm⁻¹ wurden spektrale Abweichungen sichtbar, welche mit zunehmender Kultivierungsdauer und der damit einhergehenden Akkumulation von v. a. Lipidbestandteilen assoziiert wurden. Diese könnten für den Untergrund verantwortlich sein.

Zur Klassifikation der Kultivierungsdauer quieszenter Zellen mittels PLS-LDA wurden vier LV verwendet, welche die spektrale Varianz der Raman- bzw. FT-IR-Daten mit jeweils ~83 % bzw. ~88 % beschrieben. Die vier verschiedenen Zeitpunkte der Kultivierungsdauer wurden in den Raman- und FT-IR-Datensätzen durch die PLS-LD1 gegen die PLS-LD2 deutlich voneinander unterschieden (siehe Abbildung 39A und B). Beide Datensätze stimmten in der Klassifikation überein, wobei die FT-IR-Daten aufgrund der größeren Datenmenge geringere Abweichungen und demnach bessere Gruppenzugehörigkeiten zu den jeweiligen Kultivierungstagen aufwiesen. Die PLS-LD1 separierte innerhalb der Raman-Daten die 14 und 100 Tage bzw. innerhalb der FT-IR-Daten die 100 Tage kultivierten Zellen gegenüber den anderen Kultivierungszeitpunkten (0 und 7 Tage bzw. 0, 7 und 14 Tage). Die PLS-LD2 trennte im Raman-Datensatz deutlich die 0 gegen 7 Tage quieszenten Zellen ab, im Vergleich zu den 14 und 100 Tage kultivierten Zellen. Diese überlagerten an den Grenzen. Im FT-IR-Datensatz wurden die 0, 7 und 14 Tage quieszenten Zellen separiert. Der Abstand zwischen den jeweiligen Gruppenmittelpunkten war gering und in der 14 Tage kultivierten Zellgruppe wurden spektrale Abweichungen in Form von Ausreißern im Streudiagramm sichtbar. In den zugehörigen Koeffizienten wurden spezifische spektrale Eigenschaften ermittelt (siehe Abbildung 39C und D). Aufgrund der Überlagerungen waren Bandenzuordnungen für kurzzeitkultivierte quieszente Zellen weniger eindeutig.

Charakteristische Beiträge der PLS-LD1 von FT-IR-Daten, bezogen auf langzeitkultivierte quieszente Zellen (positive Koeffizienten), fanden sich besonders im Wellenzahlbereich zwischen 1800 und 900 cm^{-1} . Diese wurden mit Proteinen (Amid I und II-Bande um jeweils 1692 und 1508 cm^{-1}) und Lipiden (Deformationsschwingungen funktionaler Gruppen von $-\text{CH}_3$ und $>\text{CH}_2$ in Fettsäuren zwischen 1470 und 1350 cm^{-1}) assoziiert. Im Raman-Datensatz wurden markante Koeffizienten besonders im oberen Wellenzahlbereich aufgrund der CH-Streckschwingungen sichtbar. Diese wurden aber auch für Amid-Verbindungen (Amid I um 1630 cm^{-1} , 1544 cm^{-1}) beobachtet. Dagegen wurden in den FT-IR-Daten Bestandteile aus Nukleinsäuren (funktionelle Phosphodiester-Gruppen um 1244, 1224 und 1088 cm^{-1} und $>\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung um 1712 cm^{-1}) und Proteinen (Amid I mit α -helikalen Strukturen um 1652 cm^{-1}) mit kurzfristig-inkubierten quieszenten Zellen (negative Koeffizienten) assoziiert. Koeffizienten der Raman-Daten bestätigten diese spektralen Merkmale hinsichtlich der DNA/RNA- (782, 816, 1092, 1320, 1480 und 1580 cm^{-1}) und Protein-Banden (Kollagen-assoziiertes Amid I um 1666 cm^{-1} und saure Aminosäureseitenketten um 1706 cm^{-1}). Besonders im oberen Wellenzahlbereich der PLS-LD2 wurden ausgeprägte Lipid-assoziierte Beiträge (FT-IR-Daten: um 2848 und 2920 cm^{-1} ; Raman-Daten: 3028 cm^{-1}) mit kürzer- und längerfristig-inkubierten quieszenten Zellen assoziiert (Übergang von 7 bzw. 14 Tagen zu 100 Tagen Kultivierung). Der untere Wellenzahlbereich der PLS-LD2 war weniger ausgeprägt und stimmte teilweise mit der PLS-LD1 kurzfristig-induzierter Zellen überein. Es traten verstärkt Schwingungsbeiträge von Proteinen (FT-IR-Daten: Amid II um 1588 cm^{-1}) bzw. Nukleinsäuren (Raman-Daten: Purin-Basen um 1572 cm^{-1}) hervor. Jedoch wurden kurz- und langfristige kultivierte Zellen in der PLS-LD2 weniger deutlich voneinander

getrennt. Dies wurde besonders im FT-IR-Datensatz der 0 und 100 Tage kultivierten Zellen deutlich.

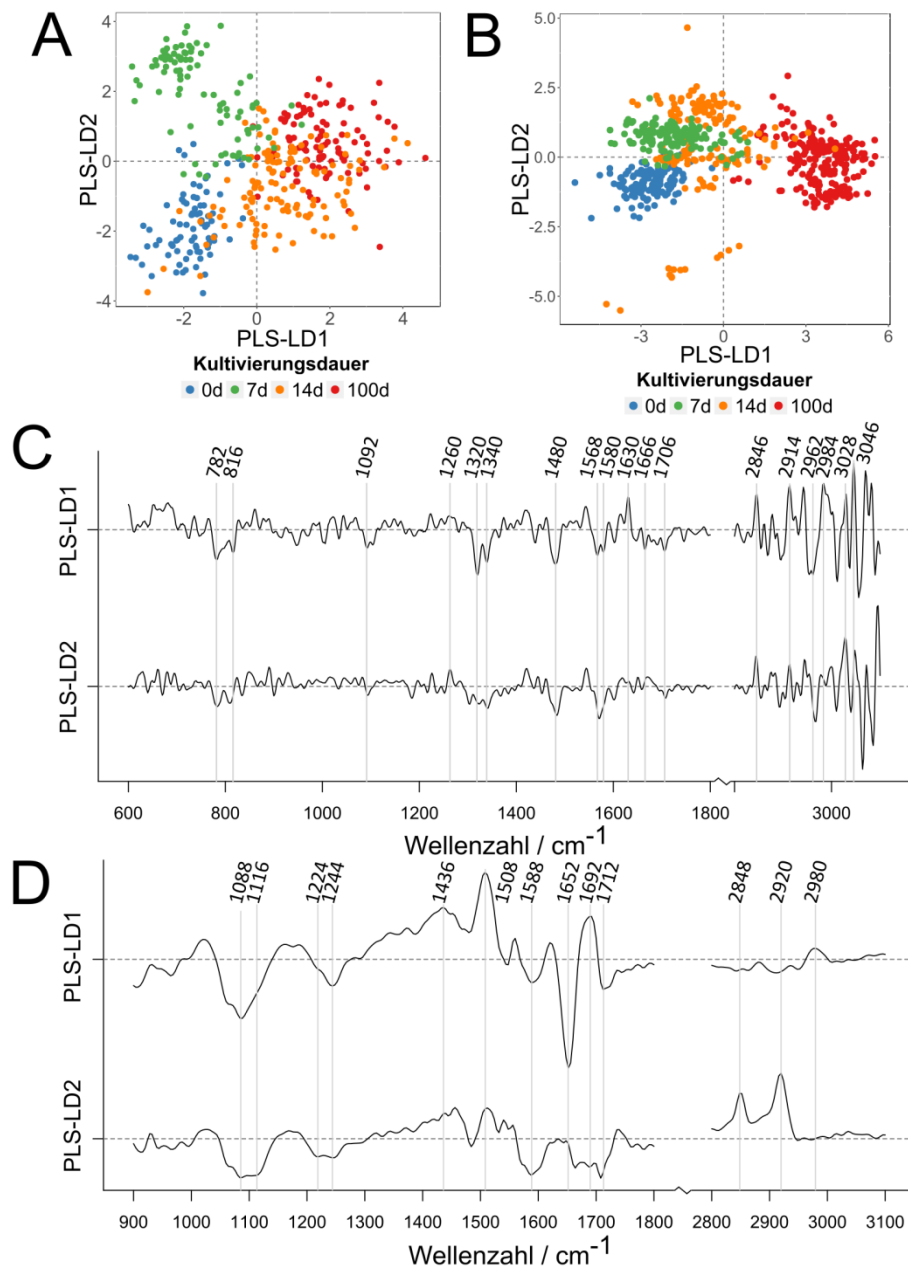


Abbildung 39: Klassifikation zur Kultivierungsdauer quieszenter Zellen.

Klassifikation mittels PLS-LDA der Raman- (A, C) und FT-IR-Daten (B, D) von vier verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (0, 7, 14 und 100 Tage) quieszenter Fibroblastzellen (nach Kontaktinhibierung, PD 28). Im Streudiagramm dargestellte PLS-LD1 gegen PLS-LD2 (A, B) und die jeweiligen Koeffizienten (C, D): PLS-LD1 (oben) und PLS-LD2 (unten).

Die Validierung der unterschiedlich lang kultivierten kontaktinhibierten quieszenten Zellen ergab eine Genauigkeit von jeweils 98 und 92 % für die Raman- und FT-IR-Daten (siehe Tabelle 12). Sensitivität und Spezifität dieser kurz- und langfristig kultivierten Zellen wurden mit Werten von mehr als 96 % für die Raman-Daten und mehr als 88 % für die FT-IR-Daten ermittelt. Besonders die Zellen, die für 7 und 14 Tage kultiviert wurden, wiesen insgesamt die niedrigsten statistischen Werte auf. Mit zunehmender Kultivierungsdauer scheint zwischen dem Beginn der Quieszenz (0 Tage)

und der Langzeitkultivierung (100 Tage) ein fließender Übergang stattzufinden. Sichtbar anhand der über die Spektren abgeleiteten biochemischen Veränderungen in den Zellen, welche v. a. die Zwischenphasen betrafen.

Tabelle 12: Validierung zu den verschiedenen Kultivierungszeitpunkten quieszenter Zellen.

Berechnet anhand der Raman- und FT-IR-Daten kontaktinhibierter Zellen. Für die Validierung wurde mit 90 % der Daten trainiert und mit den restlichen 10 % wurde getestet, wobei insgesamt 100 Wiederholungen der PCA-LDA durchlaufen wurden.

Kultivierung [Tage]	Sensitivität				Spezifizität				Genauigkeit
	0	7	14	100	0	7	14	100	
Raman [%]	99	96	98	100	99	100	100	99	98
FT-IR [%]	92	88	89	98	99	96	95	99	92

Bezogen auf die verschiedenen Batches wurden innerhalb der ROC-Kurven verschiedene Vorhersagequalitäten für die vier Kultivierungszeitpunkte quieszenter Zellen sichtbar, von ideal bis zufällig ratend (siehe Anhang Abbildung 52). FT-IR-basierte Modelle lieferten im Vergleich zu Raman-basierten bessere Ergebnisse, insbesondere wurden die Batches der 100 Tage nahezu fehlerfrei als richtig klassifiziert. In den Raman-basierten Modellen sowie den 7 und 14 Tage quieszenten FT-IR-Modellen war die Vorhersagequalität der Batches geringer und eher zufällig. Zellen, die sich zwischen beginnender und langandauernder quieszenter Kultivierung befinden, scheinen sich durch große interzelluläre Variationen auszuzeichnen. Dies bekräftigt die Überlegungen zu den fließenden Übergängen hinsichtlich der Kultivierungsdauer.

3.3.2.3 Aus der Quieszenz in die Proliferation zurückgeführte Zellen

Durch Kontaktinhibierung erzeugte quieszente Zellen wurden nach kurz- und langfristiger Quieszenz in die Proliferation zurückgeführt. Nach jeweils 14 und 100 Tage wurden Zellen passagiert und vereinzelt. Die dadurch mit der Proliferation beginnenden Zellen wurden für drei Tage kultiviert und anschließend spektroskopisch untersucht. Innerhalb der Raman-Bilder (siehe Abbildung 40A) und der Aufnahmen am FT-IR-Mikroskop (siehe Abbildung 40C) wurde die Bildung von ausgeprägten Zellrasen (> 80 % Konfluenz) nach Aufheben der Quieszenz mit beginnender Proliferation beobachtet. Die Zellgrößen entsprachen denen proliferierender Zellen. Aufgrund der langandauernden Quieszenz wurden Akkumulationen von lipidhaltigen Einschlüssen in Form von Tröpfchen innerhalb des Zytoplasmas dieser Zellen beobachtet. Interessanterweise wiesen, im Unterschied zur Quieszenz durch Kontaktinhibierung, serumentzogenen Zellen nach Rückführung in die Proliferation ähnlich morphologische Veränderungen wie in der Seneszenz auf (siehe Abbildung 40B und D). Dazu zählten die Zellgrößen-Zunahmen, Akkumulationen lipidhaltiger Tröpfchen um den Nukleus und, aufgrund des fehlenden Zellrasens (< 20 % Konfluenz), der anscheinende Zellzyklusarrest.

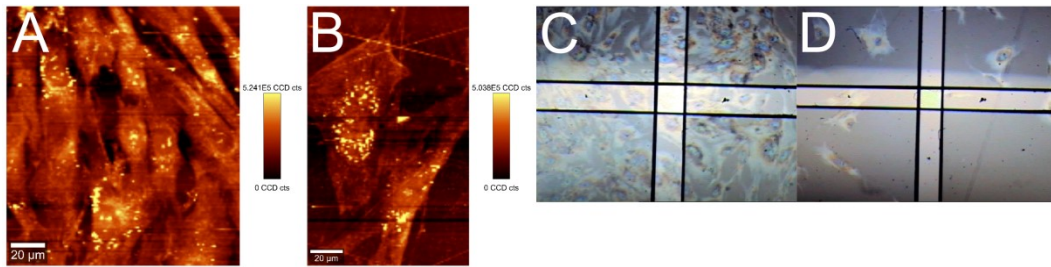


Abbildung 40: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen quieszenter Zellen.

Raman-Bilder (A, B) und mikroskopische Aufnahmen (Reflektionsmodus; C, D) von aus der langfristigen (100 Tage) Quieszenz nach Kontaktinhibierung (A, C) und Serumentzug (B, D) in die Proliferation zurückgewonnener Zellen (plus drei Tage Kultivierung). Die Bildgebung der Raman-Bilder (A, B) basiert auf der Intensität der CH-Streckschwingung von $2800\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$ und die Öffnung der Blende (ca. $50\times 50\text{ }\mu\text{m}$) am Mikroskop (C, D) ist durch schwarze Linien sichtbar.

Spektren kontaktinhibierter Zellen wurden in der folgenden Auswertung analysiert. In Abhängigkeit der Kultivierungsdauer wurden in die Proliferation zurückgeholte Zellen anhand von Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren verglichen (siehe Abbildung 41).

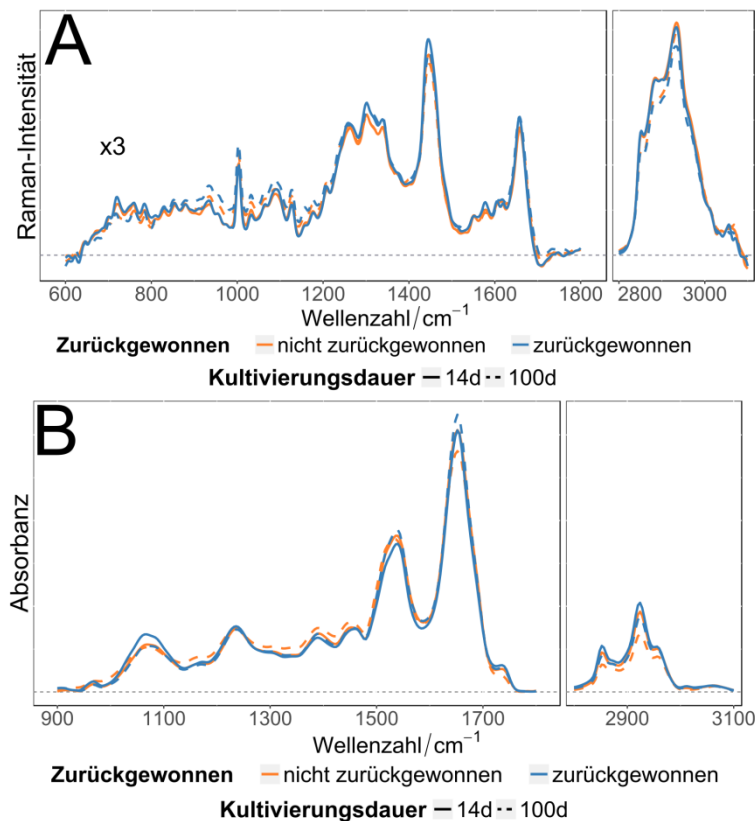


Abbildung 41: Raman- und FT-IR-Mittelwertspektren erneut proliferierender Zellen.

Raman- (A) und FT-IR-Mittelwertspektren (B) quieszenter Zellen (nach Kontaktinhibierung, PD 28; „nicht zurückgewonnen“; orange) nach 14 Tagen (Volllinie) und 100 Tagen (Strichlinie) Kultivierungsdauer. Nach der Quieszenz in die Proliferation zurückgeführte Zellen („zurückgewonnen“; blau), durch Passagieren und Kultivierung für drei weitere Tage. Zur besseren Veranschaulichung der Raman-Spektren (A) ist der Spektralbereich von $600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ um den Faktor drei erhöht.

Geringfügige Abweichungen, verteilt über den gesamten Wellenzahlbereich, wurden innerhalb der Mittelwertspektren zwischen kurz- und langzeitkultivierten quieszenten und zurückgewonnenen Zellen beobachtet. Intensitätszunahmen zurückgewonnener

proliferierender Zellen, im Vergleich zu nicht zurückgewonnenen quieszenten Zellen, wurden in den Raman-Mittelwertspektren in Protein-Banden beobachtet (Amid III-Bande von ca. 1260–1340 cm^{-1} und um 1590 cm^{-1}). Innerhalb der FT-IR-Daten wurden diese Veränderungen für Lipide in der Region der CH-Streckschwingung und um 1740 cm^{-1} ermittelt. Auch Kombinationen aus Lipiden und Proteinen, aufgrund der $>\text{CH}_2$ - und $>\text{CH}_3$ -Biegeschwingungen, wurden detektiert (zwischen 1350 und 1500 cm^{-1}). Mögliche Konformationsänderungen in Proteinen bezogen auf α -helikale und β -Faltblattstrukturen können möglich sein. Jedoch wurden diese in den Mittelwertspektren nicht eindeutig identifiziert.

