

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Etablierung und Anwendung multiparametrischer
Raman „Spectromics“ zur hochdimensionalen
Charakterisierung kardialer Pathologien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sigle, Manuel Tobias**

2024

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Weiß

3. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Rassaf

Tag der Disputation: 09.02.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Klinischer Kontext.....	6
1.2 Pathophysiologische und molekulare Mechanismen des kardialen Remodelings.....	7
1.3 Hochdimensionale Gewebecharakterisierung im Kontext kardialer Pathologien.....	9
1.3.1 Rationale und Ziel hochdimensionaler Analysen	10
1.3.2 Limitationen derzeitiger „Omics“-Analysen	11
1.4 Raman Mikrospektroskopie	13
1.4.1 Funktionsweise	13
1.4.2 Datenoutput, -analyse und -interpretation.....	15
1.4.3 Raman-Spektroskopie in der kardiovaskulären Grundlagenforschung	18
1.4.4 Begriffsdefinitionen im Bereich der Raman „Spectromics“	18
1.5 Fragestellung.....	19
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Versuchstiere.....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Reagenzien, Lösungen, Chemikalien, Proteine und Antikörper.....	23
2.1.4 Geräte.....	25
2.1.5 Software	26
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 <i>In-vivo</i> -Methoden	28
2.2.2 Analyse histologischer Proben	31
2.2.3 Bilderfassung.....	34
2.2.4 Statistische Auswertung	35

2.2.5	Bioinformatische Tools und Methoden zur hochdimensionalen Auswertung von Raman-Daten.....	41
3	Ergebnisse	48
3.1	Induktion reproduzierbarer kardialer Pathologien im Mausversuch	48
3.1.1	Validierung der kardialen Pathologien <i>in vivo</i>	49
3.1.2	Validierung der kardialen Pathologien <i>ex vivo</i>	50
3.2	Translation bioinformatischer Analysetools auf Raman-Spektroskopie	53
3.2.1	Analyse-Workflow	53
3.2.2	Cluster Analyse von Raman-Daten ohne Integration räumlicher Zusammenhänge („spatially-unaware“)	54
3.2.3	Integration räumlicher Information in Raman „Spectromics“ („spatially-aware“).....	62
3.2.4	Entschlüsselung der Intra- und Intercluster-Heterogenität durch Translation von „Pseudotime-Trajectories“	67
3.3	Molekulare Dynamiken bei räumlicher Annäherung an kardiale Fibrose ...	69
3.4	Hochdimensionale Charakterisierung metabolischer Alterationen im Myokardinfarkt mittels räumlicher Trajektorien und multimodalen Raman-MALDI-Multi-Omics.....	72
3.5	Hochdimensionale Definierung der zellulären Immunlandschaft im akuten Myokardinfarkt	77
3.5.1	Multiparametrische Detektion von Inflammationszellen durch Kombination von Raman-Spektroskopie und Multifarben-Immunfluoreszenzfärbung	77
4	Diskussion	82
4.1	Vorteile und Möglichkeiten der Raman „Spectromics“	83
4.1.1	Allgemeine Vorteile der Methode Raman-Spektroskopie	83
4.1.2	Vorteile der hochdimensionalen Raman „Spectromics“	84
4.1.3	Raman „Spectromics“ im Vergleich zu gegenwärtigen Auswertemethoden der Raman-Spektroskopie	85
4.2	Limitationen und Fehlerquellen.....	86
4.2.1	Technische Limitationen der Raman-Spektroskopie	86
4.2.2	Methodische Limitationen der Raman „Spectromics“	87

4.3 Schlussfolgerung	88
4.4 Ausblick	89
5 Zusammenfassung	91
Literaturverzeichnis	93
6 Veröffentlichungen	98
Abkürzungsverzeichnis	99
Erklärung zum Eigenanteil	100
Danksagung.....	101

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überblick über zelluläre Vorgänge des kardialen Remodelings	8
Abb. 2: Physikalisches Prinzip der Raman-Spektroskopie	14
Abb. 3: Raman-Spektren und deren Interpretation	16
Abb. 4: Histologische Quantifizierung mittels „Color Deconvolution“	33
Abb. 5: Effekt der Dimensionsreduktion auf hochdimensionale, spektrale Daten	38
Abb. 6: Echokardiografische Validierung des Myokardinfarkt-Tiermodells	49
Abb. 7: Echokardiografische Validierung des Hypertrophie-/Remodeling- Tiermodells	50
Abb. 8: Histologische Validierung des Myokardinfarkt-Tiermodells	51
Abb. 9: Histologische Validierung des Hypertrophie-/Remodeling- Tiermodells	52
Abb. 10: Gesamter Workflow der Raman „Spectromics“	54
Abb. 11: Explorative Analyse der Beschaffenheit multidimensionaler Raman-Daten	55
Abb. 12: Multidimensionale Analysen der Raman-Spektren einer Myokardprobe mit subendokardialen Fibrose mithilfe genomischer Tools	56
Abb. 13: Cluster-Charakteristiken der Raman „Spectromics“	58
Abb. 14: Intensitätsprojektionen zur räumlichen Entschlüsselung von entdeckten Clustern	60
Abb. 15: Transition von unsupervidiertem zu supervidiertem Clustering	60
Abb. 16: „Spatially-aware“ Clustering von Raman Spektraldaten	63
Abb. 17: Identifizierung zugrundeliegender biomolekularer Unterschiede zwischen gesundem und sich umbauendem („remodeling“) Myokard ..	64
Abb. 18: Validierung anhand weiterer Schnitte im Tiermodell der kardialen Hypertrophie und Remodeling	66
Abb. 19: Validierung anhand weiterer Schnitte im Tiermodell des Myokardinfarkts	66
Abb. 20: Translation von „Pseudotime Trajectories“ zur Entschlüsselung der myokardialen Heterogenität des sich umbauenden Myokards	68

Abb. 21: „DDRTree“-basierte Pseudotime-Projektion unterstreicht Heterogenität im sich umbauenden Myokard und Homogenität im gesunden Herzmuskel.....	69
Abb. 22: Molekulare Dynamiken bei räumlicher Annäherung an subendokardiale Fibrose	71
Abb. 23: Metabolische Dynamiken bei räumlicher Annäherung an die Infarktzone.....	73
Abb. 24: Hochdimensionale Charakterisierung metabolischer Alterationen im Myokardinfarkt mittels räumlich aufgelösten, multimodalen Raman-MALDI-Multi-Omics.....	74
Abb. 25: Spektrale und massenspektrometrische Unterschiede der gesunden und Infarktregion	76
Abb. 26: „Multi-Omics“-Strategie zur hochdimensionalen, spektroskopischen Definierung der zellulären Landschaft im akuten Myokardinfarkt.....	78
Abb. 27: Cluster-Analyse der zellspezifischen Raman-Spektren.....	79
Abb. 28: Mittelwertsspektren der identifizierten Zelltypen.....	81

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakteristische Raman Peaks und ihre Interpretation.....	17
Tab. 2: Direkte Gegenüberstellung der analysierten Daten bei Einzelzell-Untersuchungen und Raman „Spectromics“	42

1 Einleitung

Auszüge dieser Arbeit wurden international publiziert (Sigle et al., 2023)¹.

1.1 Klinischer Kontext

Die Fähigkeit eines Gewebes, sich an verändernde Bedingungen zu adaptieren und damit seine Funktion zu erhalten oder zu verbessern, ist gleich faszinierender wie komplexer Natur. Das menschliche Herz nimmt dabei eine Sonderrolle ein: Schon kurz nach der Geburt steht der Großteil des kardialen, dauerhaften Zellrepertoires fest, das uns bis zu unserem Tod ein Leben lang unablässig begleiten und lebendig halten wird^{2,3} – denn das Herz weist so gut wie keine teilungsfähigen, regenerativen Stammzellen auf⁴. Umso bemerkenswerter ist es, dass sich das Herz dennoch Veränderungen des Stoffwechsels, Blutvolumens, Blutdrucks und Leistungsanspruchs über die gesamte Lebensspanne, ohne unser äußeres Zutun, anzupassen vermag.

Ein solch ausgeklügeltes Organ bedarf einer hochkomplexen Interaktion zwischen den Zellen des Herzens, und es wird davon ausgegangen, dass im Laufe der Evolution diese Leistungsfähigkeit des Herzens dadurch erkaufte wurde, dass seine Regenerationsfähigkeit weitestgehend verloren ging⁴.

Wird nun das Herz akut oder chronisch geschädigt, so geht funktionelles Gewebe zugrunde, wird durch eine fibrotische Narbe ersetzt und das komplexe Zusammenspiel des elektrischen, mechanischen und funktionellen Synzytiums gerät aus dem Gleichgewicht. Das Herz ist nicht mehr in der Lage, die den metabolischen Erfordernissen der Organe entsprechende Menge an Blut auszuwerfen – es entsteht eine Herzinsuffizienz⁵. Charakteristische Symptome sind Dyspnoe, Leistungsminderung und Flüssigkeitsretention. Patientinnen und Patienten, die mit einer erstmaligen Episode von Herzinsuffizienz ins Krankenhaus eingeliefert werden, haben eine ebenso schlechte Prognose wie Patienten mit einem der häufigen Malignomen⁶. So bleibt die Herzinsuffizienz trotz großer Fortschritte in Verständnis und Behandlung eine Haupttodesursache weltweit.