Die PLS-LDA-Klassifikation kurz- und langfristig-kultivierter quieszenter Zellen, die in die Proliferation zurückgeführt bzw. nicht zurückgeführt wurden, berechnet anhand von vier LV. Diese beschrieben die spektrale Varianz der Raman- bzw. FT-IR-Daten mit jeweils $\sim 82\%$ und $\sim 90\%$. Anhand aufgetragener Raman- und FT-IR-Koeffizienten in den Streudiagrammen, wurde ersichtlich, dass zurückgeführte bzw. nicht zurückgeführte Zellen voneinander aufgrund positiver und negativer Koeffizienten unterschieden wurden (siehe Abbildung 42A und B). Die Trennung beider Gruppen war nicht eindeutig, da einige Überlagerungen beobachtet wurden. Zurückgewonnene quieszente Zellen, im Vergleich zu seneszenten und proliferierenden Zellen, waren seneszenten Zellen tendenziell ähnlicher als proliferierende Zellen. Quieszente Zellen gruppierten sich näherer an den seneszenten Zellen (nicht gezeigt). In die Proliferation zurückgewonnene Zellen (positiv assoziierte Koeffizienten) wurden vorwiegend aufgrund von Protein-Beiträgen (RS-Daten: Prolin 912 cm^{-1} , Amid III 1318 cm^{-1} , Amid I 1650 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} ; FT-IR-Daten: Amid I 1652 cm^{-1}) und weniger aufgrund von Lipid-Beiträgen (RS-Daten: 3014 cm^{-1}) klassifiziert (siehe Abbildung 42C und D). Auch DNA-bezogene Koeffizienten konnten beobachtet werden (RS-Daten: purinhaltige Nukleinbasen um 1482 cm^{-1} ; FT-IR-Daten: 1716 cm^{-1}). Die in der Quieszenz verbliebenen Zellen, klassifiziert anhand negativer Koeffizienten, wiesen v. a. dominante Beiträge im oberen Wellenzahlbereich auf. Diese wurden besonders Protein- und Lipid-Kombinationen (RS-Daten: ab 2800 cm^{-1}) oder einzelnen Lipiden (FT-IR-Daten: 2852 und 2924 cm^{-1}) zugeordnet. Im unteren Wellenzahlbereich der Raman-Koeffizienten wurden für diese Moleküle weniger ausgeprägte Beiträge detektiert. Bezogen auf aromatische Aminosäuren (C=C-Streckschwingung 1614 cm^{-1}) und ungeordnete Proteinstrukturen (Amid I 1688 cm^{-1}) sowie DNA (Desoxyribose 1426 cm^{-1}) wurden jedoch einige Beiträge ermittelt. Die FT-IR-Daten bestätigten, dass Proteine die Klassifikation, speziell die quieszenter Zellen, dominierten (aufgrund funktioneller Gruppen in Aminosäuren um 1408 cm^{-1} , Tyrosin 1516 cm^{-1} , Amid II 1564 cm^{-1} , β -Faltblattstruktur von Amid I 1628 cm^{-1} und Amid I um 1688 cm^{-1}). Interessanterweise wurden einzig in den FT-IR-Daten Kohlenhydrat-Beiträge identifiziert (1028 cm^{-1}).

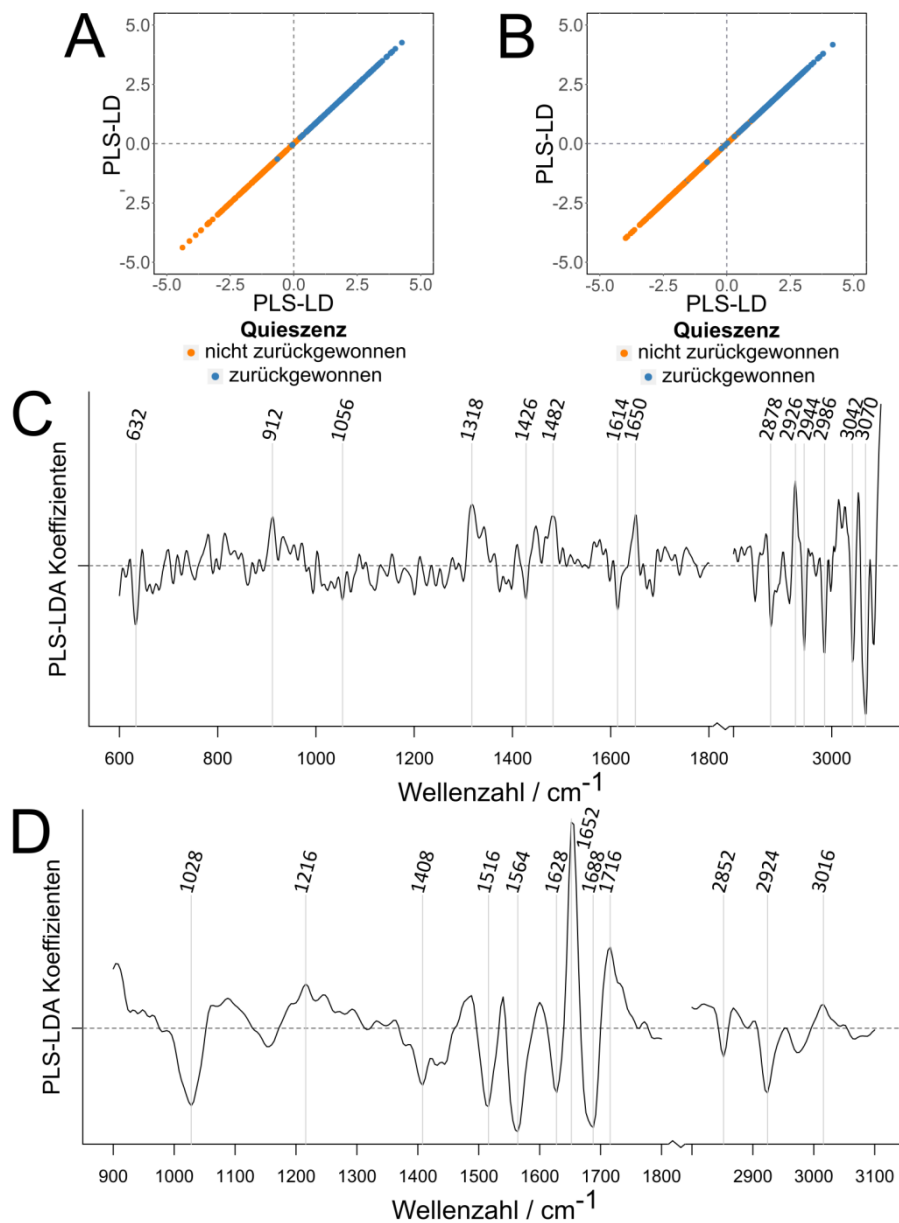


Abbildung 42: Klassifikation von aus der Quieszenz in die Proliferation zurückgewonnener Zellen. Klassifikation mittels PLS-LDA der Raman- (A, C) und FT-IR-Daten (B, D) kurz- (14 Tage) und langfristig-kultivierter (100 Tage) quieszenter Fibroblastzellen (nach Kontaktinhibierung, PD 28, „nicht zurückgewonnen“; orange), verglichen mit in die Proliferation zurückgeholten Zellen („zurückgewonnen“ durch Passagieren; blau). Im Streudiagramm aufgetragene Koeffizienten (A, B) und die jeweilige Darstellung der Raman- und FT-IR-Koeffizienten (C, D).

Die Kreuzvalidierung für die zurückgeführten und nicht zurückgeführten kontaktinhibierten quieszenten Zellen ergab eine Genauigkeit von jeweils 95 und 94 % für die Raman- und FT-IR-Daten (siehe Tabelle 13). Sensitivität und Spezifität dieser für 14 und 100 Tage kultivierten Zellen, plus der drei zusätzlichen Tage in der Proliferation, betrug mindestens jeweils 91 % innerhalb der Datensätze.

Tabelle 13: Kreuzvalidierung der zurückgewonnenen und nicht zurückgewonnenen quieszenten Zellen. Basierend auf den Raman- und FT-IR-Daten anhand einer zehnfachen Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen.

Quieszenz	Sensitivität		Spezifität		Genauigkeit
	nicht zurück-gewonnenen	zurückgewonnenen	nicht zurück-gewonnenen	zurückgewonnenen	
Raman [%]	97	93	93	97	95
FT-IR [%]	91	96	96	91	94

Die zusätzliche *leave-one-out*-Kreuzvalidierungen ergab Vorhersagen der zurückgewonnenen Zellen von jeweils 99 und 96 % Sensitivität und 96 und 91 % Spezifität für die Raman- und FT-IR-Daten. Die Genauigkeiten entsprachen denen der zehnfachen Kreuzvalidierung. Bezogen auf die Zell-Batches wurden innerhalb der ROC-Kurven verschiedene Vorhersagequalitäten für zurückgewonnene und nicht zurückgewonnene quieszente Zellen sichtbar, von sehr guter bis geringer Vorhersagequalität (siehe Anhang Abbildung 53). Raman-basierte Modelle lieferten im Vergleich zu FT-IR-basierten bessere Ergebnisse. Unterschiede zwischen zurückgewonnenen oder nicht zurückgewonnenen Zellen wurden hinsichtlich der Modellgüte nicht ermittelt.

3.3.2.4 Kontaktinhibierte gegen serumentzogene quieszente Zellen

Um Unterschiede zwischen kontaktinhibierten und serumentzogenen quieszenten Zellen zu ermitteln, wurden Zellen nach 14 und 100 Tagen Kultivierung miteinander verglichen. Nach langfristiger Kultivierung (100 Tage) wiesen kontaktinhibierte Zellen (siehe Abbildung 43A und C), aufgrund des fehlenden Passagierens, einen Zellrasen im Vergleich zu den serumentzogenen Zellen auf. Diese waren durch eine geringere Konfluenz gekennzeichnet (siehe Abbildung 43B und D). Des Weiteren wurden morphologische Veränderungen hinsichtlich von lipidhaltigen Akkumulationen beobachtet, welche innerhalb der serumentzogenen Zellen stärker ausgeprägt waren. Insgesamt wurden serumentzogenen Zellen aufgrund dieser Kultivierung offensichtlich stärker morphologisch beeinflusst, da veränderte Strukturen v. a. mittels Raman-Bildgebung beobachtet wurden (siehe Abbildung 43B).

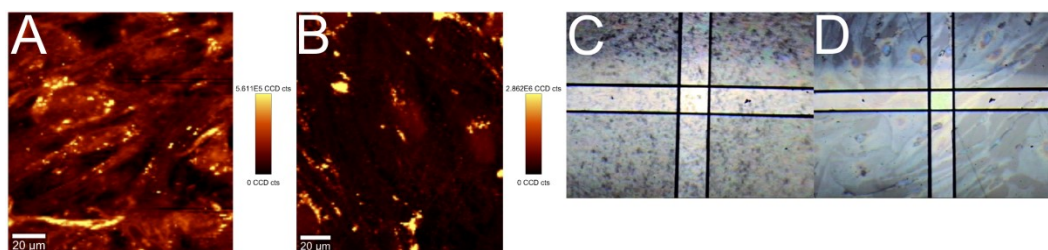


Abbildung 43: Raman-Bilder und mikroskopische Aufnahmen Quieszenz-induzierter Zellen. Raman-Bilder (A, B) und mikroskopische Aufnahmen (Reflektionsmodus; C, D) von langzeitkultivierten quieszenten Zellen (100 Tage) nach Kontaktinhibierung (A, C) und Serumentzug (B, D). Die Bildgebung der Raman-Bilder (A, B) basiert auf der Intensität der CH-Streckschwingung von $2800\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$. Die Öffnung der Blende (ca. $50\times 50\text{ }\mu\text{m}$) ist als schwarze Linie innerhalb der FT-IR-Aufnahmen (C, D) sichtbar.

Mittelwertspektren der Raman- und FT-IR-Daten machten Unterschiede in der Kultivierungsdauer und der Art der quieszenten Induktion sichtbar (siehe Abbildung 44). Besonders im unteren Wellenzahlbereich wurden in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer Unterschiede in den Raman-Mittelwertspektren beobachtet. Zwischen 1200 und 1650 cm^{-1} wurden Abweichungen in serumentzogenen Zellen erkennbar, die vermutlich auf Akkumulationen von fluoreszierenden Molekülen mit zunehmender Kultivierung zurückzuführen waren. Innerhalb der FT-IR-Spektren nahm mit zunehmender Kultivierung die Intensität der Amid I-Bande und der Bereich der CH-Streckschwingung für kontaktinhibierte Zellen ab. Auch in den Raman-Daten wurden abnehmende Intensitäten in der Region der CH-Streckschwingung beobachtet.

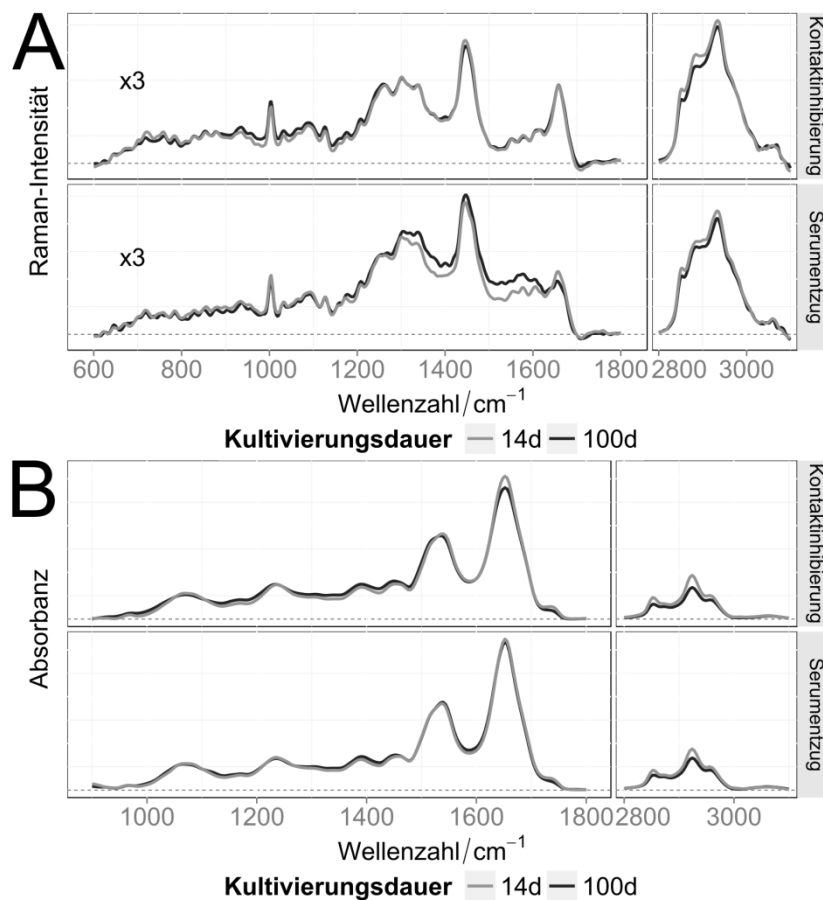


Abbildung 44: Mittelwertspektren kontaktinhibierter und serumentzogenen quieszenter Zellen. Raman- (A) und FT-IR-Mittelwertspektren (B) quieszenter Zellen (PD 28), nach 14 Tagen (hellgrau) und 100 Tagen (dunkelgrau) Kontaktinhibierung (oben; A, B) und Serumentzug (unten; A, B). Zur besseren Veranschaulichung der Raman-Mittelwertspektren (A) ist der Spektralbereich von $600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ um den Faktor drei erhöht.

Kontaktinhibierte gegen serumentzogene quieszente Zellen, die kurz- und langfristig kultiviert wurden, wurden mittels PLS-LDA und vier verwendeten LV klassifiziert. Diese beschrieben die spektrale Varianz des Raman- bzw. FT-IR-Datensatzes mit jeweils $\sim 92\%$ und $\sim 85\%$. In beiden Datensätzen wurden positive Koeffizienten serumentzogenen und negative Koeffizienten kontaktinhibierten Zellen zugeordnet. Im Raman-Streudiagramm wurde eindeutig anhand der Art der quieszenten Induktion klassifiziert (siehe Abbildung 45A). Kontaktinhibierte Zellen wiesen eine geringere

Streuung innerhalb dieser Gruppe im Vergleich zur serumentzogenen Zellgruppe auf. Innerhalb der FT-IR-Daten wurden beide quieszente Gruppen voneinander getrennt, jedoch mit Überschneidungen (siehe Abbildung 45B). Die Varianz in beiden Gruppen war jedoch in etwa gleich groß. Innerhalb der Raman-Koeffizienten wurden markante Beiträge v. a. den kontaktinhibierten Zellen aufgrund von Protein- (Aminosäure Tryptophan 762 cm^{-1} , Amid III mit α -helikaler Konformation 1266 cm^{-1} , Amid I 1662 cm^{-1} , ab 2800 cm^{-1}), Lipid- (ab 2800 cm^{-1} , besonders um 3014 cm^{-1}) und DNA-Bestandteilen ($682, 734, 1456\text{ cm}^{-1}$) zugeordnet (siehe Abbildung 45C).

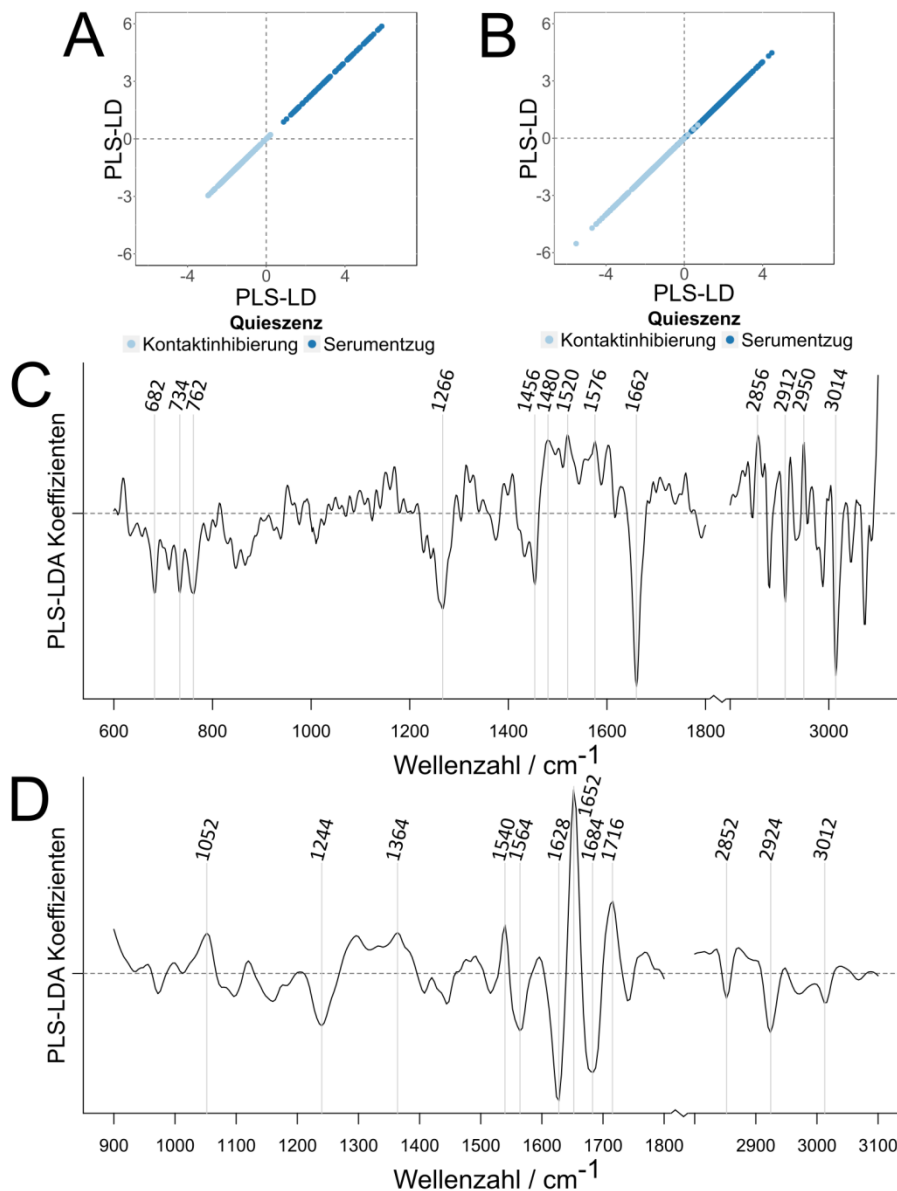


Abbildung 45: Klassifikation kontaktinhibierter und serumentzogenen quieszenter Zellen. PLS-LDA-Klassifikation der Raman- (A, C) und FT-IR-Spektren (B, D) kurz- (14 Tage) und langzeitkultivierter (100 Tage) quieszenter Zellen (PD 28), durch Kontaktinhibierung (hellblau) oder Serumentzug (dunkelblau), sichtbar im Streudiagramm (A, B). Abgebildete Koeffizienten der PLS-LDA der Raman- (C) und FT-IR-Daten (D).