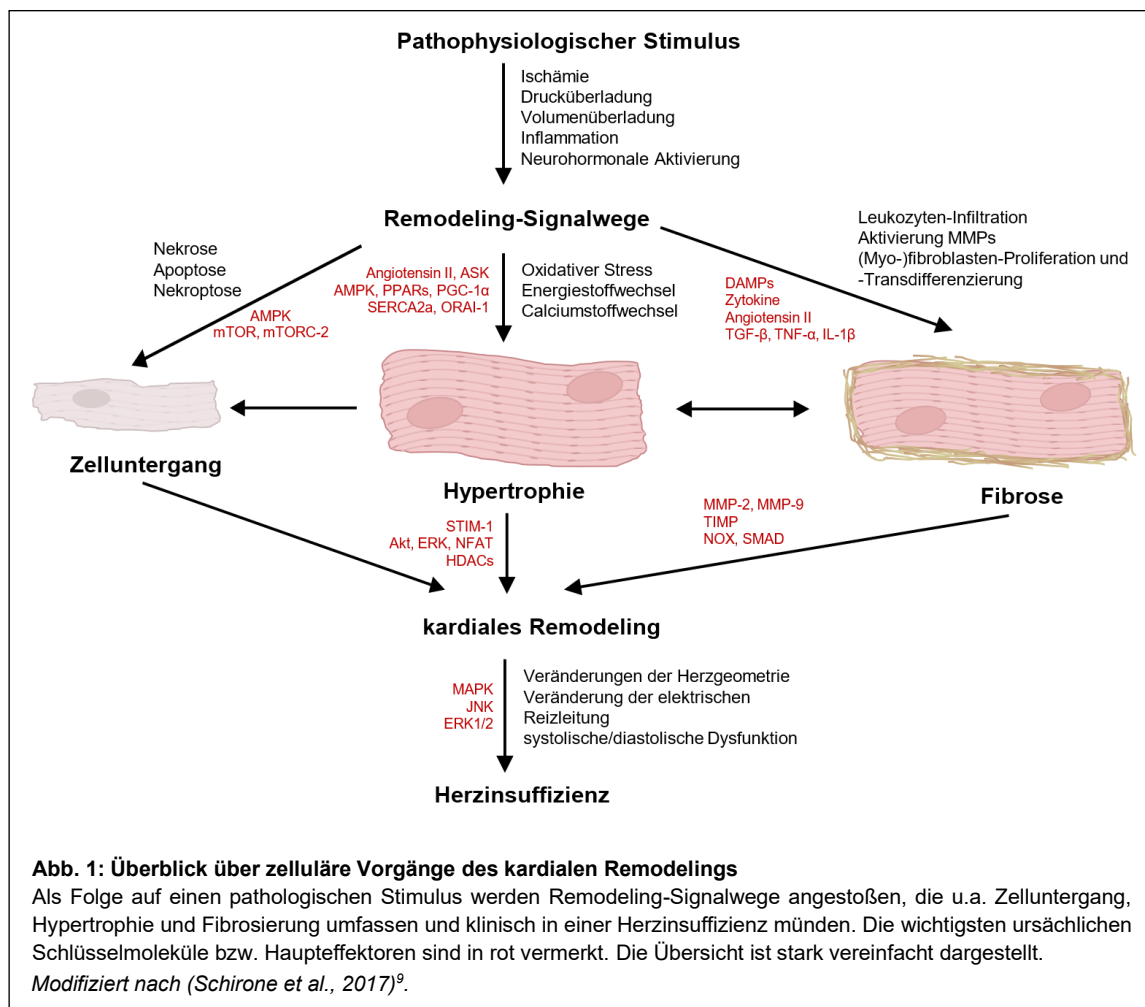
Abhängig von der zeitlichen Entwicklung kann eine chronische Herzinsuffizienz, die über einen längeren Zeitraum entsteht, von der akuten Herzinsuffizienz, die z.B. nach einem schweren Herzinfarkt auftritt, abgegrenzt werden. In den meisten Fällen ist sie auf eine myokardiale Dysfunktion bei koronarer Herzkrankheit zurückzuführen. Aber auch Erkrankungen der Herzklappen, des Perikards und des Endokards sowie Herzrhythmus- und Reizleitungsstörungen können eine Herzinsuffizienz verursachen oder zu ihr beitragen⁷. Um diese Dysfunktion zu kompensieren, versucht das Herz durch vegetative Veränderungen (z.B. Tachykardie) und myokardiale Adaptationen (z.B. Herzmuskelhypertrophie), seine Dysfunktion zu kompensieren⁸.

Die Fähigkeit des Herzens, sich an Stress und Zelluntergang zu adaptieren, entscheidet darüber, ob das Herz dekomensieren, oder seine Funktion erhalten wird. Ein tiefgreifendes Verständnis dieser Mechanismen kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Interventionsstrategien beitragen. Dabei sind die molekularen Mechanismen myokardialer Adaptation und Maladaptation nach Organischämie (akute Herzinsuffizienz) oder chronischer Drucküberlastung (chronische Herzinsuffizienz) nach wie vor wenig verstanden und erforscht. Umso größer ist das wissenschaftliche Bestreben, diese Forschungslücke mit möglichst umfassenden, detaillierten Methoden und Analysen zu schließen. Eine dieser Methoden kann dabei die in dieser Arbeit vorgestellte neuartige Herangehensweise zur umfassenden Gewebecharakterisierung kardialer Pathologien mittels Raman „Spectromics“ darstellen.

1.2 Pathophysiologische und molekulare Mechanismen des kardialen Remodelings

Das umfassende Verständnis der molekularen Basis des kardialen Remodelings (englisch für Umbau, Neugestaltung) stellt eine der größten Herausforderungen in der kardiovaskulären Medizin dar⁹⁻¹¹. Die Schwierigkeit liegt darin begründet, dass multiple Faktoren zur Entwicklung und Progression des Remodelings beitragen, welche überlappende Effekte auf sowohl kardiale Struktur, Funktion, Genomik, Proteomik und Metabolik haben. Auf pathophysiologischer Ebene

bildet sich als Folge einer allgemein gesprochenen „Herzschädigung“ in der Akutphase zunächst ein inflammatorisches Mikromilieu, das durch Freisetzung von DAMPs („danger-associated molecular patterns“, Alarmine) und Zytokinen sowie konsekutiver Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet ist^{12,13}. Als Folge wird durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und durch Fibroblasten-Proliferation der Gewebeumbau eingeleitet. Darüber hinaus lösen oxidativer Stress und Veränderungen des Energiemetabolismus hypertrophe und profibrotische Signalkaskaden aus¹⁴. Und schließlich wirken sich Inflammation, oxidativer Stress, Metabolikveränderungen und Zelluntergang auch negativ auf die kardiale Kontraktilität und Relaxation aus – eine Herzinsuffizienz entsteht⁹. Die verschiedenen Signalwege bzw. deren Schlüsselmoleküle, die beim einhergehenden strukturellen, metabolischen und funktionellen Umbau des Herzens beteiligt sind, zeigen ein hochkomplexes Bild des kardialen Remodelings (Abb. 1).



Die unterschiedlichen Veränderungen auf hochdimensionaler und gleichzeitig hochauflösender Ebene simultan zu erfassen, stellt eine vielschichtige materielle, und bioinformatische Herausforderung dar. Dennoch lassen sich signifikante Fortschritte in der gegenwärtigen Zeit erkennen¹⁵⁻¹⁷.

1.3 Hochdimensionale Gewebecharakterisierung im Kontext kardialer Pathologien

Um das hochkomplexe Zusammenspiel des kardialen Synzytiums besser verstehen zu können, wurden in den letzten Jahren vermehrt Methoden der Systembiologie in der kardiovaskulären Grundlagenforschung angewandt, darunter die Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik.

Das Suffix „-omik“ bzw. im Englischen „Omics“ impliziert eine möglichst umfassende, globale und ganzheitliche Bewertung eines bestimmten Pools von Biomolekülen in einer Probe¹⁸, wie beispielsweise RNA bei der Transkriptomik. Während bei der Transkriptomik die Gesamtheit aller RNA-Transkripte in einem Gewebe untersucht wird, ist es bei der Proteomik entsprechend das Proteom und der Metabolomik die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte¹⁸.

„Omics“-Technologien ermöglichen eine holistische Sicht auf die molekularen Charakteristika und Abläufe einer Zelle, eines Gewebes oder eines kompletten Organismus¹⁹ und können daher den Schlüssel zur Identifizierung hochkomplexer Interaktionen zwischen Genen, Proteinen und Stoffwechselprodukten in Physiologie und Pathologie darstellen.

Auch in die kardiovaskuläre Grundlagenforschung haben „Omics“-Technologien Einzug gefunden: 2020 wurde von Litviňuková et al.¹⁷ eine Studie präsentiert, bei der aus sechs definierten anatomischen Regionen des Herzens die Gesamtheit an Zellen und deren Genom mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) bzw. Einzelkern-RNA-Sequenzierung (single-nucleus RNA sequencing, snRNA-seq) untersucht wurden. Diese Studie präsentiert einen der ersten Versuche, die zelluläre Landschaft des adulten, humanen Herzens in solch einzigartigem Umfang mittels Transkriptomik

darzustellen. Doch trotz des Umfangs der transkriptomischen Analyse beruhen die Ergebnisse und deren Interpretation rein auf genetischen Informationen, die nicht immer die tatsächliche Proteinaktivität widerspiegeln.

Mit der HOMAGE Study wurde 2019 eine klinische Studie präsentiert, bei der mittels proteomischer Analysen mechanistische Signalwege und mögliche Biomarker analysiert und identifiziert wurden, die mit einer Progression in die Herzinsuffizienz assoziiert sind²⁰. Gefunden wurden dabei vier Hauptcluster: (1) Inflammation und Apoptose (Schlüsselproteine der TNF- α -Familie); (2) Remodeling (Umbau) der Extrazellulärmatrix, Angiogenese und Wachstum (Schlüsselproteine aus Kollagenmetabolismus, Endothelfunktion und vaskulärer Homöostase); (3) Blutdruckregulation (Schlüsselproteine wie natriuretische Peptide und Proteine des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System); (4) Cholesterin-Metabolismus²⁰.

Um die Vorzüge der genomischen und proteomischen Analyse zu bündeln, wurden außerdem Studien konzipiert, die die Analyse von Transkriptom und Proteom kombinieren. Eine solche „Multi-Omics“ Analyse wurde beispielsweise 2018 von Lau et al. publiziert, bei der Proteom-Dynamiken integriert mit Transkriptomik-Daten während kardialen Remodeling untersucht wurden²¹. Durch diese Kombinationsmethode konnten mehr Krankheitsgene sowie posttranslationale Regulationen über verschiedene Stoffwechselwege detektiert werden. 2022 präsentierten Kuppe et al.¹⁵ eine räumlich aufgelöste Multi-Omics-Karte des humanen Myokardinfarkts, die die molekularen Prinzipien myokardialer Gewebsorganisation im Infarkt Herzen beleuchtet. Doch trotz des Umfangs der transkriptomischen Analyse beruhen die Ergebnisse und deren Interpretation auf genetischen Informationen, die nicht immer die tatsächliche Proteinaktivität widerspiegeln.

1.3.1 Rationale und Ziel hochdimensionaler Analysen

Hochdimensionale „Omics“-Analysen haben die Grundlagenforschung der Biowissenschaften revolutioniert und nie dagewesene Einblicke in die

biologischen Prozesse ermöglicht, die beim Umbau von Geweben involviert sind²². Die „Omics“-Revolution hat dabei auch eine analytische Trendwende eingeleitet – weg von Hypothesentests einzelner Kandidatengenen, Transkripte oder Proteinen und hin zur Hypothesengenerierung durch simultane Auswertung aller Mitglieder einer bestimmten molekularen Spezies (Transkriptom, Proteom, Metabolom etc.)²³. Die Rationale für den Trend hin zu multiparametrischen, hochdimensionalen Hochdurchsatzverfahren ist folglich, eine möglichst umfassende Erfassung des gesamten Datenrepertoires zu erreichen. Ermöglicht wurden solche Analysen erst durch technische Errungenschaften in der Probenanalyse (z.B. NanoString® Technologie, 10X Genomics Visium Technologie²⁴), aber überwiegend auch durch bioinformatische Fortschritte in der Datenanalyse. Die Bedeutsamkeit und Beliebtheit der „Omics“-Analysen in der Wissenschaftswelt kann anhand der Explosion an Publikationen in diesem Feld seit den 2000ern abgeleitet werden^{25,26}.

Ein weiterer Vorzug von „Omics“-Analysen ist die Möglichkeit zur integrativen Analyse durch Verknüpfung mit weiteren Analyseformen, seien es andere „Omics“-Plattformen („Multi-Omics“¹⁸) oder klassische Analysen derselben Probe. Zur Auswertung von „Omics“- und „Multi-Omics“-Datensätzen wurden in den letzten Jahren bioinformatische Methoden der künstlichen Intelligenz entwickelt und eingesetzt. Insbesondere Ansätze des „Machine Learnings“ (englisch für maschinelles Lernen) und „Deep Learnings“ (englisch für mehrschichtiges Lernen) haben sich im Umgang mit den riesigen Datensätze der „Multi-Omics“ bewähren können und wurden u.a. zur Identifizierung versteckter histologischer Muster, Biomarker und prädiktiven Medizin eingesetzt²⁷⁻²⁹.

1.3.2 Limitationen derzeitiger „Omics“-Analysen

Trotz zunehmender Beliebtheit und zunehmender Verbreitung in den Lebenswissenschaften weisen die derzeitigen hochdimensionalen Analysen auch ihre Limitationen auf.

Eine technische Herausforderung liegt in den umfangreichen Datenmengen begründet, die durch „Omics“-Analysen generiert werden. Zum einen sind

deshalb Auswerteprogramme vonnöten, die die gesamte Breite des Datensets erfassen können, zum anderen sind Computer notwendig, die ausreichend Rechen- und Speicherkapazität für die Bewerkstelligung der komplexen Berechnungen haben. Hinzu kommen die analytischen Hürden, einen so umfassenden Datensatz korrekt zu handhaben und zu interpretieren. Die Schwierigkeit liegt in der Tatsache begründet, dass bei hochdimensionalen Analysen die Zusammenhänge häufig weder direkt noch linear sind und damit in der Regel das menschliche Vorstellungsvermögen übersteigen³⁰.

Als Folge der massiven Erhöhung der untersuchten Parameter und damit einhergehenden Datenflut, wurde im Gegenzug die Anzahl biologischer Replikate reduziert, was ebenfalls ein verbreiteter Kritikpunkt an „Omics“-Analysen ist³¹. Dazu kommt, dass bei hochdimensionalen Analysen „signifikante“ Ergebnisse oft allein schon aus der Unmenge an gemessenen Parametern entstehen, sodass eine Korrektur für multiples Testen zwingend erforderlich ist³⁰.

In den letzten Jahren wurde die „Omics“-Revolution damit befeuert, dass nun die hochdimensionalen Datensätze auch räumlich verankert werden können²⁴. Dieser Dimensionsgewinn durch die zusätzliche räumliche Auflösung führte zur Begriffsbildung der „spatially-resolved“ Omics, kurz „Spatial“ „Omics“ bzw. Spatial Transcriptomics, Spatial Proteomics und Spatial Metabolomics. Die derzeit am weitesten verbreitete, räumlich aufgelöste „Omics“-Technik ist die der „Spatial Transcriptomics“, die 2020 von *Nature Methods* zur „Methode des Jahres“ gekrönt wurde²⁴. Spatial Transcriptomics setzt Einzelzell-RNA-Daten in räumlichen Kontext und bietet damit ein leistungsfähiges Instrument für ein grundlegendes Verständnis von Krankheitsmechanismen. Jedoch benötigt eine umfassende Bewertung dieser Mechanismen und Prinzipien auch die Integration möglichst umfassender, diverser Daten. Bei Spatial Transcriptomics beruhen die Aussagen ausschließlich auf Genaktivität und wie diese wiederum komplexe, zelluläre Aufgaben orchestriert²². Führt man sich nun noch vor Auge, dass nur etwa 3% des Genoms für Proteine codiert und auch diese Proteine wiederum posttranslationalen Modifikationen unterliegen¹⁸, kann man die Aussagekraft des

„Intermediats“ RNA zurecht infrage stellen. Das Konzept der transkriptomischen Analyse rückt das in den Mittelpunkt, was in Zukunft einmal vorhanden sein wird – und vernachlässigt dabei die aktuelle biochemische Beschaffenheit der Probe¹. Darüber hinaus sind Pathologien meist durch ein hochdynamisches Mikromilieu gekennzeichnet, das neben Zellen auch Extrazellulärmatrix beinhaltet, die wiederum von Transcriptomics nicht erfasst wird¹. Die im folgenden Abschnitt beschriebene Raman-Spektroskopie hat das Potential, diese Limitationen zu überwinden und ein neuartiges Licht auf die biochemische Komposition der analysierten Probe zu werfen.