Für serumentzogene Zellen war der Bereich zwischen 1480 und 1600 cm^{-1} markant, der mit Bestandteilen von DNA-Basen (um 1480 und 1576 cm^{-1}), Aminosäuren (1602 cm^{-1})

und Lipiden (1520 cm^{-1}) assoziiert wurde. Innerhalb der FT-IR-Daten wurden für diese Zellen ebenfalls ausgeprägte Koeffizienten mit DNA- (1716 cm^{-1}) und Protein-Beiträgen (1652 cm^{-1}) assoziiert (siehe Abbildung 45D). Auffällig waren die Koeffizienten der kontakthinierten Zellen, denen Beiträge von Lipiden (1244 und 2924 cm^{-1}) und Proteinen (Aminosäuren um 1564 cm^{-1} , Amid I 1628 und 1684 cm^{-1}) zugeordnet wurden.

Eine Kreuzvalidierung der kontakthinierten und serumentzogenen quieszenten Zellen, nach 14 und 100 Tagen Kultivierungsdauer, ergab eine Modellgenauigkeit von jeweils 99 und 97 % für die Raman- und FT-IR-Daten (siehe Tabelle 14). Sensitivität und Spezifität, der über zwei unterschiedliche Arten induzierten quieszenten Zellen, betragen mindestens 95 % innerhalb beider Datensätze. Die zusätzliche *leave-one-out*-Kreuzvalidierungen ergab Vorhersagen für die kontakthinierten quieszenten Zellen von jeweils 100 und 99 % Sensitivität und 98 und 95 % Spezifität für die Raman- und FT-IR-Daten. Die Genauigkeiten entsprachen denen der zehnfachen Kreuzvalidierung.

Tabelle 14: Kreuzvalidierung der kontakthinierten und serumentzogenen quieszenten Zellen. Basierend auf den Raman- und FT-IR-Daten mittels zehnfacher Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen.

Quieszenz	Sensitivität		Spezifität		Genauigkeit
	Kontakthiniierung	Serumentzug	Kontakthiniierung	Serumentzug	
Raman [%]	100	98	98	100	99
FT-IR [%]	98	95	95	98	97

Bezogen auf die Zell-Batches wurden innerhalb der ROC-Kurven verschiedene Vorhersagequalitäten für kontakthinierte und serumentzogene quieszente Zellen sichtbar, von idealer bis geringerer Vorhersagequalität (siehe Anhang Abbildung 54). Raman-basierte Modelle lieferten im Vergleich zu FT-IR-basierten bessere Ergebnisse. Keine Unterschiede wurden zwischen kontakthinierten oder serumentzogenen Zellen hinsichtlich der Modellgüte in den Raman- oder FT-IR-Modellen beobachtet.

3.3.3 Diskussion spektroskopisch ermittelter quieszenter Veränderungen im Vergleich zur Proliferation und Seneszenz

Mittels spektroskopischer Techniken konnte gezeigt werden, dass sich quieszente Zellen deutlich von anderen Zellzuständen, wie der Proliferation oder Seneszenz, unterscheiden. Trotz abweichender Basislinie im unteren Wellenzahlbereich seneszenten Zellen führte die Klassifikation der drei Zellzustände zu einem fast identischen Gesamtergebnis, wenn dieser Wellenzahlbereich aus der Klassifikation ausgeschlossen wurde. Dies lässt insgesamt vermuten, dass, trotz spektraler Änderungen in diesem Bereich der spektrale Einfluss auf die Gesamtklassifikation geringer ist als der Einfluss der Wellenzahlen oberhalb von 1200 cm^{-1} . Daher führt dieser kaum zu Klassifikationsänderungen. Während des Übergangs proliferierender Zellen in die Seneszenz in verschiedenen Fibroblast-Zelllinien wurden keine dominanten Banden für proliferierende oder seneszente Zellen ermittelt. Für die Unterscheidung dieser

Zellzustände inklusive der Quieszenz bestätigen sich diese Beobachtungen erneut, da spektrale Änderungen über den gesamten Wellenzahlbereich beobachtet werden. Die Koeffizienten, die diese Separierung prägen, lassen sich allerdings vorwiegend auf Proteine, weniger auf Lipide und Nukleinsäuren, und kaum bis gar nicht auf Kohlenhydrate zurückführen. Proteine weisen den größten prozentualen Anteil an Molekülen im Vergleich zu anderen größeren Molekülstrukturen (Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren) in der Zelle auf¹⁵³.

FT-IR-Spektroskopie eignet sich besonders zur Strukturaufklärung von Proteinen, genauer konformationellen Änderungen, dem Proteinerückgrat und vielen Aminosäureseitenketten. Die Sekundärstruktur der Proteine, beobachtet anhand der Amid I-Bande, setzt sich in langzeitkultivierten quieszenten Zellen vorwiegend aus Seitenketten mit aromatischen Aminosäuren (v. a. Tyrosin) und wenigen β -Faltblattstrukturen in Proteinen zusammen. In seneszenten Zellen wiesen Proteine viele Seitenketten mit sauren Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure, welche zu Aspartat und Glutamat dissoziieren können) und wenigen α -helikalen Strukturen auf. Proliferierende Zellen wiesen hohe Beiträge α -helikaler Strukturen in den Amidgruppen auf, bei gleichzeitig geringem Vorkommen von aromatischen Aminosäureseitenketten. Raman-spektroskopisch ermittelte Proteinbanden sind weniger eindeutig den Sekundärstrukturen zuordenbar, tendenziell bestätigten diese jedoch die FT-IR-ermittelten Beobachtungen. Während der replikativen Seneszenz exprimierte lysosomale Enzyme, einschließlich der SA β -Gal, sind bei einem sauren pH-Wert aktiv⁷⁵. Auch die für den Proteinabbau in den Lysosomen zuständigen lytischen Enzyme entfalten ihre Wirkung im sauren pH-Bereich^{205,206}, was die Anwesenheit saurer Aminosäuren in seneszenten Zellen erklärt. Bekannt ist, dass die basische Aminosäure Lysin bei einem pH-Wert von 11,4 als α -Helix vorliegt, während β -Faltblattstrukturen bei einem pH-Wert von 4–5 auftreten^{207,208}. Denaturierungen nativer helikaler Strukturen führen in Proteinen zu Aggregatbildungen, bei der nicht-native β -Faltblattstrukturen entstehen, welche eindeutig mit IR-Spektroskopie unterscheidbar sind²⁰⁹. Dies spiegelt die Unterschiede zwischen Proliferation (höhere Beiträge α -helikaler Strukturen) und Seneszenz (geringere Beiträge α -helikaler Strukturen) wider. Die in Proteinen stattfindenden konformationellen Umwandlungen, aufgrund der Umgebungsbedingungen, könnten die Ursache für das Vorhandensein basischer Aminosäuren in quieszenten Zellen sein. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Aufgrund stetig ansteigender Proteinoxidationen akkumulieren proliferierende Zellen beim Übergang in die Seneszenz zunehmend Carbonylproteine^{210,211}. Damit einhergehend nimmt der Proteinumsatz in seneszenten Zellen aufgrund nachlassender Proteinsynthese und Proteolyse ab²¹⁰. Letztendlich aggregieren oxidierte, quervernetzte und fluoreszierende Proteine, da der Abbau dieser Aggregate (Lipofuszin) gestört ist. Gleichzeitig wird die Proteasom-Aktivität aufgrund von Lipofuszin und oxidierten Produkten reduziert²¹². Diese oxidativ-bedingten strukturellen Veränderungen könnten ebenfalls eine Ursache für die Abnahme der α -helikalen Strukturen in seneszenten Zellen sein, verglichen mit proliferierenden Zellen.

Auch unabhängig der Art der quieszenten Induktion werden proliferierende, seneszente und quieszente Zellen separiert, wobei durch Kontaktinhibierung geeignetere Vergleiche aufgrund gleicher vorherrschender Kultivierungsbedingungen möglich sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass unabhängig der Art der quieszenten Induktion (Serumentzug oder Kontaktinhibierung) eine Vielzahl von Genen identifiziert wurde, die den quieszenten Zustand allgemein beschreiben¹⁰¹. Zudem sammeln sich quieszente Zellen mit einer Effizienz von ca. 80 % im G₀/G₁-Zellzyklus an⁹⁶. Ferner wurden in Abhängigkeit der Dauer des quieszenten Zustands spektrale Änderungen sichtbar und konnten sukzessiv verfolgt werden. Ähnlich der Alterung proliferierender Zellen „altern“ quieszente Zellen⁸⁹. Je länger Zellen in der Quieszenz verbleiben, desto länger benötigen diese für die Proliferation nach Aufhebung des Zellzyklusarrests. Dies scheint mit der Zellgröße zu korrelieren⁸⁹ und konnte u. a. mittels bildgebender Raman-Spektroskopie beobachtet werden. Auch die Fähigkeit der Konfluenz ist bei proliferierenden Zellen nach quieszenter Langzeitkultivierung beeinträchtigt und entspricht denjenigen Zellpopulationen, die sich in der Seneszenz befinden oder nähern. Dies wurde besonders bei den serumentzogenen quieszenten Zellen beobachtet. Als Ursache für die Veränderungen der Konfluenz und dem vermutlichen Übergang in die Seneszenz werden Telomer-unabhängige Signalwege angenommen. Telomerverkürzungen basieren auf der Zellteilung und den (Seneszenz-assoziierten) p53-p21-Signalwegen. Daher können während des nicht-replikativen quieszenten Zustands keine Telomerverkürzungen eintreten. Neuere Erkenntnisse identifizierten zudem den Übergang der Quieszenz in die Seneszenz als p53-unabhängigen Signalweg²¹³. Möglich sind Auslöser aufgrund von genotoxischem Stress. Versuche mit unterschiedlich hohen extrazellulären Sauerstoffkonzentrationen ergaben jedoch keine quantitativen Unterschiede hinsichtlich der DNA-Schäden und des Anteils an SA β-Gal-positiv gefärbten Zellen⁸⁹. Interessanterweise wurden quantitative Differenzen in unterschiedlichen humanen Zelllinien beobachtet^{89,90,214}. Für ähnliche Ergebnisse, trotz unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen, werden andere interne zelluläre Prozesse verantwortlich gemacht, wie z. B. metabolische Effekte. Innerhalb der ROC-Kurven konnten hohe Variationen in den Batches bezüglich des Zeitverlaufs quieszenter Zellen beobachtet werden. Die Stabilität zwischen den Batches der unmittelbar induzierten und langzeitkultivierten quieszenten Zellen, gegenüber den instabileren Batches der länger kurzzeitkultivierten Zellen (bis 14 Tage), implizierte große interzelluläre Variationen, v. a. in den quieszenten Übergangsphasen. Als Ursache werden Kultivierungsdauer-abhängige metabolische Abweichungen angenommen: während zu Beginn der Kultivierung alle Zellen unmittelbar proliferieren, sind langfristig alle Zellen in der Quieszenz verankert. Die Übergänge zwischen der Kurz- und Langzeitkultivierung scheinen hinsichtlich der zellulären Veränderungen fließend zu sein.

Bekannt ist, dass ROS die replikative Seneszenz auslösen und v. a. die Biomembranen beeinflussen können^{165,166}. Quieszente Zellen gegenüber in die Proliferation zurückgekehrten Zellen zeigten v. a. in den Raman-Spektren Veränderungen bezüglich der Proteinkonformation. Diese wurden besonders als Änderungen innerhalb der mit verschiedenen Aminosäuren assoziierten Seitenketten

(Tyrosin, Tryptophan oder Cytosin um 1614 cm^{-1}) und aufgrund geordneter und ungeordneter Strukturen in der Amid I-Region (jeweils um 1650 und 1688 cm^{-1}) in den Klassifikationskoeffizienten sichtbar. ROS können Molekülschädigungen auslösen, neben Proteinen können durch die Oxidation auch Lipide und DNA beeinträchtigt werden^{215,216}. Die DNA-Base Guanin scheint dabei besonders sensitiv gegenüber ROS zu sein²¹⁶. Mittels Raman-Spektroskopie wurde dies bei den in die Proliferation zurückgewonnenen Zellen (1482 cm^{-1}) im Vergleich zu den in der Quieszenz verbleibenden Zellen (1426 cm^{-1}) sichtbar. Ursächlich scheinen akkumulierende DNA-Schäden in langzeitkultivierten quieszenten Zellen zu sein. Diese können in seneszenten Zellen ähnlich hoch sein, allerdings unabhängig der Telomerverkürzung⁸⁹. Im Vergleich junger gegen seneszenten bzw. langzeitkultivierter quieszenter Zellen sind diverse Signalwege trotz unterschiedlicher Aktivierungen ähnlich zueinander, wozu auch die herunterregulierten DNA-Reparaturgene zählen²¹⁷. Um in der Proliferation auftretende Schäden zu reparieren, können Zellen durch Hochregulierung von p21 kurzzeitig in die Quieszenz übergehen⁹⁰. Ist die Reparatur unvollständig, geht der Großteil der Zellen in die Seneszenz über, was mit der Hochregulierung von p16 einhergeht. Da die Signalwege p53-p21 und p16-pRB miteinander in Beziehung stehen^{78,218}, kann durch Überschreiten des Zeitpunktes des hochregulierten p16, welches zeitlich verzögert eintritt, ein permanenter Zellzyklusarrest induziert werden²¹⁹. Diese zeitliche Verzögerung bestätigte sich spektroskopisch, da DNA-Banden der Zellen, die aus der Quieszenz in die Proliferation zurückgewonnen wurden, mit denen kurzzeitkultivierter aber nicht langzeitkultivierter quieszenter Zellen übereinstimmen. Proliferierende Kontrollzellen, im Vergleich zu kurzfristig-kultivierten quieszenten Zellen, wiesen weitere markante DNA-Banden auf, welche bereits aus Einzelzelluntersuchungen bekannt sind^{153,182,220}.

Mit zunehmender Kultivierung ist die Rückkehr aus dem reversiblen Zellzyklusarrest in die Proliferation aufgrund zunehmender molekularer Veränderungen eingeschränkt. Besonders serumentzogene quieszente Zellen zeigten Seneszenz-assoziierte Veränderungen, was mit der Zunahme der Zellgröße korrelierte und bestätigt wird⁸⁹. Die Variation des Populationswachstums zurückgewonnener Zellen nach 14 Tagen ist minimal höher als die der proliferierenden Zellen. Das kann durch konstant hohe Wachstumsraten in proliferierenden Zellen und z. B. durch einen unterschiedlich hohen Anteil an Zellzyklus-arretierten Zellen erklärt werden. Arretierte Zellen scheinen für den Erhalt der zellulären Funktion wichtig zu sein, da diese die unkontrollierbare Proliferation begrenzen können, was zur Gewebemöostase beiträgt^{8,89}. In Kombination mit dem für den Zellzyklusarrest verantwortlichen Protein p21, welches auf den ursprünglichen Wert nach kurzfristiger Quieszenz zurückfällt, deutet dies auf erfolgreiche DNA-Reparaturen hin. Das führt zur Rückkehr der kurzzeitkultivierten quieszenten Zellen in den Zellzyklus, ohne Anzeichen des Übergangs in die Seneszenz⁸⁹, was spektroskopisch beobachtet werden konnte. Die nach Langzeitkultivierung kontakthibierten Zellen, die in die Proliferation zurückgeführt wurden, gruppieren sich während der Klassifikation näher an den seneszenten Zellen als an den proliferierenden Zellen. Ursächlich können bereits erwähnte DNA-Schäden

sein, die in langzeitkultivierten quieszenten Zellen aufgrund der hohen metabolischen Aktivität akkumulieren, trotz der fehlenden Zellteilung^{89,97}. Durch Wiedereintritt in den Zellzyklus wären diese Zellen anfällig für Tumore, da die Induktion der Apoptose in langzeitkultivierten quieszenten Zellen aufgrund höherer Level an DNA-Schäden unterdrückt ist²²¹. Um eine Tumorbildung zu vermeiden, können diese Zellen in die Seneszenz übergehen, während ein kleinerer Anteil der Zellpopulation proliferiert^{10,89}. Daher scheinen langzeitkultivierte quieszente Zellen seneszent zu sein, jedoch hat sich spektroskopisch gezeigt, dass die quieszenten Zellen nicht den seneszenten Zellen entsprechen.

Autophagozytose kann durch Langzeitkultivierung von kontaktinhibierten quieszenten Zellen ausgelöst werden^{222,223}. In diesem Zustand baut die Zelle eigene molekulare Bestandteile ab und verwertet diese. Dies kann dazu beitragen, dass potenziell gefährliche Moleküle nicht in der Zelle akkumulieren⁹⁷. Der Zusammenhang zwischen Autophagozytose und Seneszenz ist jedoch unklar, da einerseits die Ausbildung der Seneszenz gefördert²²⁴ und andererseits gehemmt werden kann²²⁵. Trotz erhöhter lysosomaler Gehalte und Lipofuszin-Anteile in seneszenten Zellen wird die geringe Autophagozytose im Gewebe einer erhöhten Aktivität eines Proliferations-regulierenden Proteins zugeschrieben (mTOR, engl. *mechanistic Target of Rapamycin*)^{226,227}. Dieses für die Signaltransduktion bedeutende Protein scheint eine Schlüsselrolle im Wechsel von Quieszenz und Seneszenz einzunehmen. Eine hohe p53-Antwort führt zur Inhibierung von mTOR und begünstigt Quieszenz vor Seneszenz, wodurch die Hypertrophie^c des Zytoplasmas als ein typischer seneszenten Phänotyp verhindert wird^{228,229}. Trotz ähnlicher Signalwege von Quieszenz und Seneszenz werden z. B. die beteiligten Proteine unterschiedlich exprimiert, wodurch Quieszenz in humanen Fibroblasten durch Konfluenz, einen Mangel an p53 oder Nahrung ausgelöst werden kann²³⁰. Dieser auf Autophagozytose beruhende Prozess könnte die Ursache für die beobachteten spektroskopischen Differenzen zwischen seneszenten und (langzeitkultivierten) quieszenten Zellen sein, da Unterschiede v. a. die Proteine betrafen.

Interessanterweise ist die SA β -Gal kein für seneszenten Zellen einzigartiger Biomarker und kann ebenso in quieszenten Zellen beobachtet werden. Innerhalb beider Zellzustände steigt der Gehalte der Lysosomen an, wodurch die SA β -Gal-Expression verstärkt wird, jedoch ist die Intensität SA β -Gal-positiv gefärbter serumentzogener Zellen niedriger als die seneszenten Zellen²²⁷. Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die gesteigerte Akkumulation von Lipofuszin führt zur Zunahme von Vesikeln, die lysosomale unverdaubare Bestandteile enthalten. Der Unterschied zwischen Quieszenz und Seneszenz ist allerdings gering. Dies erklärt u. a. die in den Raman-Bildern seneszenten und langzeitkultivierter quieszenten Zellen sichtbaren lipidhaltigen Zelleinschlüsse, in Form von Tröpfchen, die sich um den Nukleus herum gruppieren. Mittels konfokaler RS können akkumulierende Lipidtröpfchen visualisiert und die molekulare Zusammensetzung bestimmt werden²³¹.