1.4 Raman Mikrospektroskopie

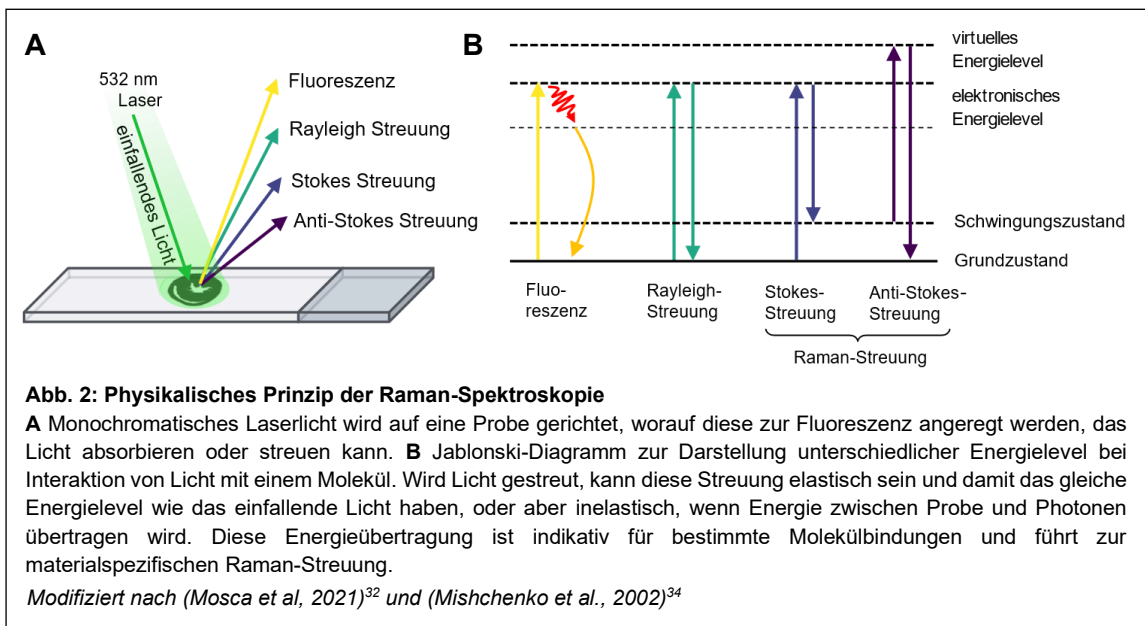
Die Raman-Spektroskopie stellt eine weitere wegweisende Methode zur hochdimensionalen Gewebecharakterisierung dar. Die nach dem indischen Physiker und Nobelpreisträger Sir C. V. Raman benannte Technik erlaubt eine biophysikalische Untersuchung von Materialien basierend auf der Detektion molekularer Vibrationen im Untersuchungsmaterial, die von einer einfallenden Lichtquelle erzeugt werden. Auf diese Weise können Materialien schnell, markerunabhängig, nicht-invasiv und nicht-destruktiv untersucht werden, und dies bei gleichzeitig hoher räumlicher und molekularer Auflösung.

1.4.1 Funktionsweise

Zur Anwendung der Raman-Spektroskopie wird die Probe mit monochromatischem Laser-Licht bestrahlt, sodass deren Moleküle – je nach Materialeigenschaft – zu verschiedenen Rotations-, Schwingungs-, Phonon- oder Spin-Flip-Prozesse angeregt werden. Diese Prozesse wiederum bewirken, dass das eingestrahelte Licht verschieden gestreut wird und spektrale Frequenzunterschiede auftreten, die dann wiederum Rückschlüsse auf die untersuchte Substanz erlauben³²⁻³⁴.

Abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts und den Materialeigenschaften der bestrahlten Probe, kann diese fluoreszieren (ultraviolettes Wellenspektrum), streuen (sichtbares Wellenspektrum) oder Licht absorbieren (infrarotes Wellenspektrum)³⁴.

Wenn Licht an der Probe gestreut wird, können die einfallenden Photonen wiederum elastisch oder inelastisch gestreut werden (Abb. 2). Im Falle einer elastischen Streuung („Rayleigh Scattering“) hat die Rückstreuung das gleiche Energielevel wie das einfallende Licht. Dies betrifft mehr als 99,9% der Photonen. Wird das Licht dagegen inelastisch gestreut, hat die Rückstreuung ein höheres oder niedrigeres Energielevel. Dies tritt außerordentlich selten ein (<0,1%; ca. 1 von 10^8 Photonen) und wird Raman Streuung („Raman Scattering“)³³ genannt.



Physikalisch entsteht inelastische Streuung bzw. Raman-Streuung dadurch, dass Energie zwischen Photonen und Probenmolekülen transferiert wird, indem letztere vibrieren oder rotieren. Dies bewirkt eine Frequenzverschiebung, die abhängig von der einfallenden Wellenlänge ist, was als Raman-Effekt bezeichnet wird³³. Wird Energie von Photonen auf Materie übertragen, bewirkt die Erniedrigung des Photonen-Energielevels einen Frequenzshift zu höherer Wellenlänge („Stokes-Scattering“), da die Energie umgekehrt proportional zur

Wellenlänge ist. Gegenteiliges passiert, wenn Energie stattdessen von der Materie auf die Photonen übertragen wird („Anti-Stokes-Scattering“).

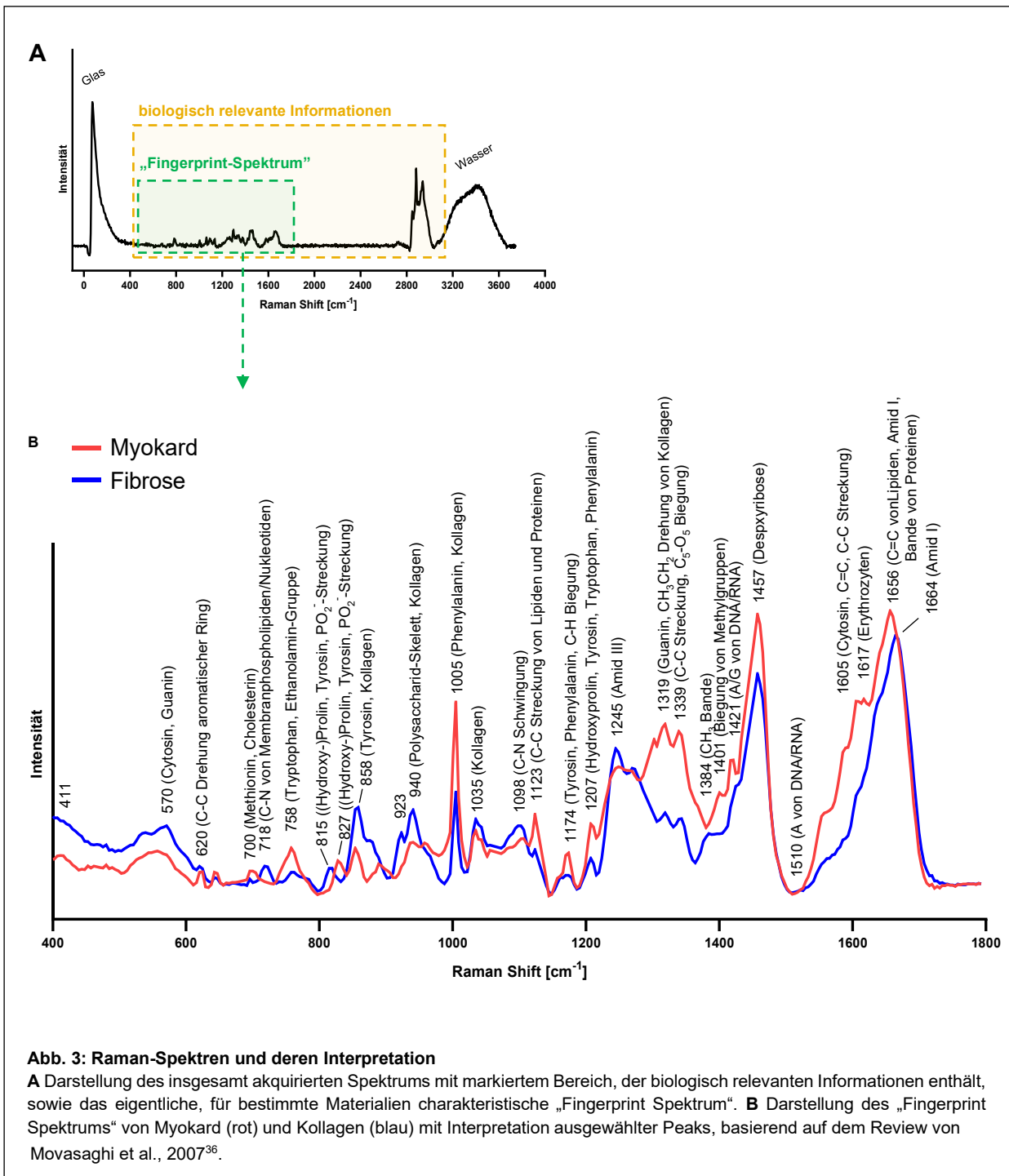
Der aus den beiden Fällen resultierende Frequenzshift der Raman-Streuung wird anschließend von einem Kerbfilter gegenüber der Rayleigh-Streuung herausgefiltert. Das gesammelte Streulicht wird dann über ein optisches Gitter entsprechend der Wellenlänge aufgefächert und auf einen CCD-Sensor („charge-coupled-device“, ladungsgekoppeltes Bauteil) gerichtet, der das Raman-Spektrum ausgibt³⁵.

1.4.2 Datenoutput, -analyse und -interpretation

Das resultierende Raman-Spektrum wird definiert über den oben beschriebenen Raman-Frequenzshift in der Einheit Wellenzahl ($1/\text{cm}$ bzw. cm^{-1}) und die Anzahl gestreuter Photonen als Intensität. Dieses Spektrum ist vergleichbar mit einem biochemischen Fingerabdruck der Probe, bei dem jeder Peak (Intensitätsspitze) einer bestimmten molekularen Vibration zugeordnet werden kann, und unterschiedliche Peaks und Intensitäten wiederum charakteristisch für bestimmte Biomaterialien sind³⁵.

Um Unterschiede zwischen unterschiedlichen Konditionen bzw. Geweben zu untersuchen, werden die jeweiligen Spektren gegenübergestellt. Dabei ist zu bedenken, dass beim Vergleich von Spektren stets multiple Unterschiede zu erwarten sind, da jede einzelne Wellenzahl des Spektrums als Variable zu werten ist. Anders als beim Vergleich univariater Gruppen (z.B. Blutdruck Gruppe A gegenüber Gruppe B) ergibt sich dabei als analytische Schwierigkeit, mehrere hundert Variablen gleichzeitig zu analysieren. Dazu wurden Verfahren entwickelt, die im Methodenteil vorgestellt werden und im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt und verfeinert wurden.

Die Abbildung 3 veranschaulicht das charakteristische „Fingerprint-Spektrum“ (siehe Methodenteil) von Myokard (rot) und Fibrose (blau) sowie die biologische Interpretation verschiedener Wellenzahlen. Tabelle 1 enthält eine Auflistung der für diese Arbeit relevanten Peaks sowie deren biologische Interpretation.



Tab. 1: Charakteristische Raman Peaks und ihre Interpretation. Modifiziert nach (Sigle et al., 2023)¹.

Raman Shift [cm ⁻¹]	Molekulare Entsprechung	Biologische Struktur
560	Si-O Biegung	Glas
722	O-C-N Biegung	Proteine ³⁷
757	Tryptophane, Pyrrolring-Atmung	Proteine ³⁷ , Hämoglobin ³⁸
783-793	Nukleinsäuren	DNA ^{39,40}
827	CH ₃ Streckung, Tyrosin	Myosin ⁴¹
853	C-C Streckung	Myosin ⁴¹
858	C-O Schwingung, (Hydroxy-)Prolin	Proteine, Kollagen ⁴²
889	CH ₂ Schwingung	Paraffin ⁴³
940	Skelett-Schwingung (C-C)	Proteine, Kollagen ^{42,44}
1000		Phenylalanin, NADH ^{36,45}
1005	Ring-Atmung, Phenylalanine	Proteine ⁴⁶
1034	C-H in plane Biegung	Proteine ⁴⁶
1064	Skelett-Schwingung (C-C)	Paraffin ⁴³
1070	C-C Steckung	Kohlenhydrate, Glucose ^{36,44}
1093-1096	Phosphodioxy-	DNA ^{39,40}
1100	Si-O-Si Streckung	Glas
1117	C-O Streckung	Kohlenhydrate, Glucose ^{36,44}
1123	C-O Streckung	Kohlenhydrate, Glucose ^{36,44}
1130	C-C Streckung	Lipide, Paraffin ⁴³
1245-1252	Amide III-Bande	Proteine ³⁷ , Kollagen ⁴²
1301	CH ₂ Deformation	Paraffin ⁴³
1314-1319	Cytochrom C	Cytochrom C ⁴⁷
1339-1343	CH ₂ /CH ₃ Biegung, C-C Streckung von Tryptophane, Pyrrol	Proteine ³⁷ , Erythrozyten ³⁸
1372-1376	Guanin	DNA ^{39,40}
1401	Pyrrol	Erythrozyten ³⁸
1420	CH ₃ Deformation	Paraffin ⁴³
1444	CH ₂ /CH ₃ Deformation	Paraffin ⁴³
1457-1461	CH ₂ /CH ₃ Deformation	Proteine ³⁷
1569	CN & NH Stretching	Proteine ³⁷
1580-1581	Cytosine, Guanine	DNA ^{39,40}
1589	C=C Stretching, Porphyrin	Erythrozyten ³⁸
1605	C=C Stretching	Phenylalanin ³⁷ , Erythrozyten ³⁸
1618	$\nu(\text{C}=\text{C})$	NADH ^{36,45}
1637	C-C asymmetrische Streckung	Erythrozyten ³⁸
1650-1680	Amide I-Bande	Proteine ³⁷
1678		NADH ^{36,45}

1.4.3 Raman-Spektroskopie in der kardiovaskulären Grundlagenforschung

Obwohl Raman-Spektroskopie klassischerweise im Bereich der analytischen Chemie und Materialwissenschaft verwendet wird, ist es in den letzten Jahren zu einem bemerkenswerten Anstieg des Gebrauchs dieser Technik in den Lebenswissenschaften, insbesondere im Bereich der Biomedizin gekommen³³. Auch in der kardiovaskulären Grundlagenforschung hat die Raman-Spektroskopie Einzug gehalten.

So gibt es Untersuchungen, bei denen verschiedene Stadien des akuten Myokardinfarktes auf Grundlage spezifischer molekularer Muster identifiziert wurden^{48,49}. Es konnte außerdem in einem kardialen Ischämie-Tiermodell gezeigt werden, dass aufgrund veränderter Spektren von Cytochromen, myokardiale Viabilität nicht-invasiv und markerunabhängig bestimmt werden kann⁵⁰.

Raman-Spektroskopie wurde auch verwendet, um myokardiale Fibrose hochsensitiv zu detektieren und quantifizieren⁵¹. Auch zur quantitativen und ultrasensitiven Detektion kardialer Biomarker, wie Troponin I und CK-MB, wurde diese Methode verwendet.

In einer kürzlich durchgeführten Studie an einem Tiermodell der Herzinsuffizienz zeigten Raman-Spektren eine Konformationsänderung oder einen unterschiedlichen Grad an Phosphorylierung/Methylierung in Tyrosin-reichen Proteinen in Kardiomyozyten⁵². Dennoch konnten die Mechanismen myokardialer Adaptation und Maladaptation infolge von Organischämie und Drucküberlastung auch durch klassische Raman-Spektroskopie bisher nur unzureichend geklärt werden.

1.4.4 Begriffsdefinitionen im Bereich der Raman „Spectromics“

In dieser Arbeit wird erstmalig der Begriff Raman „Spectromics“ eingeführt. Die Endung „-omics“ beschreibt hierbei die Anwendung von bioanalytischen Hochdurchsatzverfahren im Kontext der Raman-Spektroskopie. Es soll zum Ausdruck gebracht werden, dass die Gesamtheit aller Daten aus der Raman-

spektroskopischen Analyse betrachtet wird und auf diese Weise kein Bias durch Selektion bestimmter Raman-Peaks oder Bildung von Relationen einzelner Peaks entsteht. Des Weiteren soll mit dem Begriff „Spectromics“ auch die Kombinierbarkeit mit weiteren „Omics“-Techniken zu sogenannten „Multi-Omics“ impliziert werden. Da zusätzlich Informationen über die räumliche Distribution der Raman-Spektren in die Analyse integriert werden, kann der Methodenbezeichnung darüber hinaus der Zusatz „Spatial Spectromics“ zugewiesen werden, analog zu den bereits etablierten Spatial Transcriptomics oder „Spatial Metabolomics“. Das in dieser Arbeit praktizierte Vorgehen wird als „untargeted“ bezeichnet, da die Analyse nicht auf a priori definierte oder spezifisch ausgewählte Raman-Peaks abzielt. Dies ermöglicht eine umfassenden, unvoreingenommenen Datengenerierung und -analyse.

Die vollständige Bezeichnung der mit dieser Arbeit etablierten Methode lautet also „untargeted Spatial Raman Spectromics“ und beinhaltet Methoden des unsupervidierten maschinellen Lernens, um automatisiert eine Gewebeprobe zu klassifizieren, charakterisieren und vergleichend zu analysieren.

1.5 Fragestellung

Bisherige Arbeiten über moderne Auswertemethoden der Raman-Spektroskopie haben überwiegend „Partial Least Squares“ (PLS) oder eine Hauptkomponenten-Analyse (PCA, siehe oben) verwendet, um Clusteranalysen durchzuführen und differenzielle Eigenschaften zwischen Gruppen zu detektieren⁵³. Fortschrittlichere Arbeiten nutzen Methoden des supervidierten maschinellen Lernens⁵⁴⁻⁵⁶, die jedoch zum einen zunächst trainiert werden müssen, und zum anderen der genaue Weg hin zu einer bestimmten Vorhersage oder Klassifizierung in der Regel eine nicht nachvollziehbare „Black-Box“ bleibt. Darüber hinaus lassen sich trainierte Modelle des maschinellen Lernens nur schwierig vergleichen und reproduzieren.

Diese Arbeit soll einen anderen Weg beschreiten, und den translationalen Einsatz bestehender, hoch entwickelter bioinformatischer Tools aus der Welt der „(Spatial) Transcriptomics“ zur Analyse von Raman-Spektren untersuchen.