^c Größenzunahme eines Organs oder eines Gewebes durch Vergrößerung einzelner Zellen

Spektroskopisch unterschied sich die Lipidzusammensetzung seneszenter und quieszenter Zellen, was hauptsächlich im oberen Wellenzahlbereich und an einzelnen Banden im unteren Wellenzahlbereich beobachtet wurde. Lipidtropfen, die reich an Triglyzeriden und Phospholipiden sind, scheinen aufgrund der während der Redoxreaktion erzeugten Superoxide zudem an der Produktion von ROS beteiligt zu sein. Insgesamt wird der den seneszenten Zellen ähnliche lysosomale und SA β -Gal-assoziierte Phänotyp auch in alternden humanen Zellen beobachtet⁷⁵. Einlagerungen von Lipidbestandteilen, in Kombination mit oxidierten Proteinen, beeinflussten die gemittelten Zellspektren, da sich mit zunehmender Kultivierung die Basislinie aufgrund von fluoreszentelem Untergrund veränderte. Als Ursache für die lysosomale Differenz zwischen seneszenten und quieszenten Zellen wird die lysosomale Biogenese diskutiert. Einzig in seneszenten Zellen läuft dieser Prozess aufgrund der hohen mTOR-Aktivität aktiv fort. Letztlich reguliert mTOR die Autophagozytose, wodurch sich geringe Aktivitäten dieser in seneszenten aber nicht quieszenten Zellen erklären lassen²²⁶. Bekannt ist, dass mTOR verschiedene Zellaktivitäten kontrolliert, einschließlich des Zellwachstums, der Autophagozytose, des Metabolismus von Mitochondrien und der Aufrechterhaltung der Funktion der Lysosomen²³². Seneszenz und Quieszenz unterliegen beide diesen Veränderungen.

Insgesamt eignet sich die markierungsfreie RS und FT-IR-Spektroskopie zur Unterscheidung verschiedener Zellzustände in humanen Zellen *in vitro*. Veränderungen in quieszenten und seneszenten Zellen wurden v. a. in den Aminosäureseitenketten der Proteine und deren Sekundärstrukturen ermittelt, aber auch in Lipiden und Nukleinsäuren. Eindeutig ist, dass langfristig-kultivierte quieszente Zellen hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung nicht seneszenten Zellen entsprechen, auch wenn beide ähnliche Signalwege durchlaufen, ähnliche Moleküle exprimieren und die SA β -Gal-Färbung quieszente Zellen als seneszent identifiziert. Unabhängig der Art der quieszenten Induktion wird die Quieszenz von anderen Zellzuständen unterschieden. Zudem kann durch Kontaktinhibierung erzeugte Quieszenz eindeutig von der durch Serumentzug erzeugten Quieszenz unterschieden werden. Auch die Dauer des quieszenten Zustands kann spektral verfolgt werden. Je länger Zellen in der G₀-Phase arretieren, desto unwahrscheinlicher wird die dauerhafte Rückkehr in die Proliferation, ohne kurz darauf seneszent zu sein oder zu werden.

4 Zusammenfassung

Die zelluläre Seneszenz verursacht Dysfunktionen in den Geweben und macht den (menschlichen) Organismus für altersassoziierte Erkrankungen anfällig. Gleichzeitig wird die Bildung von Tumoren verhindert, da die Proliferation von geschädigten Zellen durch den Zellzyklusarrest gehemmt wird. Die Detektion der seneszenten Zellen beruht *in vitro* und *in vivo* auf spezifischen Biomarkern. Diese werden jedoch nicht einheitlich exprimiert und variieren zwischen verschiedenen Zellen bzw. Geweben. Dadurch können seneszente Zellen über herkömmlich verwendete Techniken nicht vollkommen eindeutig nachgewiesen werden. Zudem wird das biologische Material häufig markiert und aufgrund invasiver molekularbiologischer Techniken zerstört, wodurch es für nachfolgende Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht. Dagegen basieren schwingungsspektroskopische Techniken, wie die Raman- und Infrarot-Spektroskopie, auf den Anregungen der Normalschwingungen der Moleküle. Die Verfahren sind für die zu untersuchenden Proben potentiell nicht-invasiv und erlauben zerstörungs- und markierungsfreie Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*. In dieser Arbeit wurde die Raman- und Infrarot-Spektroskopie eingesetzt, um: (i) die zelluläre Seneszenz nachzuweisen und zu charakterisieren bzw. den Übergang in die Seneszenz zu verfolgen, (ii) Unterschiede zwischen zwei- und dreidimensionalen Umgebungen der Zellen bezüglich seneszenter Veränderungen herauszuarbeiten und (iii) die Seneszenz gegen andere Zellzustände wie die Proliferation und Quieszenz abzugrenzen bzw. quieszente Zellen spektroskopisch zu charakterisieren. Weiterhin sollte das Potential der Schwingungsspektroskopie in Kombination mit multivariaten Datenanalysetechniken für die Altersforschung gezeigt werden.

In Einzelzelluntersuchungen konnte die Seneszenz mittels Raman- und Infrarot-Spektroskopie charakterisiert werden. Gleichzeitig konnten seneszente von proliferierenden Zellen anhand eines Klassifikationsmodells (*partial least squares*-Regression in Kombination mit einer linearen Diskriminanzanalyse) deutlich voneinander differenziert werden. Trotz geringer spektraler Unterschiede während des Übergangs in die Seneszenz, die reproduzierbar und konsistent waren, wurden in allen vier untersuchten Fibroblast-Zelllinien (BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38) seneszente Zellen diskriminiert. Morphologische und chemische Änderungen wurden anhand enger Rasteraufnahmen bei der Raman-Spektroskopie und der großen Anzahl an untersuchten Zellen korrekt berücksichtigt. Die Infrarot-Spektren lieferten dabei komplementäre biochemische Informationen, welche die Ergebnisse der Raman-Spektroskopie bestätigten. Innerhalb der Spektren wurden keine einzelnen Markerbanden hinsichtlich des Übergangs in die Seneszenz beobachtet. Vielmehr zeigte sich, dass die Seneszenz ein multifaktorieller komplexer Prozess ist. Die Menge der Moleküle änderte sich kaum in den Zellen, jedoch änderte sich die Zusammensetzung aufgrund von Modifikationen erheblich, v. a. in Proteinen und Lipiden sowie geringfügig in Nukleinsäuren. Die spektralen Änderungen beruhten daher auf den molekularen Hauptbestandteilen der Zelle, den Proteinen und Lipiden, und nicht auf einzelnen Molekülen. Angenommen wurde, dass intrazelluläre degenerative Prozesse und der Einfluss von reaktiven

Sauerstoffspezies von zentraler Bedeutung sind. Diese verursachten oxidative Schäden, welche zu strukturellen Modifikationen in den Biomolekülen führten, die wiederum akkumulierten und als Abfallprodukte in Lysosomen gespeichert wurden. Das wurde mittels bildgebender Raman-Spektroskopie als autofluoreszenter Bereich in den Zellen in Form von Lipidtröpfchen sichtbar. Aufgrund der in den verschiedenen Zelllinien gewonnenen Ergebnisse kann von einem gemeinsamen seneszenten Prozess ausgegangen werden, zumal Veränderungen auf Expressions- und Proteinebene identifiziert wurden und dies bestätigten.

Dreidimensionale Gewebemodelle imitieren die Eigenschaften der *in vivo*-Zellphysiologie. Die in dieser Umgebung kultivierten Fibroblastzellen unterscheiden sich von den in zweidimensionalen Monoschichten gewachsenen Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie, Genexpression und Signalwege. Voruntersuchungen an aus Fibroblasten generierten Sphäroiden belegten, dass die Raman-Spektroskopie zelluläre Strukturen oberflächennah auflöst und sich zur Untersuchung von dreidimensionalen Modellen eignet. Humane Fibroblastzellen, die in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert wurden, konnten spektroskopisch analysiert und gegenüber den in zweidimensionaler Zellkultivierung kultivierten Zellen eindeutig unterschieden werden. Ferner war die Kultivierungs-abhängige Klassifikation der Infrarot-Spektren ausgeprägter als die der Raman-Spektren. Differenzen wurden spektralen Bereichen zugeordnet, die mit Amidgruppen in Proteinen assoziiert wurden. Folglich wiesen in einer dreidimensionalen Matrix kultivierte Zellen ein anderes biochemisches und metabolisches Verhalten als zweidimensional kultivierte Zellen auf. Durch Raman- und Infrarot-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die Untersuchung von Zellzuständen, wie der Seneszenz, in einer der Haut nachgeahmten Umgebung geeigneter ist, als durch herkömmliche zweidimensionale Zellkultivierung *in vitro*. Interessanterweise wurden keine offensichtlichen spektralen Beiträge von Kollagen in den dreidimensional-kultivierten Zellen ermittelt. Unabhängig der spektroskopischen Messtechnik und der Art der Kultivierung wurden seneszenz von proliferierenden Zellen unterschieden. Der Kontrast in dreidimensionalen Modellen war jedoch ausgeprägter. Insgesamt bestätigten sich die vorherigen Untersuchungen zur Seneszenz in verschiedenen zweidimensional-kultivierten Zelllinien. Die Seneszenz-assoziierten Veränderungen wurden hauptsächlich in spektralen Beiträgen von Proteinen und Nukleinsäuren beobachtet. Ursächlich scheinen oxidative Schädigungen aufgrund von reaktiven Sauerstoffspezies zu sein. Diese führen zu Veränderungen der zellulären Funktion, da modifizierte Proteinstrukturen und Carbonylverbindungen sowie DNA-Schädigungen detektiert wurden. Besonders deutlich wurden diese Veränderungen in den zweidimensional kultivierten Zellen. Dies deutete auf einen potentiellen Zellschutz aufgrund der dreidimensionalen Umgebung hin. Durch die Nachahmung von *in vivo*-ähnlichen Strukturen in 3D-Hautmodellen zeigte sich, dass diese wichtigen Erkenntnisse zur zellulären Seneszenz beitragen.

Zellzustände unterscheiden sich hinsichtlich ihrer verschiedenen Signalwege oder Expressionsprofile. Mit Hilfe der Raman- und Infrarot-Spektroskopie wurden seneszenz Zellen von proliferierenden und quieszenten Zellen *in vitro* eindeutig mittels

Klassifikationsmodellen separiert und charakterisiert. In seneszenten Zellen wurden molekulare Veränderungen in Proteinen aufgrund zunehmender lysosomaler Aktivitäten und der Bildung aggregierter und oxidiertes Proteine beobachtet. Die ermittelten Veränderungen und das Fehlen dominanter Seneszenz-assoziiierter Markerbanden bestätigten die Ergebnisse aus den vorherigen Untersuchungen zur Seneszenz als einen multifaktoriellen komplexen Prozess. Unabhängig von der Art der quieszenten Induktion wurden quieszente Zellen von anderen Zellzuständen separiert. Interessanterweise wiesen quieszente Zellen andere Aminosäurezusammensetzungen und Proteinstrukturen im Vergleich zu seneszenten oder proliferierenden Zellen auf, was im Zusammenhang mit der Autophagozytose diskutiert wird. Besonders Infrarot-Spektroskopie eignete sich zur Detektion der Protein-Änderungen. Auch in Lipiden und Nucleinsäuren wurden spektrale Änderungen beobachtet, die, zusammen mit den Proteinmodifikationen, oxidativen Schäden in Kombination mit metabolischen Effekten zugeschrieben wurden. Mit zunehmender Dauer der quieszenten Kultivierung konnten biomolekulare Veränderungen zudem sukzessiv mittels Raman- und Infrarot-Spektroskopie verfolgt werden. Wie in seneszenten Zellen auch wurden akkumulierende oxidative Schäden von Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden in quieszenten Zellen bei gleichzeitig herunterregulierten Reparaturmechanismen detektiert. Lysosomale unverdauliche Bestandteile, in Form von Lipidtröpfchen, konnten mittels bildgebender Raman-Spektroskopie in quieszenten Zellen beobachtet werden. Durch die Akkumulationen waren die Übergänge zwischen kurz- und langzeitkultivierten Zellen nicht abrupt sondern vielmehr fließend, was durch die Batch-Variationen erkennbar wurde. Seneszente und quieszente Zellen durchlaufen ähnliche Signalwege, exprimieren ähnliche Moleküle und beide werden durch einen Seneszenzmarker angefärbt. Dadurch werden quieszente Zellen als seneszente Zellen wahrgenommen. Allerdings weichen langzeitkultivierte quieszente Zellen eindeutig von seneszenten Zellen hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung ab. Je länger die Zellen in der Quieszenz arretierten, desto unwahrscheinlicher wurde die dauerhafte Rückkehr in die Proliferation, ohne kurz darauf seneszent zu sein oder zu werden. Dies konnte besonders in serumentzogenen quieszenten Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig wurden kontaklinhibierte quieszente Zellen eindeutig von serumentzogenen unterschieden.

Insgesamt zeigte sich, dass markierungsfreie spektroskopische Techniken in Kombination mit multivariater Datenanalyse leistungsstarke Werkzeuge für die Untersuchungen von Einzelzellen und dreidimensionalen Zellstrukturen sind. Mittels zerstörungsfreier, bildgebender Raman-Spektroskopie sind, neben den gezeigten *in vitro* Untersuchungen, *in vivo* Beobachtungen von zellulären Zuständen und den damit verbundenen Änderungen möglich. Das kann besonders für die medizinische Diagnostik, von z. B. alternder Haut, von Bedeutung sein. In Verbindung mit Infrarot-Spektroskopie können anschließend komplementäre Informationen *in situ* und *in vitro* gewonnen werden, v. a. bezüglich der Proteinveränderungen in den alternden Zellen. Anhand der spektroskopisch gewonnenen Erkenntnisse zu den verschiedenen Zellzuständen und den Veränderungen in seneszenten und quieszenten Zellen können möglicherweise sogar Ansatzpunkte für ein „gesundes“ Altern abgeleitet werden.

5 Summary

Cellular senescence causes dysfunctions within tissues and makes the (human) organism susceptible for age-related diseases. Simultaneously, the formation of tumors is prevented, since the proliferation of damaged cells is inhibited by the cell cycle arrest. The detection of senescent cells *in vitro* and *in vivo* is based on specific biomarkers. However, these are not expressed consistently and vary between different cells and tissues. Thus, senescent cells cannot be explicitly detected by using conventional techniques. Moreover, the biological material is often labeled and destroyed due to invasive molecular biological techniques and hence no longer available for subsequent investigations. On the other hand vibrational spectroscopic techniques, such as Raman and infrared spectroscopy, are based on the excitation of normal modes of the molecules. The methods are potentially non-invasive for the samples to be examined and permit non-destructive and label-free investigations *in vitro* and *in vivo*. In this work Raman and infrared spectroscopy were employed in order to: (i) determine and characterize the cellular senescence to follow the transition into senescence, (ii) highlight differences between two- and three-dimensional environments of the cells regarding senescent alterations and (iii) differentiate senescence against other cellular states like proliferation and quiescence and spectroscopically characterize quiescent cells. Furthermore, the potential of vibrational spectroscopy in combination with multivariate data analysis for the aging research was examined.

Senescence was identified based on investigations at the single cell level by Raman and infrared spectroscopy. Simultaneously, senescent cells were clearly differentiated from proliferating cells by means of a classification model (partial least squares regression in combination with a linear discriminant analysis). Despite only small but reproducible and consistent spectral changes during the transition into senescence, senescent cells were discriminated in all four fibroblast cell strains (BJ, MRC-5, IMR-90 and WI-38). Morphological and chemical changes were identified by means of narrow raster scans in Raman spectroscopy and the large number of examined cells. Infrared spectra provided complementary biochemical information, which confirmed the results of Raman spectroscopy. Within the spectra, no single marker bands related to the transition into senescence were observed. Senescence was rather found to be a multifactorial complex process. The amount of molecules barely changes in cells, but the macromolecular composition changes considerably due to modifications, especially in proteins and lipids as well as slightly in nucleic acids. The spectral changes are therefore based on the molecular main components of the cells, the proteins and lipids, and not on individual molecules. Intracellular degenerative processes and the influence of reactive oxygen species were assumed to play a significant role. These led to oxidative damages leading to structural modifications in the biomolecules, which in turn accumulated and got stored as waste products in lysosomes. This was detected as an autofluorescent region in cells by means of Raman imaging. Based on the results obtained in the four different cell strains, a common senescent process can be assumed,

especially as changes in expression and protein levels have been identified and confirmed.

Three-dimensional tissue models mimic the features of *in vivo* cell physiology. The fibroblast cells cultured in this environment differ from the cells grown in two-dimensional monolayers with regard to their morphology, gene expression and signaling pathways. Preliminary investigations of spheroids generated from fibroblasts have shown that Raman spectroscopy resolves cellular structures in layers near the surface and is suitable for the investigation of three-dimensional models. Human fibroblast cells cultured in a three-dimensional matrix could be analyzed spectroscopically and clearly distinguished from cells cultured in two-dimensional cell cultivation. The cultivation dependent classification of infrared spectra was more pronounced than based on Raman spectra. Differences were assigned to spectral regions associated with amide groups in proteins. Thus, in a three-dimensional matrix cultured cells exhibit a different biochemical and metabolic behavior than two-dimensionally cultured cells. Raman and infrared spectroscopy have shown that the investigation of cell states, such as senescence, is more appropriate in a skin mimicking environment than by conventional two-dimensional cell cultivation *in vitro*. Interestingly, no obvious spectral contributions of collagen were determined in the three-dimensionally cultivated cells. Senescent cells were distinguished from proliferating cells independent of the spectroscopic measurement technique and the method of cultivation. However, the contrast in the three-dimensional model was more pronounced. Overall, the previous investigations on senescence in various two-dimensionally cultured cell strains were confirmed. The senescence-associated alterations were mostly observed in spectral contributions of proteins and nucleic acids. The main reason seems to be oxidative damages due to reactive oxygen species. This leads to changes in cellular function, since modified protein structures and protein carbonyl compounds as well as DNA damages have been detected. These modifications became particularly clear in the two-dimensionally cultured cells. This indicated a potential cell protection in three-dimensional environments. By mimicking *in vivo* like structures in 3D skin models it became clear that these important findings contribute to cellular senescence.

Cell states differ in their various signaling pathways and expression profiles. By means of the label-free Raman and infrared spectroscopy, senescent cells were clearly separated and characterized from proliferating and quiescent cells *in vitro* by means of classification models. In senescent cells, molecular changes were observed in proteins due to increasing lysosomal activities and the formation of aggregated and oxidized proteins. The detected changes and the absence of dominant senescent-associated marker bands confirmed the results from the previous senescence investigations as a multifactorial complex process. Regardless of the type of quiescent induction, quiescent cells were separated from other cell states. Interestingly, quiescent cells showed different amino acid compositions and protein structures compared to senescent or proliferating cells, which is discussed in the context of autophagy. Particularly infrared spectroscopy was suitable to detect changes in proteins. Spectral changes have also been observed in lipids and nucleic acids, which, along with protein modifications, have been

attributed to oxidative damages in combination with metabolic effects. With increasing duration of the quiescent cultivation, biomolecular changes were monitored successively by Raman and infrared spectroscopy. As in senescent cells, quiescent cells showed accumulative oxidative damages of proteins, nucleic acids and lipids with simultaneously down-regulated repair mechanisms. Lysosomal indigestible components in form of lipid droplets were observed in quiescent cells by Raman imaging. Due to the accumulations, the transitions between short- and long-term cultured cells were not abrupt but rather fluent, which was observed by batch variations. Senescent and quiescent cells pass through similar signaling pathways, express similar molecules and are both stained by a senescent marker. Thereby quiescent cells can be perceived as senescent cells. However, long-term cultured quiescent cells clearly differ from senescent cells in terms of the molecular composition. The longer the cells stayed in the quiescence, the more unlikely was the permanent return into proliferation without being or becoming senescent shortly afterwards. This was especially observed in serum-deprived quiescent cells. At the same time, contact inhibited quiescent cells were clearly distinguished from serum-deprived cells.