In dieser Arbeit werden etablierte bioinformatische Tools zur Analyse hochdimensionaler „Omics“-Daten in die „Raman-Welt“ translatiert, um „untargeted“ spatiomolekulare Informationen von erkranktem Herzgewebe zu analysieren. Räumlich aufgelöste, spektrale Informationen sollen dazu verwendet werden, eine unsupervidierte hochdimensionale Charakterisierung von Gewebematrix und Zellen zu generieren. Dabei sollen Matrixkomponenten ähnlicher Zusammensetzung oder Zellen desselben Zelltyps identifiziert und hochsensitiv qualitative und quantitative Unterschiede deren molekularer Zusammensetzung untersucht werden.

Konkret soll diese Arbeit die folgenden Punkte erörtern:

- i) Können die aus der Raman-Spektroskopie gewonnenen Daten in bereits etablierte, hochentwickelte Analysetools für (Spatial) Transcriptomics und Single Cell Genomics integriert und damit analysiert werden?
- ii) Kann die räumliche Auflösung eines zweidimensionalen Raman-Scans als zusätzliche Information in der Analyse berücksichtigt werden und welcher analytische Mehrwert kann hierdurch gewonnen werden?
- iii) Wie valide lässt sich der neue Workflow an Gewebeproben aus etablierten Tierversuchen anwenden, und welche neuen Informationen können hieraus abgeleitet werden?
 - a. im Tiermodell der akuten Myokardschädigung (Herzinfarktmodell)
 - b. im Tiermodell der chronischen Myokardschädigung (Hypertensionsmodell)
- iv) Lässt sich der neue Workflow mit anderen multidimensionalen Analysemethoden im Sinne einer „Multi-Omics“-Analyse verknüpfen?
 - a. Welche neuen Erkenntnisse können hieraus gewonnen werden?
 - b. Lassen sich die Messergebnisse der Raman „Spectromics“ durch weitere räumlich aufgelöste Analysearten validieren?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden vom Regierungspräsidium unter den Tierversuchsantragsnummern M5/17, M20/15, M04/19G, M02/20G und M01/21G nach §8 des Tierschutzgesetzes genehmigt. Es wurden zum Zweck der besseren Reproduzierbarkeit ausschließlich männliche Versuchstiere in einem Alter zwischen acht und zwölf Wochen verwendet.

Linie	Genauere Bezeichnung	Herkunft
Wildtyp-Mäuse	B6.Cg-Thy1a-(Acr3)Acr3 ^{tm1Fma} -Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA
<i>ApoE</i> ^{-/-} Mäuse	B6.129P2-Apoe ^{tm1Unc} /J	Charles River, Boston, Massachusetts, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Produkt und Hersteller
Für Histologie	
Mikrotomklingen	Mikrotomklinge S35 (PFM medical AG, Nonnweiler, Deutschland)
Objektträger	SuperFrostPlus (R. Langenbrinck, Emmendingen)
Deckgläser	Menzel-Gläser 24 x 60 mm; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Safe-Lock Tubes (Eppendorf Deutschland, Hamburg, Deutschland)
Fettstift	Super PAP Pen Liquid Blocker (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Für Ultraschall	
Enthaarungscreme	Veet for Men (Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich)
Tupfer	Mikrochirurgische Tupfer Ethikeil®, Ethicon, Norderstedt/Glashütte, Deutschland
Wattestäbchen	Bel premium (CMC Consumer Medical Care GmbH, Sontheim/Brenz, Deutschland)
Ultraschallgel	Sonogel® Vertriebs GmbH, Bad Camberg, Deutschland
Für OP osmotische Pumpe	
Insulinspritzen (für Pumpenbefüllung)	30G 0,3 x 8 mm BD-Microfine™ U-40 Insulin, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kanülen in verschiedenen Größen	BD Microlance™ 3 (Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Irland) Sterican 30G (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Spritzen in verschiedenen Größen	(B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Nahtmaterial	Prolene 4-0, Ethicon, Norderstedt/Glashütte, Deutschland
Für OP LAD-Ligatur	
Braunüle zur Intubation	Vasofix® Braunüle® 0,90 x 25 mm G 22 blau, FEP, B. Braun, Melsungen, Deutschland
Elektrokauter	Bovie® Aaron Medical, Change-A-Tip High Temperature Power Handle, St. Petersburg, Florida, USA
Nahtmaterial	Prolene (6-0); Vicryl (6-0), Ethicon, Norderstedt/Glashütte, Deutschland
Wärmematte	Wärmeunterlage Thermolux, AccuLux, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt
elektrischer Rasierer	Trimmer Clipper Model 9966, Wahl® Home Products, Illinois, USA

2.1.3 Reagenzien, Lösungen, Chemikalien, Proteine und Antikörper

Beschreibung	Produkt und Hersteller
Medikamente für Tierversuche	
Augensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)
Isofluran	Isofluran CP®, 1 mg/ml (cp-pharma®, Burgdorf, Deutschland)
Atipamezolhydrochlorid	Antisedan®, 5 mg/ml, Vetoquinol Ismaning, Deutschland
Buprenorphinhydrochlorid	Buprenovet®, 0,3 mg/ml (Bayer, Animalcare Limited, York, Vereinigtes Königreich)
Fentanylcitrat	Fentadon®, 50 µg/ml (Eurovet Animal Health, Bladel, Niederlande)
Flumazenil	Flumazenil HEXAL®, 0,1 mg/ml (HEXAL AG, Holzkirchen, Deutschland)
Medetomidinhydrochlorid	Sedator®, 1 mg/ml (Eurovet Animal Health, Bladel, Niederlande)
Midazolam	Midazolam-hameln 1 mg/ml (hameln pharma plus GmbH, Hameln, Deutschland)
Natriumchlorid 0,9%	Isotonische Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
Reagenzien, Lösungen und Chemikalien	
Formaldehyd-Lösung	4%, neutral gepuffert (Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland)
Ethanol	Ethanol 99%, vergällt (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach, Deutschland)
PBS Tabletten	(Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Citric Acid	Zitronensäure; ACS reagent, ≥ 99,5%, (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA, MW = 192,12 g/mol)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	MW = 294,10 g/mol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Tween® 20	for synthesis, 50 g/l, (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Eisessig	Acetic acid glacial ≥99.7% ACS (VWR Life Science, Darmstadt, Deutschland)
Roti®-Histol	Für die Histologie (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Histokitt	Synthetisches Einschlussmittel für die Histologie, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	C.I. 45380, Pulver, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Für die Mikroskopie, Merck, Darmstadt, Deutschland
Picro-Sirius Rot	Merck, Darmstadt, Deutschland

Antikörper und Farbstoffe

Alpha-Smooth Muscle Actin	1A4	1:50	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Beta Actin	REAL1032	1:50	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD105	MJ7-18	1:50	Miltenyi Biotec
CD11b	M1-70-15-11-5	1:50	Miltenyi Biotec
CD11c	N418	1:50	Miltenyi Biotec
CD2	REA959	1:50	Miltenyi Biotec
CD3	REA641	1:50	Miltenyi Biotec
CD31	REAL260	1:50	Miltenyi Biotec
CD4	REA604	1:50	Miltenyi Biotec
CD41	REA1194	1:50	Miltenyi Biotec
CD44	REA664	1:50	Miltenyi Biotec
CD45	REA737	1:50	Miltenyi Biotec
CD61	REA1192	1:50	Miltenyi Biotec
CD68	REA835	1:50	Miltenyi Biotec

CD80	REA983	1:50	Miltenyi Biotec
CD8b	REA793	1:50	Miltenyi Biotec
Cardiac Troponin T	REA400	1:50	Miltenyi Biotec
Cytokeratin 19	A-3	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
DAPI Staining Solution	-	1:100	Miltenyi Biotec
F4/80	REA126	1:50	Miltenyi Biotec
Ki67	REA183	1:50	Miltenyi Biotec
Ly-6G	REA526	1:50	Miltenyi Biotec
MHC Class II	REA813	1:50	Miltenyi Biotec
Vimentin	E-5	1:200	Santa Cruz Biotechnology

2.1.4 Geräte

Beschreibung	Produkt und Hersteller
Ultraschallgerät	Vevo 2100 (FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada)
Beatmungsgerät	Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
Für Histologie	
Paraffin-Einbettungssystem	Medax Nagel, Kiel
Mikrotom	2405 Multicut (Leica, Wetzlar)
Streckbad	Paraffinstreckbad (Medax Nagel, Kiel)
pH Meter	pH 90 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland)
Schüttler	KS 260 basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
Schnellkochtopf	Art. Nr. 99318 (Elo-Stahlwaren, Karl Grünewald & Sohn GmbH & Co. KG, Spabrücken, Deutschland)

Heizplatte	Kochplatte KP 1092 (Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland)
Vortexer	MS3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
Waage	Kern CM 150-IN Pocket Balance, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf® Microcentrifuge 5415C (Eppendorf Deutschland, Hamburg, Deutschland)

Mikroskope

Stereomikroskop	Zeiss STEMI 2000-C (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Histologie	Nikon Eclipse Ti2-A
Konfokales Raman Mikroskop	WITec alpha 300 R (WITec GmbH, Ulm, Germany)
MACSima™ Imaging System	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.5 Software