In conclusion, label-free spectroscopic techniques in combination with multivariate data analysis are powerful tools for the investigations of single cells and three-dimensional cell structures. Using non-destructive Raman imaging *in vivo* observations of cellular states and the associated changes in addition to *in vitro* investigations are possible. This can become particularly important for medical diagnostics, for example of aging skin. Together with infrared spectroscopy complementary information can subsequently be obtained *in situ* and *in vitro* particularly in regards to protein changes in aging cells. Based on the spectroscopically obtained findings for the different cell states and the changes in senescent and quiescent cells it might become possible to deduce starting points for “healthy” aging.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Statistisches Bundesamt Deutschland. Sterbetafeln, **2016**.
- (2) Campisi, J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (5), 339.
- (3) Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre, M.; Giovanni Nuciforo, P.; Bensimon, A. et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **2006**, *444* (7119), 638.
- (4) Jeyapalan, J. C.; Ferreira, M.; Sedivy, J. M.; Herbig, U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* **2007**, *128* (1), 36.
- (5) Baker, D. J.; Wijshake, T.; Tchkonina, T.; LeBrasseur, N. K.; Childs, B. G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J. L.; van Deursen, J. M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **2011**, *479* (7372), 232.
- (6) Mazzoleni, G.; Di Lorenzo, D.; Steimberg, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes & nutrition* **2009**, *4* (1), 13.
- (7) Maione, A. G.; Brudno, Y.; Stojadinovic, O.; Park, L. K.; Smith, A.; Tellechea, A.; Leal, E. C.; Kearney, C. J.; Veves, A.; Tomic-Canic, M. et al. Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic in vivo features of chronic wounds. *Tissue Eng Part C Methods* **2015**, *21* (5), 499.
- (8) Asai, T.; Liu, Y.; Bae, N.; Nimer, S. D. The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *J Cell Physiol* **2011**, *226* (9), 2215.
- (9) Lopez-Otin, C.; Blasco, M. A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **2013**, *153* (6), 1194.
- (10) Munro, J.; Steeghs, K.; Morrison, V.; Ireland, H.; Parkinson, E. K. Human fibroblast replicative senescence can occur in the absence of extensive cell division and short telomeres. *Oncogene* **2001**, *20* (27), 3541.
- (11) Lawless, C.; Wang, C.; Jurk, D.; Merz, A.; Zglinicki, T.; Passos, J. F. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol* **2010**, *45* (10), 772.
- (12) Short, M. A.; Wang, W.; Tai, I. T.; Zeng, H. Development and in vivo testing of a high frequency endoscopic Raman spectroscopy system for potential applications in the detection of early colonic neoplasia. *J Biophotonics* **2016**, *9* (1-2), 44.
- (13) Quatela, A.; Miloudi, L.; Tfayli, A.; Baillet-Guffroy, A. In vivo Raman Microspectroscopy: Intra- and Intersubject Variability of Stratum Corneum Spectral Markers. *Skin Pharmacol Physiol* **2016**, *29* (2), 102.
- (14) Krafft, C.; Belay, B.; Bergner, N.; Romeike, B. F.; Reichart, R.; Kalff, R.; Popp, J. Advances in optical biopsy--correlation of malignancy and cell density of primary brain tumors using Raman microspectroscopic imaging. *Analyst* **2012**, *137* (23), 5533.
- (15) Nallala, J.; Lloyd, G. R.; Shepherd, N.; Stone, N. High-resolution FTIR imaging of colon tissues for elucidation of individual cellular and histopathological features. *Analyst* **2016**, *141* (2), 630.
- (16) Matthaus, C.; Krafft, C.; Dietzek, B.; Brehm, B. R.; Lorkowski, S.; Popp, J. Noninvasive imaging of intracellular lipid metabolism in macrophages by Raman microscopy in combination with stable isotopic labeling. *Anal Chem* **2012**, *84* (20), 8549.
- (17) Hughes, C.; Henderson, A.; Kansiz, M.; Dorling, K. M.; Jimenez-Hernandez, M.; Brown, M. D.; Clarke, N. W.; Gardner, P. Enhanced FTIR bench-top imaging of single biological cells. *Analyst* **2015**, *140* (7), 2080.
- (18) Oshima, Y.; Shinzawa, H.; Takenaka, T.; Furihata, C.; Sato, H. Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* **2010**, *15* (1), 017009.
- (19) Zoladek, A. B.; Johal, R. K.; Garcia-Nieto, S.; Pascut, F.; Shakesheff, K. M.; Ghaemmaghami, A. M.; Notingher, I. Label-free molecular imaging of immunological synapses between dendritic and T cells by Raman micro-spectroscopy. *Analyst* **2010**, *135* (12), 3205.
- (20) Marro, M.; Nieva, C.; Sanz-Pamplona, R.; Sierra, A. Molecular monitoring of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells by means of Raman spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1843* (9), 1785.
- (21) Nieva, C.; Marro, M.; Santana-Codina, N.; Rao, S.; Petrov, D.; Sierra, A. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One* **2012**, *7* (10), e46456.
- (22) Konorov, S. O.; Jardon, M. A.; Piret, J. M.; Blades, M. W.; Turner, R. F. Raman microspectroscopy of live cells under autophagy-inducing conditions. *Analyst* **2012**, *137* (20), 4662.
- (23) Swain, R. J.; Jell, G.; Stevens, M. M. Non-invasive analysis of cell cycle dynamics in single living cells with Raman micro-spectroscopy. *J Cell Biochem* **2008**, *104* (4), 1427.

- (24) Short, K. W.; Carpenter, S.; Freyer, J. P.; Mourant, J. R. Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophys J* **2005**, *88* (6), 4274.
- (25) Farhane, Z.; Bonnier, F.; Casey, A.; Maguire, A.; O'Neill, L.; Byrne, H. J. Cellular discrimination using in vitro Raman micro spectroscopy: the role of the nucleolus. *Analyst* **2015**, *140* (17), 5908.
- (26) Okotrub, K. A.; Surovtsev, N. V.; Semeshin, V. F.; Omelyanchuk, L. V. Raman spectroscopy for DNA quantification in cell nucleus. *Cytometry A* **2015**, *87* (1), 68.
- (27) Tirinato, L.; Liberale, C.; Di Franco, S.; Candeloro, P.; Benfante, A.; La Rocca, R.; Potze, L.; Marotta, R.; Ruffilli, R.; Rajamanickam, V. P. et al. Lipid droplets: a new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells* **2015**, *33* (1), 35.
- (28) Stiebing, C.; Matthaus, C.; Krafft, C.; Keller, A. A.; Weber, K.; Lorkowski, S.; Popp, J. Complexity of fatty acid distribution inside human macrophages on single cell level using Raman micro-spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* **2014**, *406* (27), 7037.
- (29) Mourant, J. R.; Yamada, Y. R.; Carpenter, S.; Dominique, L. R.; Freyer, J. P. FTIR spectroscopy demonstrates biochemical differences in mammalian cell cultures at different growth stages. *Biophys J* **2003**, *85* (3), 1938.
- (30) Holton, S. E.; Walsh, M. J.; Bhargava, R. Subcellular localization of early biochemical transformations in cancer-activated fibroblasts using infrared spectroscopic imaging. *Analyst* **2011**, *136* (14), 2953.
- (31) Derenne, A.; Mignolet, A.; Goormaghtigh, E. FTIR spectral signature of anticancer drug effects on PC-3 cancer cells: is there any influence of the cell cycle? *Analyst* **2013**, *138* (14), 3998.
- (32) Ami, D.; Neri, T.; Natalello, A.; Mereghetti, P.; Doglia, S. M.; Zannoni, M.; Zuccotti, M.; Garagna, S.; Redi, C. A. Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1783* (1), 98.
- (33) Krafft, C.; Salzer, R.; Seitz, S.; Ern, C.; Schieker, M. Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging. *Analyst* **2007**, *132* (7), 647.
- (34) Jimenez-Hernandez, M.; Hughes, C.; Bassan, P.; Ball, F.; Brown, M. D.; Clarke, N. W.; Gardner, P. Exploring the spectroscopic differences of Caki-2 cells progressing through the cell cycle while proliferating in vitro. *Analyst* **2013**, *138* (14), 3957.
- (35) Jimenez-Hernandez, M.; Brown, M. D.; Hughes, C.; Clarke, N. W.; Gardner, P. Characterising cytotoxic agent action as a function of the cell cycle using Fourier transform infrared microspectroscopy. *Analyst* **2015**, *140* (13), 4453.
- (36) Di Giambattista, L.; Pozzi, D.; Grimaldi, P.; Gaudenzi, S.; Morrone, S.; Castellano, A. C. New marker of tumor cell death revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *399* (8), 2771.
- (37) Krishna, C. M.; Kegelaer, G.; Adt, I.; Rubin, S.; Kartha, V. B.; Manfait, M.; Sockalingum, G. D. Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines. *Biopolymers* **2006**, *82* (5), 462.
- (38) Gajjar, K.; Heppenstall, L. D.; Pang, W.; Ashton, K. M.; Trevisan, J.; Patel, II; Llabjani, V.; Stringfellow, H. F.; Martin-Hirsch, P. L.; Dawson, T. et al. Diagnostic segregation of human brain tumours using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis. *Anal Methods* **2012**, *5*, 89.
- (39) Nallala, J.; Piot, O.; Diebold, M. D.; Gobinet, C.; Bouche, O.; Manfait, M.; Sockalingum, G. D. Infrared and Raman imaging for characterizing complex biological materials: a comparative morpho-spectroscopic study of colon tissue. *Appl Spectrosc* **2014**, *68* (1), 57.
- (40) Clede, S.; Lambert, F.; Sandt, C.; Kascakova, S.; Unger, M.; Harte, E.; Plamont, M. A.; Saint-Fort, R.; Deniset-Besseau, A.; Gueroui, Z. et al. Detection of an estrogen derivative in two breast cancer cell lines using a single core multimodal probe for imaging (SCoMPI) imaged by a panel of luminescent and vibrational techniques. *Analyst* **2013**, *138* (19), 5627.
- (41) Wood, B. R.; Chernenko, T.; Matthäus, C.; Diem, M.; Chong, C.; Bernhard, U.; Jene, C.; Brandli, A. A.; McNaughton, D.; Tobin, M. J. et al. Shedding new light on the molecular architecture of oocytes using a combination of synchrotron Fourier transform-infrared and Raman spectroscopic mapping. *Anal Chem* **2008**, *80* (23), 9065.
- (42) Wagener, C.; Müller, O. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen*; Thieme, **2010**.
- (43) Hayflick, L. Theories of biological aging. *Exp Gerontol* **1985**, *20* (3-4), 145.
- (44) Sager, R. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect* **1991**, *93*, 59.
- (45) Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **2005**, *120* (4), 513.
- (46) Adams, P. D. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell* **2009**, *36* (1), 2.

- (47) Hayflick, L.; Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **1961**, *25*, 585.
- (48) Chaturvedi, V.; Qin, J. Z.; Denning, M. F.; Choubey, D.; Diaz, M. O.; Nickoloff, B. J. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem* **1999**, *274* (33), 23358.
- (49) Marcotte, R.; Lacelle, C.; Wang, E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech Ageing Dev* **2004**, *125* (10-11), 777.
- (50) Campisi, J.; d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (9), 729.
- (51) Xue, W.; Zender, L.; Miething, C.; Dickins, R. A.; Hernando, E.; Krizhanovsky, V.; Cordon-Cardo, C.; Lowe, S. W. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **2007**, *445* (7128), 656.
- (52) Krizhanovsky, V.; Yon, M.; Dickins, R. A.; Hearn, S.; Simon, J.; Miething, C.; Yee, H.; Zender, L.; Lowe, S. W. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **2008**, *134* (4), 657.
- (53) Nelson, G.; Wordsworth, J.; Wang, C.; Jurk, D.; Lawless, C.; Martin-Ruiz, C.; von Zglinicki, T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Ageing Cell* **2012**, *11* (2), 345.
- (54) Ben-Porath, I.; Weinberg, R. A. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* **2004**, *113* (1), 8.
- (55) Ben-Porath, I.; Weinberg, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, *37* (5), 961.
- (56) Serrano, M.; Lin, A. W.; McCurrach, M. E.; Beach, D.; Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **1997**, *88* (5), 593.
- (57) Serrano, M.; Blasco, M. A. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* **2001**, *13* (6), 748.
- (58) Lloyd, A. C. Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* **2002**, *4* (2), E25.
- (59) Passos, J. F.; Saretzki, G.; von Zglinicki, T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (22), 7505.
- (60) Chen, Z.; Trotman, L. C.; Shaffer, D.; Lin, H. K.; Dotan, Z. A.; Niki, M.; Koutcher, J. A.; Scher, H. I.; Ludwig, T.; Gerald, W. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **2005**, *436* (7051), 725.
- (61) Braig, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Rudolph, C.; Peters, A. H.; Schlegelberger, B.; Stein, H.; Dörken, B.; Jenuwein, T.; Schmitt, C. A. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **2005**, *436* (7051), 660.
- (62) Collado, M.; Gil, J.; Efeyan, A.; Guerra, C.; Schuhmacher, A. J.; Barradas, M.; Benguria, A.; Zaballos, A.; Flores, J. M.; Barbacid, M. et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **2005**, *436* (7051), 642.
- (63) Campisi, J.; Andersen, J. K.; Kapahi, P.; Melov, S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* **2011**, *21* (6), 354.
- (64) Martin, J. A.; Buckwalter, J. A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* **2003**, *85-A Suppl 2*, 106.
- (65) Krizhanovsky, V.; Xue, W.; Zender, L.; Yon, M.; Hernando, E.; Lowe, S. W. Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2008**, *73*, 513.
- (66) Jun, J. I.; Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* **2010**, *12* (7), 676.
- (67) Tan, M.; Li, H.; Sun, Y. Inactivation of Sag/Rbx2/Roc2 e3 ubiquitin ligase triggers senescence and inhibits kras-induced immortalization. *Neoplasia* **2015**, *17* (1), 114.
- (68) Vicencio, J. M.; Galluzzi, L.; Tajeddine, N.; Ortiz, C.; Criollo, A.; Tasdemir, E.; Morselli, E.; Ben Younes, A.; Maiuri, M. C.; Lavandro, S. et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* **2008**, *54* (2), 92.
- (69) Campisi, J. Aging and cancer cell biology, 2008. *Ageing Cell* **2008**, *7* (3), 281.
- (70) Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **1965**, *37*, 614.
- (71) Cristofalo, V. J.; Kritchevsky, D. Cell size and nucleic acid content in the diploid human cell line WI-38 during aging. *Med Exp Int J Exp Med* **1969**, *19* (6), 313.
- (72) Acosta, J. C.; O'Loughlen, A.; Banito, A.; Guijarro, M. V.; Augert, A.; Raguz, S.; Fumagalli, M.; Da Costa, M.; Brown, C.; Popov, N. et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **2008**, *133* (6), 1006.
- (73) Coppé, J. P.; Patil, C. K.; Rodier, F.; Sun, Y.; Muñoz, D. P.; Goldstein, J.; Nelson, P. S.; Desprez, P. Y.; Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-

- nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **2008**, *6* (12), 2853.
- (74) Coppé, J. P.; Desprez, P. Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **2010**, *5*, 99.
- (75) Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (20), 9363.
- (76) Passos, J. F.; von Zglinicki, T.; Kirkwood, T. B. Mitochondria and ageing: winning and losing in the numbers game. *Bioessays* **2007**, *29* (9), 908.
- (77) Rodier, F.; Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **2011**, *192* (4), 547.
- (78) Hwang, E. S. Replicative senescence and senescence-like state induced in cancer-derived cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **2002**, *123* (12), 1681.
- (79) Herbig, U.; Jobling, W. A.; Chen, B. P.; Chen, D. J.; Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **2004**, *14* (4), 501.
- (80) Brown, W. R. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* **1989**, *338* (6218), 774.
- (81) Zglinicki, T. v.; Saretzki, G.; Ladhoff, J.; Fagagna, F. d. A. d.; Jackson, S. P. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of Ageing and Development* **2005**, *126* (1), 111.
- (82) Darzynkiewicz, Z. When senescence masquerades as DNA damage: Is DNA replication stress the culprit?: Comment on: Pospelova T, et al. Cell Cycle 2009; 8:In press. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2009**, *8* (23), 3810.
- (83) Ghosh, A.; Rossi, M. L.; Aulds, J.; Croteau, D.; Bohr, V. A. Telomeric D-loops Containing 8-Oxo-2'-deoxyguanosine Are Preferred Substrates for Werner and Bloom Syndrome Helicases and Are Bound by POT1. *The Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (45), 31074.
- (84) Packer, L.; Fuehr, K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* **1977**, *267* (5610), 423.
- (85) Passos, J. F.; Miwa, S.; von Zglinicki, T. In *Cell Senescence: Methods and Protocols*; Galluzzi, L.; Vitale, I.; Kepp, O.; Kroemer, G., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013, DOI:10.1007/978-1-62703-239-1_17 10.1007/978-1-62703-239-1_17.
- (86) White, E.; Lowe, S. W. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev* **2009**, *23* (7), 784.
- (87) Matjusaitis, M.; Chin, G.; Sarnoski, E. A.; Stolzing, A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev* **2016**, *29*, 1.
- (88) Quan, T.; Fisher, G. J. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology* **2015**, *61* (5), 427.
- (89) Marthandan, S.; Priebe, S.; Hemmerich, P.; Klement, K.; Diekmann, S. Long-term quiescent fibroblast cells transit into senescence. *PLoS One* **2014**, *9* (12), e115597.
- (90) Schäuble, S.; Klement, K.; Marthandan, S.; Münch, S.; Heiland, I.; Schuster, S.; Hemmerich, P.; Diekmann, S. Quantitative model of cell cycle arrest and cellular senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e42150.
- (91) Marthandan, S.; Baumgart, M.; Priebe, S.; Groth, M.; Schaer, J.; Kaether, C.; Guthke, R.; Cellerino, A.; Platzner, M.; Diekmann, S. et al. Conserved Senescence Associated Genes and Pathways in Primary Human Fibroblasts Detected by RNA-Seq. *PLoS One* **2016**, *11* (5), e0154531.
- (92) Brohem, C. A.; Cardeal, L. B.; Tiago, M.; Soengas, M. S.; Barros, S. B.; Maria-Engler, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment cell & melanoma research* **2011**, *24* (1), 35.
- (93) Bell, E.; Sher, S.; Hull, B.; Merrill, C.; Rosen, S.; Chamson, A.; Asselineau, D.; Dubertret, L.; Coulomb, B.; Lapiere, C. et al. The reconstitution of living skin. *The Journal of investigative dermatology* **1983**, *81* (1 Suppl), 2s.
- (94) Wiegand, C.; Springer, S.; Abel, M.; Wesarg, F.; Ruth, P.; Hipler, U. C. Application of a drainage film reduces fibroblast ingrowth into large-pored polyurethane foam during negative-pressure wound therapy in an in vitro model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **2013**, *21* (5), 697.
- (95) Pajalunga, D.; Mazzola, A.; Salzano, A. M.; Biferi, M. G.; De Luca, G.; Crescenzi, M. Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol* **2007**, *176* (6), 807.
- (96) Valcourt, J. R.; Lemons, J. M.; Haley, E. M.; Kojima, M.; Demuren, O. O.; Collier, H. A. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle* **2012**, *11* (9), 1680.

- (97) Lemons, J. M.; Feng, X. J.; Bennett, B. D.; Legesse-Miller, A.; Johnson, E. L.; Raitman, I.; Pollina, E. A.; Rabitz, H. A.; Rabinowitz, J. D.; Collier, H. A. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biol* **2010**, *8* (10), e1000514.
- (98) Laporte, D.; Courtout, F.; Salin, B.; Ceschin, J.; Sagot, I. An array of nuclear microtubules reorganizes the budding yeast nucleus during quiescence. *J Cell Biol* **2013**, *203* (4), 585.
- (99) Everitts, A. G.; Manning, A. L.; Wang, X.; Dyson, N. J.; Garcia, B. A.; Collier, H. A. H4K20 methylation regulates quiescence and chromatin compaction. *Mol Biol Cell* **2013**, *24* (19), 3025.
- (100) Gray, J. V.; Petsko, G. A.; Johnston, G. C.; Ringe, D.; Singer, R. A.; Werner-Washburne, M. "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2004**, *68* (2), 187.
- (101) Collier, H. A.; Sang, L.; Roberts, J. M. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* **2006**, *4* (3), e83.
- (102) Perucca, P.; Cazzalini, O.; Madine, M.; Savio, M.; Laskey, R. A.; Vannini, V.; Prosperi, E.; Stivala, L. A. Loss of p21 CDKN1A impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence. *Cell Cycle* **2009**, *8* (1), 105.
- (103) Lorenzini, A.; Johnson, F. B.; Oliver, A.; Tresini, M.; Smith, J. S.; Hdeib, M.; Sell, C.; Cristofalo, V. J.; Stamato, T. D. Significant correlation of species longevity with DNA double strand break recognition but not with telomere length. *Mech Ageing Dev* **2009**, *130* (11-12), 784.
- (104) Tollesbol, T. O. *Biological Aging: Methods and Protocols*; Humana Press, **2007**.
- (105) Narita, M.; Nunez, S.; Heard, E.; Lin, A. W.; Hearn, S. A.; Spector, D. L.; Hannon, G. J.; Lowe, S. W. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **2003**, *113* (6), 703.
- (106) Kosar, M.; Bartkova, J.; Hubackova, S.; Hodny, Z.; Lukas, J.; Bartek, J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 457.
- (107) Lin, A. W.; Barradas, M.; Stone, J. C.; van Aelst, L.; Serrano, M.; Lowe, S. W. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **1998**, *12* (19), 3008.
- (108) McConnell, B. B.; Starborg, M.; Brookes, S.; Peters, G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* **1998**, *8* (6), 351.
- (109) Robles, S. J.; Adami, G. R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **1998**, *16* (9), 1113.
- (110) Rojas, M.; Meiners, S.; Saux, C. J. L. *Molecular Aspects of Aging: Understanding Lung Aging*; Wiley, **2014**.
- (111) Hewitt, G.; von Zglinicki, T.; Passos, J. F. Cell sorting of young and senescent cells. *Methods Mol Biol* **2013**, *1048*, 31.
- (112) Sikora, E.; Arendt, T.; Bennett, M.; Narita, M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev* **2011**, *10* (1), 146.
- (113) Itahana, K.; Campisi, J.; Dimri, G. P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* **2007**, *371*, 21.
- (114) Lee, B. Y.; Han, J. A.; Im, J. S.; Morrone, A.; Johung, K.; Goodwin, E. C.; Kleijer, W. J.; DiMaio, D.; Hwang, E. S. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Ageing Cell* **2006**, *5* (2), 187.
- (115) Georgakopoulou, E. A.; Tsimaratou, K.; Evangelou, K.; Fernandez Marcos, P. J.; Zoumpourlis, V.; Trougakos, I. P.; Kletsas, D.; Bartek, J.; Serrano, M.; Gorgoulis, V. G. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Ageing (Albany NY)* **2013**, *5* (1), 37.
- (116) Ksiazek, K.; Passos, J. F.; Olijslagers, S.; von Zglinicki, T. Mitochondrial dysfunction is a possible cause of accelerated senescence of mesothelial cells exposed to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *366* (3), 793.
- (117) Clark, D.; Held, A.; Pazdernik, N. *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*; Spektrum Akademischer Verlag, **2009**.
- (118) Qin, Z.; Balimunkwe, R. M.; Quan, T. Age-related reduction of dermal fibroblast size up-regulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. *British Journal of Dermatology* **2017**, DOI:10.1111/bjd.15379 10.1111/bjd.15379, n/a.
- (119) Brendel, D.; Skoog, D. A.; Hoffstetter-Kuhn, S.; Leary, J. J. *Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen*; Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
- (120) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Thieme, **2005**.
- (121) Richter, G. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen*; Thieme, **2003**.
- (122) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature* **1928**, *121* (2), 501.

- (123) WITec GmbH. Solutions for High-Resolution Confocal Raman Microscopy. Broschüre, **2017**.
- (124) Günzler, H.; Gremlich, H. U. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*; Wiley, **2012**.
- (125) Smith, G. D. Infrared Microspectroscopy Using a Synchrotron Source for Arts-Science Research. *Journal of the American Institute for Conservation* **2003**, *42* (3), 399.
- (126) Kessler, W. *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma, Bio- und Prozessanalytik*; Wiley, **2007**.
- (127) Eberhardt, K.; Stiebing, C.; Matthäus, C.; Schmitt, M.; Popp, J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2015**, *15* (6), 773.
- (128) Danzer, K.; Hobert, H.; Fischbacher, C.; Jagemann, K. U. *Chemometrik: Grundlagen und Anwendungen*; Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
- (129) Meisel, S.; Stockel, S.; Rosch, P.; Popp, J. Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy. *Food Microbiol* **2014**, *38*, 36.
- (130) Tolstik, T.; Marquardt, C.; Matthäus, C.; Bergner, N.; Bielecki, C.; Krafft, C.; Stallmach, A.; Popp, J. Discrimination and classification of liver cancer cells and proliferation states by Raman spectroscopic imaging. *Analyst* **2014**, *139* (22), 6036.
- (131) Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* **1901**, *2* (6), 559.
- (132) Tang, L.; Peng, S.; Bi, Y.; Shan, P.; Hu, X. A New Method Combining LDA and PLS for Dimension Reduction. *PLoS ONE* **2014**, *9* (5), e96944.
- (133) Beleites, C. Raman-spektroskopische Diagnostik von primären Hirntumoren mit Hilfe weicher chemometrischer Klassifikationsmethoden. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität, **2014**.
- (134) Krafft, C.; Beleites, C.; Schie, I. W.; Clement, J. H.; Popp, J. Raman-based identification of circulating tumor cells for cancer diagnosis. *Proc. SPIE* **2016**, *9704*, 970408.
- (135) Rüger, J.; Unger, N.; Schie, I. W.; Brunner, E.; Popp, J.; Krafft, C. Assessment of growth phases of the diatom *Ditylum brightwellii* by FT-IR and Raman spectroscopy. *Algal Research* **2016**, *19*, 246.
- (136) Assmann, C.; Kirchhoff, J.; Beleites, C.; Hey, J.; Kostudis, S.; Pfister, W.; Schlattmann, P.; Popp, J.; Neugebauer, U. Identification of vancomycin interaction with *Enterococcus faecalis* within 30 min of interaction time using Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (27), 8343.
- (137) Schlittgen, R. *Multivariate Statistik*; De Gruyter, **2009**.
- (138) Fisher, R. A. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics* **1936**, *7* (2), 179.
- (139) Backhaus, K.; Erichson, B.; Plinke, W.; Weiber, R. *Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung*; Springer Berlin Heidelberg, **2015**.
- (140) Kohavi, R. In *Proceedings of the 14th international joint conference on Artificial intelligence - Volume 2*; Morgan Kaufmann Publishers Inc.: Montreal, Quebec, Canada, 1995.
- (141) Beleites, C.; Baumgartner, R.; Bowman, C.; Somorjai, R.; Steiner, G.; Salzer, R.; Sowa, M. G. Variance reduction in estimating classification error using sparse datasets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2005**, *79* (1–2), 91.
- (142) Honda, S.; Weigel, A.; Hjelmeland, L. M.; Handa, J. T. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *282* (2), 493.
- (143) Metzger, W.; Sossong, D.; Bächle, A.; Pütz, N.; Wennemuth, G.; Pohlemann, T.; Oberringer, M. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy* **2011**, *13* (8), 1000.
- (144) Core Team, R. R: A language and environment for statistical computing. **2015**.
- (145) Beleites, C.; Sergio, V. hyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R. **2015**.
- (146) Beleites, C. cbmodels: Collection of "combined" models: PCA-LDA, PLS-LDA, PLS-LR as well as EMSC. **2015**.
- (147) Wickham, H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*; Springer New York, **2009**.
- (148) Ryabchykov, O.; Bocklitz, T.; Ramoji, A.; Neugebauer, U.; Foerster, M.; Kroegel, C.; Bauer, M.; Kiehntopf, M.; Popp, J. Automatization of spike correction in Raman spectra of biological samples. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2016**, *155*, 1.
- (149) Mevik, B.-H.; Wehrens, R.; Liland, K. H. pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression. **2015**.
- (150) Venables, W. N.; Ripley, B. D. *Modern Applied Statistics with S*; Springer-Verlag New York, **2002**.
- (151) Sing, T.; Sander, O.; Beerenwinkel, N.; Lengauer, T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics* **2005**, *21* (20), 3940.
- (152) Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **2007**, *42* (5), 493.

- (153) Naumann, D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews* **2001**, *36* (2-3), 239.
- (154) Naumann, D. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006, DOI:10.1002/9780470027318.a01117 10.1002/9780470027318.a0117.
- (155) Boitor, R.; Sinjab, F.; Strohbuecker, S.; Sottile, V.; Notingher, I. Towards quantitative molecular mapping of cells by Raman microscopy: using AFM for decoupling molecular concentration and cell topography. *Faraday Discuss* **2016**, *187*, 199.
- (156) Schie, I. W.; Chan, J. W. Estimation of spectra sample size for characterizing single cells using micro-Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2016**, *47* (4), 384.
- (157) Terentis, A. C.; Fox, S. A.; Friedman, S. J.; Spencer, E. S. Confocal Raman microspectroscopy discriminates live human metastatic melanoma and skin fibroblast cells. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44* (9), 1205.
- (158) Krafft, C.; Schie, I. W.; Meyer, T.; Schmitt, M.; Popp, J. Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications. *Chem Soc Rev* **2016**, *45* (7), 1819.
- (159) Ali, J. H.; Wang, W. B.; Zevallos, M.; Alfano, R. R. Near infrared spectroscopy and imaging to probe differences in water content in normal and cancer human prostate tissues. *Technol Cancer Res Treat* **2004**, *3* (5), 491.
- (160) Mo, J.; Zheng, W.; Low, J. J. H.; Ng, J.; Ilancheran, A.; Huang, Z. High Wavenumber Raman Spectroscopy for in Vivo Detection of Cervical Dysplasia. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (21), 8908.
- (161) Li, Y.; Lei, D.; Swindell, W. R.; Xia, W.; Weng, S.; Fu, J.; Worthen, C. A.; Okubo, T.; Johnston, A.; Gudjonsson, J. E. et al. Age-Associated Increase in Skin Fibroblast-Derived Prostaglandin E2 Contributes to Reduced Collagen Levels in Elderly Human Skin. *The Journal of investigative dermatology* **2015**, *135* (9), 2181.
- (162) Martien, S.; Pluquet, O.; Vercamer, C.; Malaquin, N.; Martin, N.; Gosselin, K.; Pourtier, A.; Abbadie, C. Cellular senescence involves an intracrine prostaglandin E2 pathway in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1831* (7), 1217.
- (163) Tsujii, A.; Miyamoto, Y.; Moriyama, T.; Tsuchiya, Y.; Obuse, C.; Mizuguchi, K.; Oka, M.; Yoneda, Y. Retinoblastoma-binding Protein 4-regulated Classical Nuclear Transport Is Involved in Cellular Senescence. *J Biol Chem* **2015**, *290* (49), 29375.
- (164) Shiozawa-West, N.; Dunlop, R. A.; Rodgers, K. J. Using an in vitro model to study oxidised protein accumulation in ageing fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1850* (11), 2177.
- (165) Lee, A. C.; Fenster, B. E.; Ito, H.; Takeda, K.; Bae, N. S.; Hirai, T.; Yu, Z. X.; Ferrans, V. J.; Howard, B. H.; Finkel, T. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **1999**, *274* (12), 7936.
- (166) Hütter, E.; Unterluggauer, H.; Überall, F.; Schramek, H.; Jansen-Dürr, P. Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. *Experimental Gerontology* **2002**, *37* (10-11), 1165.
- (167) Klement, K.; Melle, C.; Murzik, U.; Diekmann, S.; Norgauer, J.; Hemmerich, P. Accumulation of annexin A5 at the nuclear envelope is a biomarker of cellular aging. *Mech Ageing Dev* **2012**, *133* (7), 508.
- (168) Alsayegh, K. N.; Gadepalli, V. S.; Iyer, S.; Rao, R. R. Knockdown of CDK2AP1 in primary human fibroblasts induces p53 dependent senescence. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0120782.
- (169) Bai, H.; Li, H.; Han, Z.; Zhang, C.; Zhao, J.; Miao, C.; Yan, S.; Mao, A.; Zhao, H.; Han, Z. Label-free assessment of replicative senescence in mesenchymal stem cells by Raman microspectroscopy. *Biomed Opt Express* **2015**, *6* (11), 4493.
- (170) Brunk, U. T.; Terman, A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* **2002**, *33* (5), 611.
- (171) Jung, T.; Bader, N.; Grune, T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann NY Acad Sci* **2007**, *1119*, 97.
- (172) Mariani, M. M.; Maccoux, L. J.; Matthäus, C.; Diem, M.; Hengstler, J. G.; Deckert, V. Micro-Raman detection of nuclear membrane lipid fluctuations in senescent epithelial breast cancer cells. *Anal Chem* **2010**, *82* (10), 4259.
- (173) Gey, C.; Seeger, K. Metabolic changes during cellular senescence investigated by proton NMR-spectroscopy. *Mech Ageing Dev* **2013**, *134* (3-4), 130.
- (174) Gioacchini, G.; Giorgini, E.; Vaccari, L.; Ferraris, P.; Sabbatini, S.; Bianchi, V.; Borini, A.; Carnevali, O. A new approach to evaluate aging effects on human oocytes: Fourier transform infrared imaging spectroscopy study. *Fertil Steril* **2014**, *101* (1), 120.
- (175) Gasparri, F.; Muzio, M. Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem J* **2003**, *369* (Pt 2), 239.

- (176) Kumar, S.; Shabi, T. S.; Goormaghtigh, E. A FTIR imaging characterization of fibroblasts stimulated by various breast cancer cell lines. *PLoS One* **2014**, *9* (11), e111137.
- (177) Marthandan, S.; Priebe, S.; Baumgart, M.; Groth, M.; Cellerino, A.; Guthke, R.; Hemmerich, P.; Diekmann, S. Similarities in Gene Expression Profiles during In Vitro Aging of Primary Human Embryonic Lung and Foreskin Fibroblasts. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 731938.
- (178) Diem, M.; Miljkovic, M.; Bird, B.; Chernenko, T.; Schubert, J.; Marcsisin, E.; Mazur, A.; Kingston, E.; Zuser, E.; Papamarkakis, K. et al. Applications of Infrared and Raman Microspectroscopy of Cells and Tissue in Medical Diagnostics: Present Status and Future Promises. *Spectroscopy: An International Journal* **2012**, *27* (5-6), 34.
- (179) Epstein, E. H., Jr. (Alpha1(3))₃ human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem* **1974**, *249* (10), 3225.
- (180) Votteler, M.; Carvajal Berrio, D. A.; Pudlas, M.; Walles, H.; Stock, U. A.; Schenke-Layland, K. Raman spectroscopy for the non-contact and non-destructive monitoring of collagen damage within tissues. *J Biophotonics* **2012**, *5* (1), 47.
- (181) Cheheltani, R.; McGoverin, C. M.; Rao, J.; Vorp, D. A.; Kiani, M. F.; Pleshko, N. Fourier transform infrared spectroscopy to quantify collagen and elastin in an in vitro model of extracellular matrix degradation in aorta. *Analyst* **2014**, *139* (12), 3039.
- (182) Diem, M.; Chiriboga, L.; Lasch, P.; Pacifico, A. IR spectra and IR spectral maps of individual normal and cancerous cells. *Biopolymers* **2002**, *67* (4-5), 349.
- (183) Lasch, P.; Pacifico, A.; Diem, M. Spatially resolved IR microspectroscopy of single cells. *Biopolymers* **2002**, *67* (4-5), 335.
- (184) Lasch, P.; Chiriboga, L.; Yee, H.; Diem, M. Infrared spectroscopy of human cells and tissue: detection of disease. *Technol Cancer Res Treat* **2002**, *1* (1), 1.
- (185) Friedl, P.; Brocker, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **2000**, *57* (1), 41.
- (186) Elsdale, T.; Bard, J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* **1972**, *54* (3), 626.
- (187) Bratic, A.; Larsson, N. G. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* **2013**, *123* (3), 951.
- (188) Ray, P. D.; Huang, B. W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **2012**, *24* (5), 981.
- (189) Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-Dechent, W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **2007**, *3* (11), 1941.
- (190) Poljsak, B.; Dahmane, R. G.; Godic, A. Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* **2012**, *21* (2), 33.
- (191) Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **2005**, *120* (4), 483.
- (192) Goud, A. P.; Goud, P. T.; Diamond, M. P.; Gonik, B.; Abu-Soud, H. M. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* **2008**, *44* (7), 1295.
- (193) Lim, J.; Luderer, U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod* **2011**, *84* (4), 775.
- (194) Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Science* **1992**, *257* (5074), 1220.
- (195) Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* **2003**, *329* (1-2), 23.
- (196) Thakor, A. S.; Paulmurugan, R.; Kempen, P.; Zavaleta, C.; Sinclair, R.; Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells. *Small* **2011**, *7* (1), 126.
- (197) Gault, N.; Rigaud, O.; Poncy, J. L.; Lefaix, J. L. Infrared microspectroscopy study of gamma-irradiated and H₂O₂-treated human cells. *Int J Radiat Biol* **2005**, *81* (10), 767.
- (198) Boydston-White, S.; Romeo, M.; Chernenko, T.; Regina, A.; Miljkovic, M.; Diem, M. Cell-cycle-dependent variations in FTIR micro-spectra of single proliferating HeLa cells: principal component and artificial neural network analysis. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758* (7), 908.
- (199) Tigges, J.; Krutmann, J.; Fritsche, E.; Haendeler, J.; Schaal, H.; Fischer, J. W.; Kalfalah, F.; Reinke, H.; Reifenberger, G.; Stühler, K. et al. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **2014**, *138*, 26.
- (200) Rodier, F.; Muñoz, D. P.; Teachenor, R.; Chu, V.; Le, O.; Bhaumik, D.; Coppé, J.-P.; Campeau, E.; Beauséjour, C. M.; Kim, S.-H. et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of cell science* **2010**, *124* (1), 68.
- (201) Sanchez, V.; Redmann, K.; Wistuba, J.; Wubbeling, F.; Burger, M.; Oldenhof, H.; Wolkers, W. F.; Kliesch, S.; Schlatt, S.; Mallidis, C. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. *Fertil Steril* **2012**, *98* (5), 1124.