Produkt	Hersteller
NIS-Elements AR	Nikon, Japan
MACS® iQ View Bild-analysesoftware	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
ImageJ	ImageJ, National Institutes of Health, USA
EndnoteX9	Clarivate Analytics, Boston, Massachusetts, USA
RStudio 1.3.1093	RStudio, Boston, Massachusetts, USA
MATLAB R2020a	MathWorks Inc., Natick, MA, USA
GraphPad Prism 9.1.2	GraphPad Software, La Jolla, California, USA
Excel Version 2203	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
VevoLab 5.5.0	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada

2.1.5.1 Wichtigste R Packages, alphabetisch sortiert

Package	Version
BayesSpace	1.6.0
Cardinal	2.8.0
cellranger	1.1.0
cluster	2.1.2
clustree	0.5.0
cowplot	1.1.1
data.table	1.14.2
DDRTree	0.1.5
dplyr	1.0.7
factoextra	1.0.7
factorMineR	2.5
ggplot2	3.3.5
ggpmisc	0.5.0
ggstats	0.9.4
Matrix	1.3-4
matrixStats	0.60.0
Monocle2, Monocle3	2.18.0, 1.0.0
pheatmap	1.0.12
RColorBrewer	1.1.2
reshape2	1.4.4
reticulate	1.22
Rtsne	0.16
scater	1.19.9
sctransform	0.3.3
Seurat	4.0.2
SingleCellExperiment	1.18.0
sparseMatrixStats	1.2.1
tidyr, tidyverse	1.2.1, 1.3.1
venneuler	1.1-3

2.2 Methoden

2.2.1 *In-vivo*-Methoden

2.2.1.1 Tiermodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion

Die experimentelle Induktion eines Myokardinfarkts im Maus-Modell erfolgte durch reversible Ligatur der linken Koronararterie (LAD, „left anterior descending coronary artery“). Zur Durchführung der Operation wurde den Mäusen zunächst unter Isoflurannarkose intraperitoneal eine gewichtsadaptierte Tripelnarkose (Fentanyl 0,05 mg, Medetomidin 0,5 mg, Midazolam 5 mg jeweils pro kg Körpergewicht) verabreicht. Um eine ausreichende Oxygenierung über die gesamte Dauer der Operation inklusiver der halbstündigen Ischämiephase sicherzustellen, erfolgte nach Verifizierung einer ausreichenden Narkosetiefe im Anschluss eine endotracheale Intubation der Mäuse. Dazu wurde unter äußerlich auf die Trachea gerichtetem Licht eine 22G Braunüle (Vasofix® Braunüle®, B. Braun) ohne Nadel unter Sicht orotracheal vorgeschoben und über einen Verbindungsschlauch an ein Beatmungsgerät (Physiosuite for Mice & Rats, Kent Scientific Corporation) angeschlossen.

Vor der eigentlichen Operation wurden die Mäuse in Rückenlage auf eine Wärmematte (Thermolux, Witte + Sutor GmbH) an den Vorderpfoten fixiert, während die linke Hinterpfote neben die rechte rotiert und hier zusammen fixiert wurde. Anschließend wurde das Brustfell mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Beckiser) enthaart und die Haut desinfiziert. Nun erfolgte ein Hautschnitt auf der linken Thoraxseite und die Verödung der A. epigastrica superficialis cranialis mit einem Elektrokauter (Bovie® Aaron Medical, Change-A-Tip High Temperature Power Handle). Die Interkostalmuskulatur wurde anschließend stumpf im vierten Interkostalraum präpariert und der Zwischenrippenraum mithilfe eines Rippenretraktors geweitet. Nach Aufsuchen und Darstellung der LAD wurde diese kurz unterhalb des linken Herzohrs mit einem nicht-resorbierbaren 7-0 Faden (Perma Hand, Ethicon) umstoichen und die Ligatur auf einen Polyethylenschlauch (Fine Bore Polythene Tubing, Portex™, Smiths Medical International Ltd., Kent) als Platzhalter gesetzt. Nach 30 min Ischämiezeit wurde durch Lösen des Ligaturfadens und Entfernen des Polyethylenschlauches die

Reperfusion eingeleitet. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse scheinoperiert (Sham), indem die LAD ebenfalls umstochen, aber keine Ligatur gesetzt wurde. In beiden Fällen wurden nach der Ischämiedauer, Thorax und Haut durch zwei bis drei Einzelknopfnähten mit 6-0 Vicryl (Ethicon) bzw. zwei bis drei U-Nähten mit 6-0 Prolene (Ethicon) verschlossen. Zur Antagonisierung der Tripelnarkose wurde den Mäusen anschließend Atipamezol (2,5 mg/kg Körpergewicht) und Flumazenil (0,5 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Anschließend konnten die Tiere in ihren auf eine Wärmematte gestellten Heimatkäfig zurückgesetzt werden. Zur Schmerzlinderung erhielten die Mäuse für die nächsten 24 Stunden alle 8 Stunden eine subkutane Buprenorphin-Injektion (0,1 mg/kg KG).

2.2.1.2 Tiermodell der kardialen Hypertrophie und des kardialen Remodelings

Etwa 24 Stunden vor Implantation wurden die osmotischen Pumpen (Modell 1004, Alzet) adaptiert an das Gewicht der Maus mit Ang II befüllt, sodass die Versuchstiere über einen Zeitraum von 28 Tagen kontinuierlich mit 1000 ng/min/kg Körpergewicht Ang II infundiert werden konnten.

Zur Implantation der Pumpen wurde den *ApoE*^{-/-}-Mäusen (B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J) zunächst unter Isoflurannarkose intraperitoneal eine Tripelnarkose (siehe oben) verabreicht. Nach Verifizierung einer ausreichenden Narkosetiefe mittels Testung des Zwischenzehen-Reflexes wurden die Mäuse auf eine Wärmematte (Thermolux, Witte + Sutor GmbH) gelegt und das Nackenfell mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Beckiser) und einem elektrischen Rasierer (Wahl® Home Products) enthaart. Der Operationsbereich wurde anschließend mit Desinfektionsmittel und Iod-Antiseptikum desinfiziert. Schließlich wurde mit einer Schere paramedian im Bereich des Nackens ein etwa 1,5 cm langer Schnitt gesetzt und subcutan eine etwa 3,5 cm lange Pouch stumpf präpariert. In diese Pouch wurde dann im nächsten Schritt die osmotische Pumpe eingebracht und anschließend der Hautschnitt mittels drei bis vier U-Nähten mit 4-0 Prolene (Ethicon) verschlossen. Die Wunde wurde abschließend nochmals desinfiziert und anschließend die Triple-Narkose durch subcutane Injektion von Atipamezol (2,5 mg/kg Körpergewicht) und Flumazenil (0,5 mg/kg Körpergewicht)

antagonisiert, sodass die Mäuse aufwachen und in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt werden konnten. Die analgetische Behandlung erfolgt im Anschluss mit Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht, 1:50 mit NaCl verdünnt) alle 12 Stunden für die nächsten 24 Stunden.

2.2.1.3 Echokardiographie und Auswertung

Ultraschalluntersuchungen des Herzens wurden im Modell des akuten Myokardinfarkts vor der Operation (Baseline) durchgeführt sowie 24 h danach. Für das Modell der chronischen Hypertrophie/Remodeling wurde der Ultraschall vor Pumpenimplantation (d0) sowie im Anschluss alle 7 Tage (d7, d14, d21) bis inklusive dem finalen Tag 28 angewandt.

Zur Durchführung der Echokardiografie wurden die Versuchstiere unter Isoflurannarkose (1-5% bei Sauerstoff-Flow 1 l/min) auf einem frei beweglichen Untersuchungstisch (Vevo Imaging Station, VisualSonics) angebracht. Nachdem die Augen durch Bepanthen-Salbe vor dem Austrocknen geschützt wurden, konnte die Maus auf den Rücken gedreht werden und das Untersuchungsgebiet im Bereich der linken Thoraxwand mittels Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Beckiser) enthaart werden. Durch die Messergebnisse einer Rektalsonde in der Maus wurde der Untersuchungstisch so beheizt, dass die Körpertemperatur der Tiere möglichst konstant gehalten wurde. Für ein Monitoring der Vitalparameter wurde über die Fixierung der Mauspfoten am Ultraschalltisch ein EKG abgeleitet sowie eine Atemkurve über den Zufuhrschlauch der Isoflurannarkose. Abschließend wurde großzügig vorgewärmtes Ultraschallgel auf die enthaarten Bereiche aufgetragen. Untersucht wurde dann das Mauserz in der parasternalen langen Achse (PSLAX, parasternal long axis view) als auch in der kurzen Achse (SAX, short axis view) jeweils im B- und M-Mode mit einem Kleintier-Ultraschallgerät (Vevo 2100, VisualSonics), gekoppelt an einen 40 MHz Schallkopf. Nach Beendigung der Untersuchung wurden die Tiere vom Ultraschallgel befreit und in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt.