- (202) Ali, S. M.; Bonnier, F.; Ptasinski, K.; Lambkin, H.; Flynn, K.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J. Raman spectroscopic mapping for the analysis of solar radiation induced skin damage. *Analyst* **2013**, *138* (14), 3946.
- (203) Farhane, Z.; Bonnier, F.; Maher, M. A.; Bryant, J.; Casey, A.; Byrne, H. J. Differentiating responses of lung cancer cell lines to Doxorubicin exposure: in vitro Raman micro spectroscopy, oxidative stress and bcl-2 protein expression. *J Biophotonics* **2016**, DOI:10.1002/jbio.201600019 10.1002/jbio.201600019.
- (204) Lui, H.; Zhao, J.; McLean, D.; Zeng, H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Res* **2012**, *72* (10), 2491.
- (205) Koolman, J.; Röhm, K. H.; Wirth, J. *Taschenatlas der Biochemie*; Thieme, **2003**.
- (206) Schneider, A.; Graber, F.; Hoppeler, H. Lipofuszin: «Alterspigment» in der Muskelzelle. *Schweizerische Zeitschrift für «Sportmedizin und Sporttraumatologie»* **2004**, *52* (4), 162.
- (207) Townend, R.; Kumosinski, T. F.; Timasheff, S. N.; Fasman, G. D.; Davidson, B. The circular dichroism of the beta structure of poly-L-lysine. *Biochem Biophys Res Commun* **1966**, *23* (2), 163.
- (208) Epand, R. M.; Wheeler, G. E.; Moscarello, M. A. Circular dichroism and proton magnetic resonance studies of random chain poly-L-lysine. *Biopolymers* **1974**, *13* (2), 359.
- (209) Zhang, J.; Yan, Y. B. Probing conformational changes of proteins by quantitative second-derivative infrared spectroscopy. *Anal Biochem* **2005**, *340* (1), 89.
- (210) Sitte, N.; Merker, K.; von Zglinicki, T.; Grune, T. Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **2000**, *28* (5), 701.
- (211) Sitte, N.; Merker, K.; Von Zglinicki, T.; Grune, T.; Davies, K. J. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *FASEB J* **2000**, *14* (15), 2495.
- (212) Widmer, R.; Ziaja, I.; Grune, T. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radic Res* **2006**, *40* (12), 1259.
- (213) Kovatcheva, M.; Liu, D. D.; Dickson, M. A.; Klein, M. E.; O'Connor, R.; Wilder, F. O.; Socci, N. D.; Tap, W. D.; Schwartz, G. K.; Singer, S. et al. MDM2 turnover and expression of ATRX determine the choice between quiescence and senescence in response to CDK4 inhibition. *Oncotarget* **2015**, *6* (10), 8226.
- (214) Forsyth, N. R.; Evans, A. P.; Shay, J. W.; Wright, W. E. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell* **2003**, *2* (5), 235.
- (215) Lu, Y. S.; Huang, B. T.; Huang, Y. X. Reactive oxygen species formation and apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell induced by 900 MHz mobile phone radiation. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, *2012*, 740280.
- (216) Puppels, G. J.; Olminkhof, J. H.; Segers-Nolten, G. M.; Otto, C.; de Mul, F. F.; Greve, J. Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light. *Exp Cell Res* **1991**, *195* (2), 361.
- (217) Lackner, D. H.; Hayashi, M. T.; Cesare, A. J.; Karlseder, J. A genomics approach identifies senescence-specific gene expression regulation. *Aging Cell* **2014**, *13* (5), 946.
- (218) Hara, E.; Smith, R.; Parry, D.; Tahara, H.; Stone, S.; Peters, G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* **1996**, *16* (3), 859.
- (219) Beausejour, C. M.; Krtolica, A.; Galimi, F.; Narita, M.; Lowe, S. W.; Yaswen, P.; Campisi, J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **2003**, *22* (16), 4212.
- (220) Krafft, C.; Knetschke, T.; Siegner, A.; Funk, R. H. W.; Salzer, R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **2003**, *32* (1), 75.
- (221) Naderi, J.; Hung, M.; Pandey, S. Oxidative stress-induced apoptosis in dividing fibroblasts involves activation of p38 MAP kinase and over-expression of Bax: resistance of quiescent cells to oxidative stress. *Apoptosis* **2003**, *8* (1), 91.
- (222) Fox, C. J.; Hammerman, P. S.; Thompson, C. B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5* (11), 844.
- (223) Valentin, M.; Yang, E. Autophagy is activated, but is not required for the G0 function of BCL-2 or BCL-xL. *Cell Cycle* **2008**, *7* (17), 2762.
- (224) Young, A. R.; Narita, M.; Ferreira, M.; Kirschner, K.; Sadaie, M.; Darot, J. F.; Tavaré, S.; Arakawa, S.; Shimizu, S.; Watt, F. M. et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **2009**, *23* (7), 798.
- (225) Gewirtz, D. A. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* **2013**, *9* (5), 808.
- (226) Corradetti, M. N.; Guan, K. L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* **2006**, *25* (48), 6347.

-
- (227) Cho, S.; Hwang, E. S. Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Mol Cells* **2012**, *33* (6), 597.
- (228) Serrano, M. Shifting senescence into quiescence by turning up p53. *Cell Cycle* **2010**, *9* (21), 4256.
- (229) Demidenko, Z. N.; Blagosklonny, M. V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* **2008**, *7* (21), 3355.
- (230) Dulic, V. Be quiet and you'll keep young: does mTOR underlie p53 action in protecting against senescence by favoring quiescence? *Aging (Albany NY)* **2011**, *3* (1), 3.
- (231) van Manen, H. J.; Kraan, Y. M.; Roos, D.; Otto, C. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (29), 10159.
- (232) Weichhart, T. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life. *Methods Mol Biol* **2012**, *821*, 1.

7 Anhang

7.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Tabelle 15: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
Adsorptionstrockner K-MT 3 LAB	Parker Hannifin GmbH, Essen, Deutschland
Druckluftfiltration OIL-X EVOLUTION	Parker Hannifin GmbH, Essen, Deutschland
Inkubator RCO3000T	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kamera CCD und EMCCD, Newton 970	Andor, Belfast, UK
Kryostat, Leica CM1510 S,	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Mikroskop FT-IR Varian 620	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Mikroskop LSM510Meta	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop LSM710	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus IX70	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Raman-Imaging alpha300 R	WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, Ulm, Deutschland
Objektiv NIR Apo 60x/NA 1.0 W	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Pipetten Gilson	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Reinstwasseranlage Milli-Q Plus 185	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schüttler Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Spektrometer FT-IR Varian 670-IR	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5415 R (Rotor 82656)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R (Rotor 8179)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Tabelle 16: Verwendete Materialien.

Materialien	Hersteller
Deckgläschen zur Mikroskopie, 12 und 15 mm	VWR International, Radnor, PA, USA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kulturflaschen 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Multiwellplatte, BD Falcon, 6-, 12- und 96-Well	Becton, Dickinson and Company, NJ, USA
Objektträger Calciumfluorid	Crystal GmbH, Berlin, Deutschland
Objektträger zur Mikroskopie, SuperFrost	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Materialien	Hersteller
Pasteurpipette Glas, 230 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipette Kunststoff, 152 mm	VWR International, Radnor, PA, USA
Pipetten, Eppendorf, Brand, Gilson, variables Volumen, 10, 20, 100, 200 und 1000 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Reaktionsgefäße Falcon-Röhrchen, Polypropylen, 5 und 15 ml	Becton, Dickinson and Company, NJ, USA
Reaktionsgefäße Kryokonservierung Nunc, IVF 1,8 ml CryoTube	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Serologische Pipetten Polyesterol, 1, 2, 5, 10 und 25 ml	Becton, Dickinson and Company, NJ, USA; Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Spitzen für Pipetten, variables Volumen, 10,200 und 1000 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 17: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Agarose Standard	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Bovines Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Formaldehydlösung 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), 1x, ohne Ca/Mg, sterile	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Poly-HEMA (Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin-EDTA, 0,05 %, Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Weitere Chemikalien	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 18: Verwendete Programme.

Programme	Hersteller
Inkscape 0.91	Inkscape Project, Brooklyn, NY, USA
Origin	OriginLab, Northampton, MA, USA
R	R Core Team, Wien, Österreich
RStudio	RStudio, Boston, MA, USA
Varian Resolutions Pro	Agilent, Santa Clara, CA, USA
WITec Control 1.58	WITec Wissenschaftliche Instrumente und
WITec Project FOUR	Technologie GmbH, Ulm, Deutschland
ZEN 2012 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
CytoSpec 1.4.02	Peter Lasch, Berlin, Deutschland

7.2 Weitere Ergebnisse zur Klassifikation humaner Fibroblast-Zelllinien

Tabelle 19: Überblick ausgeprägter Raman-Banden der PLS-LD1 für die separate und gemeinsame Klassifikation der Altersgruppen.

	Zelllinien				gemeinsame Klassifikation
	BJ	separate Klassifikationen		WI-38	
		MRC-5	IMR-90		
PLS-LD1 Dominante Banden [cm ⁻¹]	752		780	704	
	816	894		818	818
		946	916		1058
	990	996	978	988	1122
		1056	1014	1044	1164
	1202	1252		1246	1246
			1304		1306
	1374	1376	1340	1374	1344
	1442	1436	1440	1456	1380
			1532		
	1574	1582		1574	1584
	1660	1654	1654	1662	1660
					1720
	2850	2850			
	2884	2880	2874	2874	2882
	2914	2920	2914	2920	2914
2998	2958	2970	2956	2946	
			3014	2970	

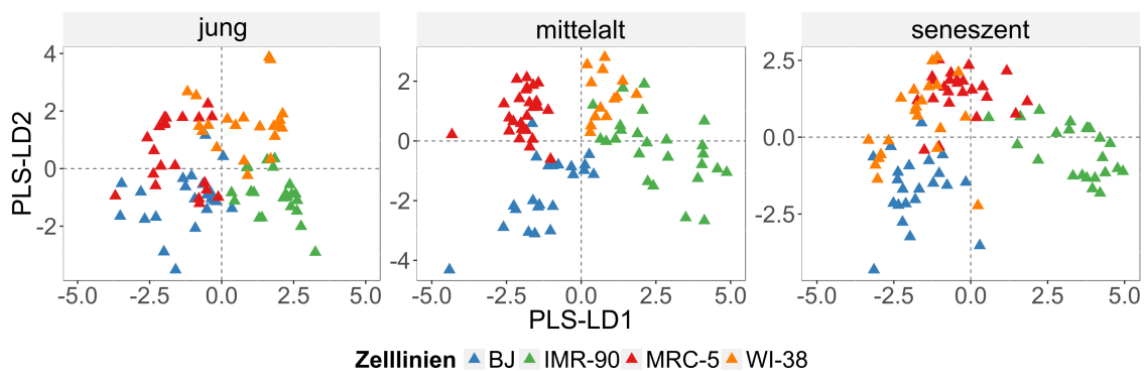


Abbildung 46: Raman-spektroskopische Klassifikation der Zelllinien innerhalb einzelner Altersgruppen. Im Streudiagramm über die PLS-LD1 gegen die PLS-LD2 klassifizierte und aufgetragene Zelllinien BJ (blau), IMR-90 (grün), MRC-5 (rot) und WI-38 (orange) innerhalb der einzelnen Altersgruppen jung, mittelalt und seneszent.

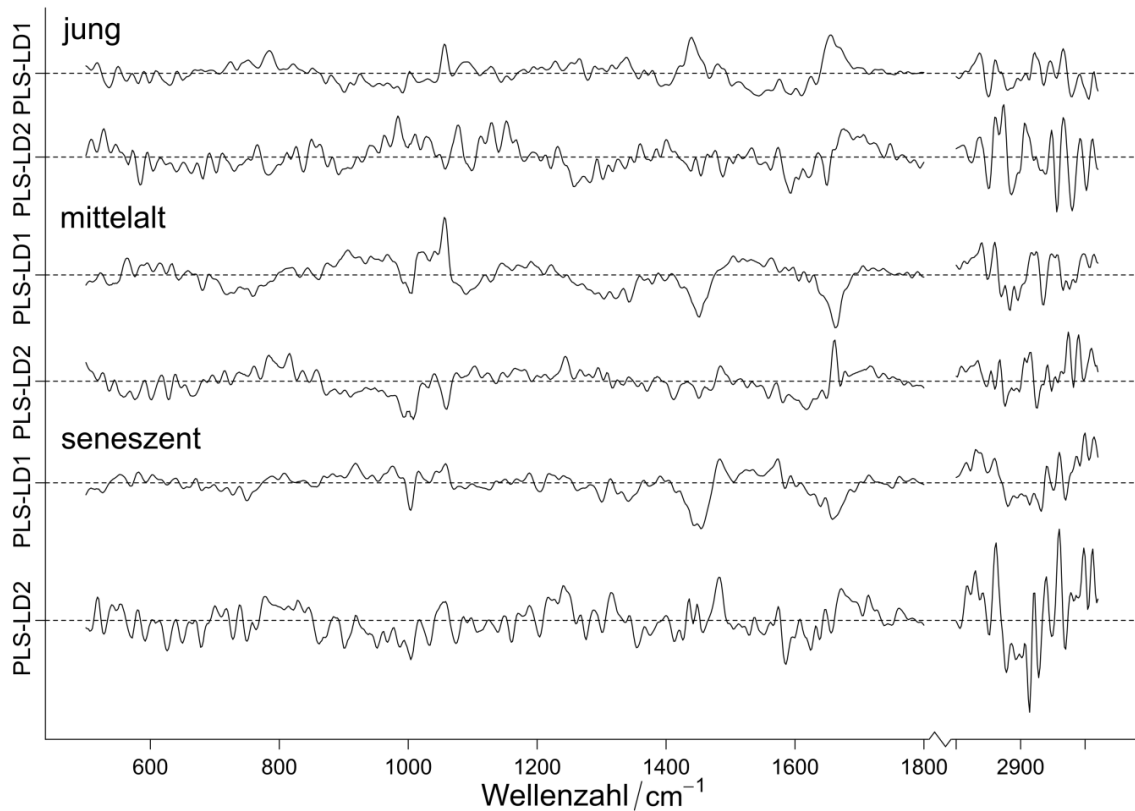


Abbildung 47: Raman-Koeffizienten nach Klassifikation der Zelllinien.

Aufgetragene Diskriminanzfunktionen PLS-LD1 und PLS-LD2 für die Klassifikation der Zelllinien BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38, separat klassifiziert für die drei Altersgruppen jung (oben), mittelalt (mittig) und seneszent (unten).

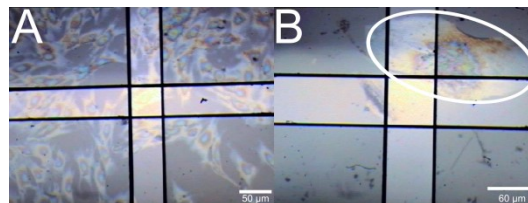


Abbildung 48: Mikroskop-Aufnahmen junger Fibroblastzellen und einer seneszenten Zelle. Beispielhaft für die seneszenten Veränderungen sind (A) junge proliferierende BJ-Zellen (PD 28) und (B) eine seneszente BJ-Zelle (PD 70, im weißen Oval) abgebildet. Die Öffnung der Blende (ca. $50 \times 50 \mu\text{m}$) ist als schwarze Linie innerhalb der mikroskopischen Aufnahmen (Reflektionsmodus) sichtbar.

Tabelle 20: Überblick ausgeprägter FT-IR-Banden der PLS-LD1 für die separate und gemeinsame Klassifikation der Altersgruppen.

	Zelllinien				gemeinsame Klassifikation
	BJ	separate Klassifikationen		WI-38	
		MRC-5	IMR-90		
PLS-LD1 Dominante Banden [cm ⁻¹]	988		964		960
	1040	1036	1016	1032	1032
		1096	1072	1104	1100
	1112		1152		1156
	1208	1200		1220	
	1248	1260	1236	1256	1252
				1424	1548
	1552	1576	1572		1588
		1628	1636	1644	1652
	1692			1676	1692
	1732	1732	1732	1740	1736
	2868	2848	2852	2852	2868
	2916	2888	2916	2920	2920
	2940	2972	2952	3008	2948

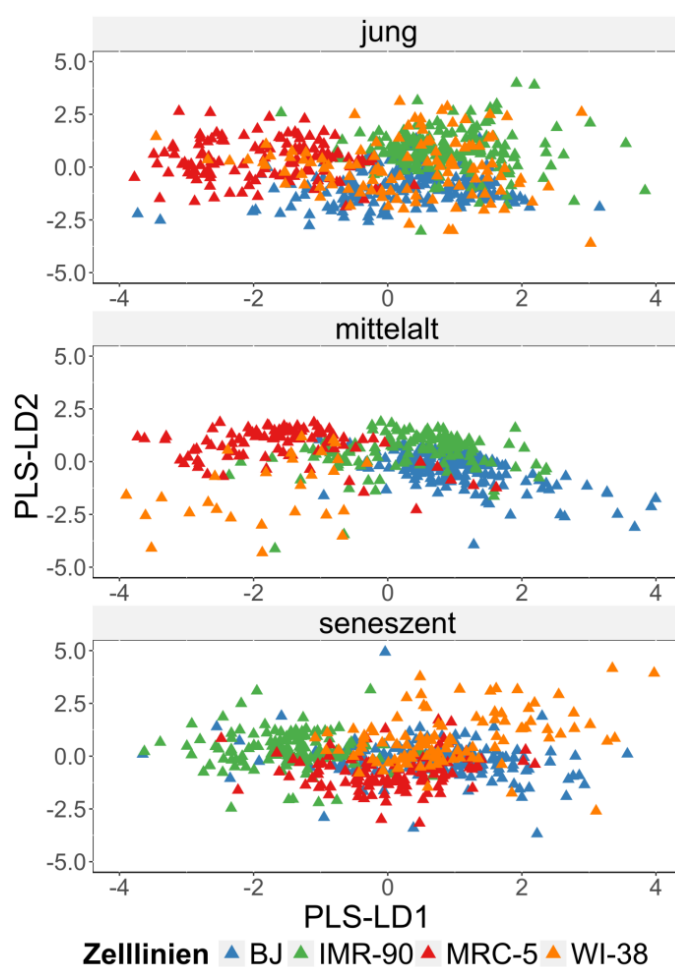


Abbildung 49: FT-IR-spektroskopische Klassifikation der Zelllinien innerhalb einzelner Altersgruppen. Im Streudiagramm über die PLS-LD1 gegen die PLS-LD2 klassifizierte und aufgetragene Zelllinien BJ (blau), IMR-90 (grün), MRC-5 (rot) und WI-38 (orange) für die einzelnen Altersgruppen jung, mittelalt und seneszent.

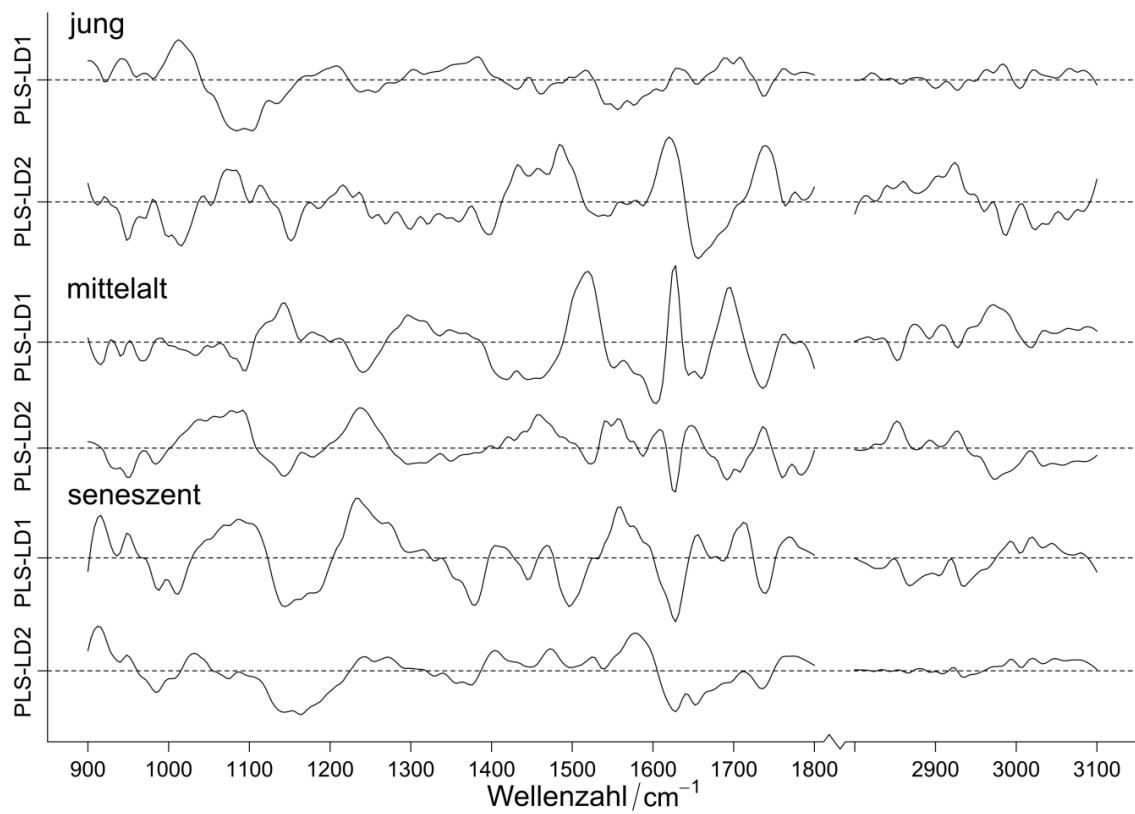


Abbildung 50: FT-IR-Koeffizienten nach Klassifikation der Zelllinien.

Aufgetragene Diskriminanzfunktionen PLS-LD1 und PLS-LD2 für die Klassifikation der Zelllinien BJ, MRC-5, IMR-90 und WI-38, separat klassifiziert für die drei Altersgruppen jung (oben), mittelalt (mittig) und seneszent (unten).

Tabelle 21: Zuordnung ausgewählter Raman- und FT-IR-Banden zur biomolekularen Klassifikation. Raman- (links) und FT-IR-Banden (rechts) 2D- und 3D-kultivierter Zellen, basierend auf^{152,153}.

Raman-Spektroskopie			FT-IR-Spektroskopie		
Wellenzahl [cm ⁻¹]	Banden-Zuordnung	Biomolekulare Klassifikation	Absorbanz [cm ⁻¹]	Banden-Zuordnung	Biomolekulare Klassifikation
2800 - 3020	$\nu(\text{CH}, \text{CH}_2 \text{ \& } \text{CH}_3)$ sym. & asym.	Lipide und Proteine	2800 - 3100	$\nu(\text{CH}_2 \text{ \& } \text{CH}_3)$ sym. & asym.	Lipide und Proteine
1620 - 1654	Amid I, $\nu(\text{C}=\text{C} \text{ \& } \text{C}=\text{O})$, α -Helix	Proteine, Lipide	1748	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Lipide
1572	Guanin, Adenin Ringatmung	Nukleinsäuren, DNA, RNA	1732	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Lipide
1440 - 1452	$\delta_s(\text{CH}_2 \text{ \& } \text{CH}_3)$	Lipide, Proteine	1668 - 1672	Amid I, Faltblatt & β -Struktur	Proteine
1200- 1340	Amid III, $\delta(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CN})$ & $\delta(\text{NH})$, Ringatmung	Proteine, Kollagen, Lipide, DNA, RNA	1600 - 1700	Amid I, β -Struktur	Proteine
1176	$\nu(\text{CH})$ Beugung; Cytosin, Guanin	Proteine; DNA, RNA	1500 -1600	Amid II, α -Helix, β -Struktur	Proteine
1060	$\nu(\text{PO}_2^-)$, $\nu(\text{C}-\text{C} \text{ \& } \text{C}-\text{O})$	DNA, RNA, Lipide	~1520	Tyrosin	Proteine
1004	Ringatmung	Phenylalanin	1448	$\nu(\text{CH}_3)$ asym. Beugung, $\delta(\text{CH}_3)$	Proteine, Kollagen
986	$\nu(\text{C}-\text{C})$, β -Struktur, $\nu(=\text{CH})$ Beugung	Proteine, Kollagen, Lipide	1396	$\nu(\text{C}=\text{O})$ sym., $\nu(\text{C}-\text{N})$	Lipide, Kollagen
928	$\nu(\text{C}-\text{C})$	Proteine, Kollagen	1244	Amid III, $\nu(\text{C}-\text{N})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\nu(\text{P}=\text{O})$ asym.	Kollagen, DNA, RNA
~880	Ringatmung, $\nu(\text{C}-\text{C})$	Nukleinsäuren, DNA, RNA, Tryptophan, Kollagen	1108 - 1112	$\nu(\text{C}-\text{C} \text{ \& } \text{C}-\text{O})$, Ringschwingung	Kohlenhydrate
~785 und ~795	Pyrimidin & Uracil Ringatmung	DNA, RNA	1032 und 1080	$\nu(\text{C}-\text{O})$	Nukleinsäuren
~725	Ringatmung	DNA, RNA	1024	Ringschwingung	Glykogen
			900 - 1200	$\nu(\text{P}=\text{O})$ sym., C-O-C & C-O Ringschwingung, C-O-P, P-O-P	Nukleinsäuren; Kohlenhydrate

ν - Streckschwingung; δ - Deformationsschwingung; δ_s - schneidend; γ_t - verdrehend; γ_w - wackelnd; sym. - symmetrisch; asym. - asymmetrisch.

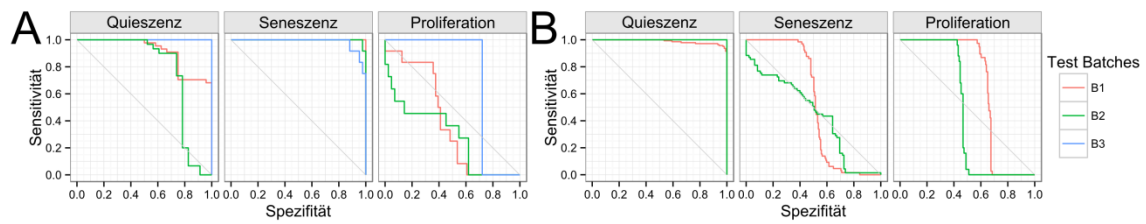


Abbildung 51: ROC-Kurven anhand der für die Zellzustände getesteten Batches.

Sensitivität und Spezifität beziehen sich auf die Vorhersage der verwendeten Spektren für die PLS-LDA, anhand von drei Batches der Raman-Daten (A) bzw. zwei Batches der FT-IR-Daten (B). Ermittelt anhand einer *leave-one-Batch-out*-Kreuzvalidierung für die drei Zellzustände Quieszenz, Seneszenz und Proliferation. Kurven verdeutlichen die Vorhersagequalität der PLS-LDA. Die graue Diagonale verdeutlicht zufällige Modellvorhersagen.

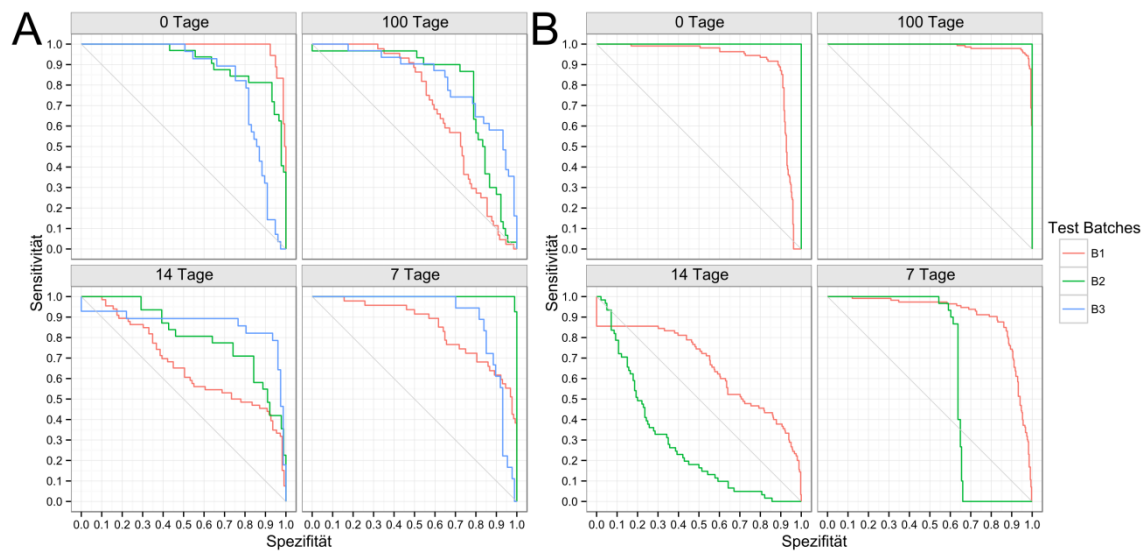


Abbildung 52: ROC-Kurven anhand der getesteten Batches zur quieszenten Kultivierungsdauer.

Sensitivität und Spezifität beziehen sich auf die Vorhersage der verwendeten Spektren für die PLS-LDA, anhand von drei Batches der Raman-Daten (A) bzw. zwei Batches der FT-IR-Daten (B). Ermittelt anhand einer *leave-one-Batch-out*-Kreuzvalidierung für die vier untersuchten Zeitpunkte (0, 7, 14 und 100 Tage) während der Kultivierung quieszenter kontakthinhibierter Zellen. Kurven verdeutlichen die Vorhersagequalität der PLS-LDA. Die graue Diagonale verdeutlicht zufällige Modellvorhersagen.

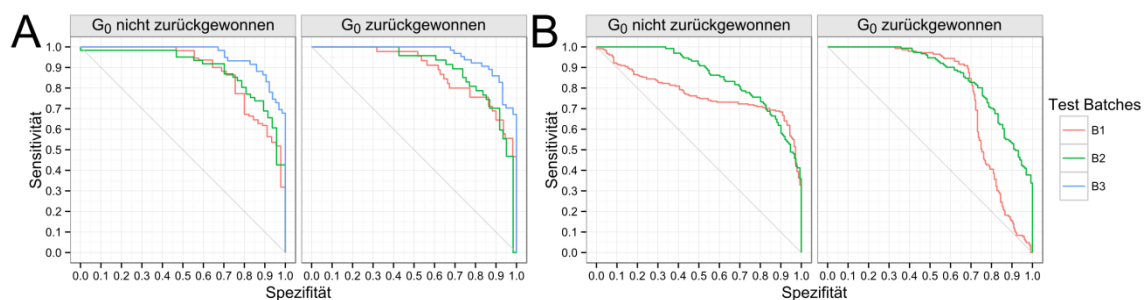


Abbildung 53: ROC-Kurven auf Basis der aus der Quieszenz zurückgewonnenen proliferierenden Zell-Batches.

Sensitivität und Spezifität beziehen sich auf die Vorhersage der verwendeten Spektren für die PLS-LDA, anhand von drei Batches der Raman-Daten (A) bzw. zwei Batches der FT-IR-Daten (B). Ermittelt anhand einer *leave-one-Batch-out*-Kreuzvalidierung der „zurückgewonnenen“ (Beginn erneuter Proliferation) und „nicht zurückgewonnenen“ kontakthinhibierter quieszenten Zellen. Kurven verdeutlichen die Vorhersagequalität der PLS-LDA. Die graue Diagonale verdeutlicht zufällige Modellvorhersagen.

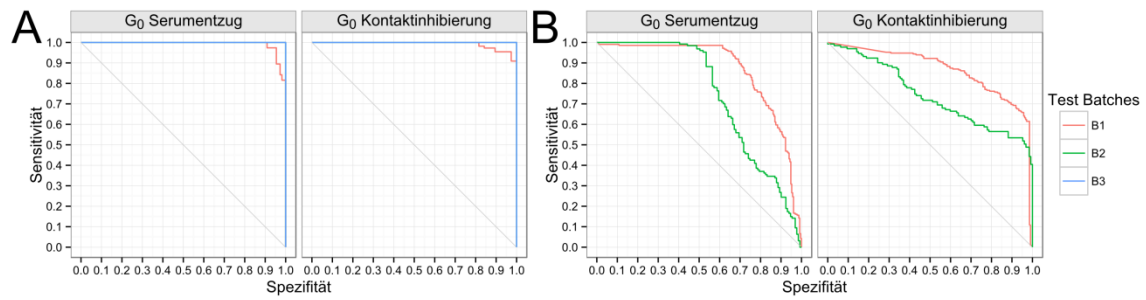


Abbildung 54: ROC-Kurven basierend auf den getesteten Batches zur quieszenten Induktion. Sensitivität und Spezifität beziehen sich auf die Vorhersage der verwendeten Spektren für die PLS-LDA, anhand von drei Batches der Raman-Daten (A) bzw. zwei Batches der FT-IR-Daten (B). Ermittelt anhand einer *leave-one-Batch-out*-Kreuzvalidierung zur Art der quieszenten Induktion: Serumentzug oder Kontaktinhibierung. Kurven verdeutlichen die Vorhersagequalität der PLS-LDA. Die graue Diagonale verdeutlicht zufällige Modellvorhersagen.

7.3 Wissenschaftliche Beiträge

Veröffentlichungen

- 2017 Quiescence by starvation and confluency induced in human fibroblast cells in comparison to cellular senescence and proliferation by Raman and infrared spectroscopy
K. Eberhardt, C. Matthäus, S. Marthandan, S. Diekmann, J. Popp; in Planung
- 2017 Raman and infrared spectroscopy differentiate senescent from proliferating cells in a human dermal fibroblast 3D skin model
K. Eberhardt, C. Matthäus, D. Winter, C. Wiegand, U.-C. Hipler, S. Diekmann, J. Popp; Analyst, online veröffentlicht
DOI: 10.1039/C7AN00592J
- 2017 Raman and infrared spectroscopy distinguishing replicative senescent from proliferating primary human fibroblast cells by detecting spectral differences mainly due to biomolecular alterations
K. Eberhardt, C. Beleites, S. Marthandan, C. Matthäus, S. Diekmann, J. Popp; Analytical Chemistry, 89, 2937–2947
DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04264
- 2015 Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update
K. Eberhardt*, C. Stiebing*, C. Matthäus, M. Schmitt, J. Popp; Expert Review of Molecular Diagnostics, 15, 773–787
DOI: 10.1586/14737159.2015.1036744
*geteilte Erstautorenschaft

Vorträge

- 03/2016 Investigation of Senescence by Raman and infrared spectroscopy with various human fibroblast cells and the comparison of 2D vs. 3D cultivation models
Leibniz-Institut für Alternsforschung – Fritz-Lipmann-Institut, Doktorandenseminar, Jena, Deutschland
- 01/2015 Senescent Progress in Human Fibroblast Cells Investigated by Raman and Infrared Spectroscopy
Leibniz-Institut für Photonische Technologien, Doktorandenseminar, Dornburg, Deutschland

- 12/2014 Investigation of Senescence in Human Fibroblast Cells by Raman and Infrared Spectroscopy
Leibniz-Institut für Alternsforschung – Fritz-Lipmann-Institut,
Doktorandenseminar, Jena, Deutschland
- 05/2014 Der Alterung auf der Spur - Spektroskopische Untersuchungen zur zellulären Seneszenz
Carl Zeiss AG - Tag der offenen Tür, Jena, Deutschland

Konferenzbeiträge

- 07/2015 Following senescence progression in human primary fibroblast cell lines by Raman spectroscopy (Poster)
9th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), Wien, Österreich
Förderung durch die Konferenzorganisation
- 04/2015 Raman spectroscopical investigations of senescence in human primary fibroblast cells (Poster)
7th Symposium on Cancer Research, Dornburg, Deutschland
- 08/2014 Live cell imaging of cellular senescence progression in human fibroblast cells by Raman spectroscopy (Poster)
8th SPEC Shedding New Light on Disease, Krakau, Polen
- 08/2014 Investigation of cellular senescence in human primary fibroblast cells using Raman micro-spectroscopy (Poster)
24th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS), Jena, Deutschland
- 04/2014 Investigation of senescent progress in human fibroblast cells using Raman micro-spectroscopy (Poster)
6th Symposium on Cancer Research, Dornburg, Deutschland
- 10/2013 Monitoring senescence in a human primary fibroblast cell line using Raman micro-spectroscopy (Poster)
9th FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, Berlin, Deutschland

Selbstständigkeitserklärung

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

Ort, Datum

Katharina Eberhardt

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich während meiner Promotionszeit und der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt *Prof. Dr. Jürgen Popp* für die Möglichkeit, diese Arbeit am Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. in der Forschungsabteilung Spektroskopie und Bildgebung durchzuführen. Seine konstruktiven Anmerkungen innerhalb der Seminare, zu den jeweiligen Konferenzbeiträgen und den Manuskripten waren außerordentlich hilfreich. Vielen Dank für die Möglichkeiten meine Ergebnisse auf internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Prof. Dr. Stephan Diekmann danke ich für die Realisierung dieses umfangreichen Projekts in der (ehemaligen) Forschungsgruppe Molekularbiologie am Leibniz-Institut für Alternsforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI). Seine Bereitschaft, in regelmäßigen Treffen die Ergebnisse zu besprechen, Verbindungen zwischen verschiedenen Zellzuständen zu erläutern, Konferenzbeiträge sowie Manuskripte regelmäßig und v. a. mehrfach gegenzulesen, waren außerordentlich förderlich für deren Qualität.

Dr. Christian Matthäus danke ich für seine geduldige Einführung in die Handhabung des Raman-Mikroskops, seine Unterstützung innerhalb der verschiedenen Teilabschnitte während der Promotion und die unermüdlichen Bestätigungen und spektralen Erläuterungen.

Dr. Christoph Krafft danke ich für die Möglichkeit, Infrarot-spektroskopische Untersuchungen durchzuführen und in den wöchentlichen Gruppenseminaren gewonnene Ergebnisse konstruktiv zu besprechen. *Prof. Dr. Michael Schmitt* danke ich für die Antworten rund um Fragen zur Carl-Zeiss-Stiftung, beim Prozess des Einreichens von Manuskripten und zur Organisation allgemein.

Vielen Dank an das Team der Arbeitsgruppe der optischen Zelldiagnostik bzw. der jetzigen Raman- und Infrarot-Histopathologie für die familiäre Atmosphäre, die R-Hilfen und die schöne Zeit. Ich habe mich jeden Tag gefreut, auf Arbeit zu kommen, da ich wusste, dass ihr da wart. Unsere gemeinsamen Teilnahmen an Konferenzen waren wie Urlaub. Danke *Clara* (deiner Büro-Schwester), *Tatiana*, *Kokila*, *Elli*, *Jan*, *Iwan*, *Roman*, *Mohamed*, *Saif*, *Florian* und unseren Ehemaligen *Claudia*, *Michael*, *Marcel*, *Sebastian* und *Norbert*. Ganz lieben Dank an die Bibliothekarin *Benita Göbel*.

Dr. Shiva Marthandan, vielen Dank für die Erläuterungen, Hilfestellungen in der Zellkultur und Manuskript-Nachforschungen. Der durch *Dr. Peter Hemmerich* und seinem Team am FLI geleiteten Serviceeinrichtung Imaging danke ich für die Hilfen an den Fluoreszenz-Mikroskopen.

Ich bedanke mich für die gute Zusammenarbeit und die Zellkultivierung beim Team des Routine- und *In-vitro*-Forschungslabors der Klinik für Hautkrankheiten am Universitätsklinikum Jena. Mein besonderer Dank richtet sich an *Dr. Uta-Christiane Hipler*, *Dr. Cornelia Wiegand* und *Doreen Winter*.

Meiner Familie danke ich für die langjährige Unterstützung in dieser Zeit. Danke für euer Verständnis und euren Zuspruch.