Die Auswertung der Ultraschallaufnahmen erfolgte im Anschluss an die Studie auf einem separaten Auswerte-Laptop mittels der Software VevoLab 3.0.5 (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Kanada). Analysiert wurden B-Mode Sequenzen über mehrere Herzzyklen sowie M-Mode Sequenzen auf Höhe der Papillarmuskeln. Die Berechnung der EF (Ejektionsfraktion) und LV Mass (linksventrikuläre Masse) erfolgte durch die LV Trace Funktion und das Bemessen systolischer und enddiastolischer Diameter und Myokarddicken. Für höchste Validität wurden die berechneten Werte durch wiederholte Messungen und unterschiedliche Achsen gemittelt.

2.2.2 Analyse histologischer Proben

2.2.2.1 Explantation der Herzen, Probenaufbereitung und Anfertigung histologischer Schnitte

Am Finaltag wurden die Mäuse nach der abschließenden Ultraschalluntersuchung durch eine Überdosis Isofluran getötet. Nach Sicherstellung des eingetretenen Todes wurde der Thorax geöffnet und das Herz vor Entnahme mit Heparin (20 U) versetztem PBS gespült. Zur Fixierung der Herzen wurden diese für mindestens 24 Stunden mit 4% Formaldehydlösung (Otto Fischar GmbH & Co KG) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung des Gewebes durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit einstündiger Inkubation in 70%, 80%, 90%, zweimal 100% Ethanol und zweimal Roti®-Histol (Carl Roth). Als nächstes wurden die Herzen über Nacht im Paraffinofen mit flüssigem Paraffin inkubiert. Am Folgetag wurden diese Herzen dann in frisches, flüssiges Paraffin eingebettet und in Einbettförmchen auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Von den ausgehärteten Paraffinblöcke konnten nun 5 µm dicke Schnitte mithilfe eines Mikrotoms (Leica) angefertigt werden, die in einem kalten Wasserbad auf einen Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogen und in einem warmen Wasserbad geglättet wurden.

2.2.2.2 Klassische histologische Färbungen

Vor Durchführung der klassischen Färbungen wurden die histologischen Schnitte durch zweimal Roti®-Histol für 10 min entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe mit zweimal 100%, sowie 90%, 80% und 70% Ethanol für je 5 min in destilliertes Wasser überführt.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die vorbereiteten Schnitte für 5 min in Mayers Hämaunlösung (Merck) gegeben und für 15 min in fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte für 3 min in 1% Eosin G-Lösung gegengefärbt. Nachfolgend wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gewaschen, über eine aufsteigende Alkoholreihe wieder dehydriert, in Roti®-Histol überführt und abschließend mit Roti®-Histokitt (Carl Roth) und einem Deckgläschen (R. Langenbrinck) eingedeckt.

Die Picro-Siriusrot-Färbung (SR-Färbung) zur Anfärbung von fibrotischen Arealen wurde durch einstündige Inkubation der Schnitte mit 1,2% Picro-Siriusrot-Lösung (Merck) durchgeführt. Daran anschließend wurden die Schnitte zweimalig kurz in 0,5% Essigsäure gewaschen und 100% Ethanol sowie Roti®-Histol überführt. Abschließend wurden die Schnitte ebenfalls eingedeckt.

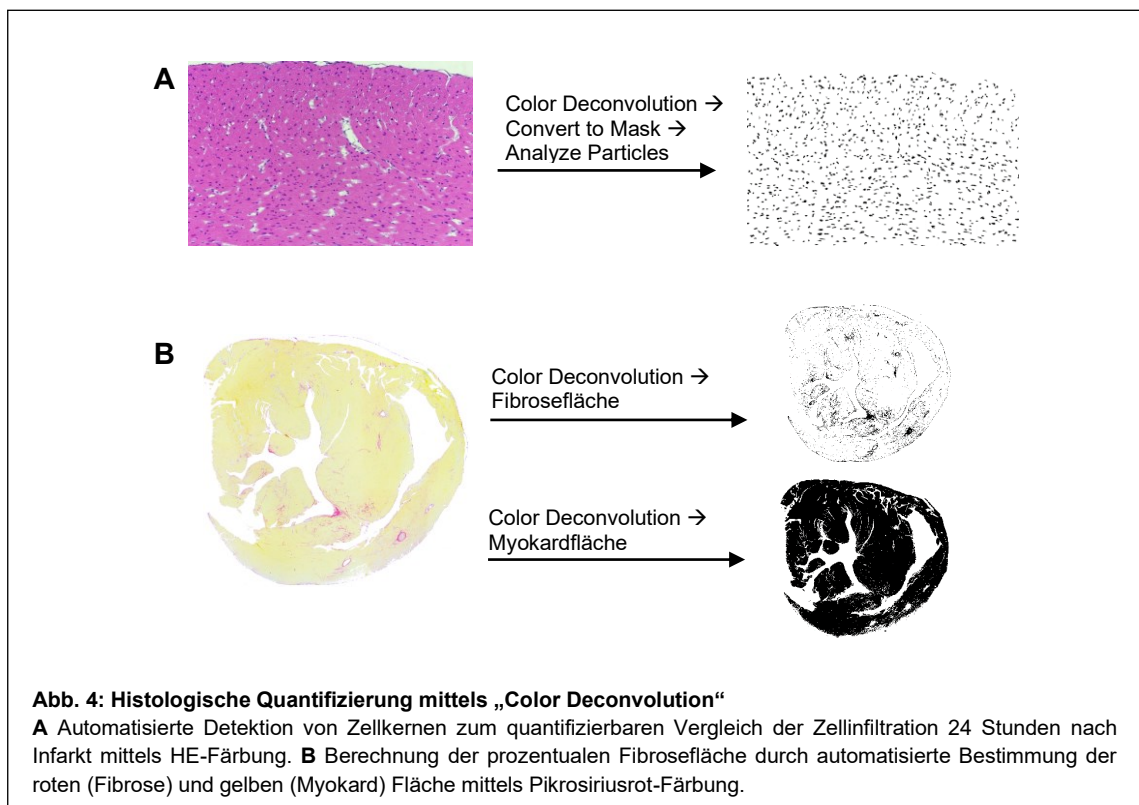
2.2.2.3 Quantitative Auswertung der Färbungen

Die quantitative Auswertung der klassischen histologischen Färbungen erfolgte mit ImageJ (National Institutes of Health, USA) und selbsterstellten Makros zur automatisierten und damit Untersucher-unabhängigen Quantifizierung.

Für das Tiermodell des akuten Myokardinfarkts wurden – als Maß für die Infiltration inflammatorischer Zellen in die Periinfarktregion – alle in der HE-Färbung mit Hämaun angefärbten Zellkerne gezählt. Dazu wurden zunächst die blau angefärbten Kerne mittels eines quelloffenen Color Deconvolution-Plugins (https://github.com/landinig/IJ-Colour_Deconvolution2) aus dem HE-Bild segmentiert. Im nächsten Schritt wurde das entstandene 8-Bit-Bild zu einer Maske konvertiert und konfluierende Kerne durch die „Watershed“-Funktion

getrennt. Im Anschluss konnten die Zellkerne durch angepasste erwartete Größe (300-3000 px²) und Zirkularität (0,2-1,0) automatisiert gezählt werden (Abb. 4A).

Zur Quantifizierung der Fibrosefläche im Modell der kardialen Hypertrophie wurde die Picro-Siriusrot-Färbung ebenfalls mittels Quantifizierung in seine gelbe (entspricht Myokard) und rote (entspricht Fibrose) segmentiert (Abb. 4B). Die prozentuale Fibrosefläche konnte dann aus dem Quotienten von Fibrosefläche zur Summe aus Fibrose- und Myokardfläche berechnet werden.



2.2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten

Immunfluoreszenzfärbungen der Paraffinschnitte wurden mittels eines vollautomatisierten hochdurchsatzfähigen Färbe- und Bilderfassungsautomaten angefertigt (MACSima™, s.u.). Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden zur Überlagerung mit Raman Scans angefertigt. Nach der Raman-Spektroskopie wurden dazu die Schnitte in PBS für bis zu 24 Stunden aufbewahrt. Anschließend wurde eine Hitze-induzierte Antigen-Freilegung („heat-induced antigen retrieval“)

durchgeführt, indem die Schnitte bei pH 9 in einem TEC Puffer (2 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mM Natriumcitrat) für 20 min gekocht wurden. Anschließend wurden die Schnitte bis zur Färbung in MACSim™ Running Buffer (Mitenyi) gelagert. Die Aufnahme-region wurde anhand einer Kernfärbung mittels DAPI festgelegt. Anschließend wurden die Schnitte dreimalig mit MACSima™ Running Buffer gewaschen und der Färbeautomat gestartet.

2.2.3 Bilderfassung

2.2.3.1 Mikroskopie der histologischen Färbungen

Die histologischen Standardfärbungen wurden mit einem Nikon Eclipse Ti-2A Mikroskop aufgenommen (4-40x Objektive) und die Bilder mit NIS-Elements AR (Nikon) analysiert.

2.2.3.2 Raman-Spektroskopie

Für die Raman-Spektroskopie wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert. Anschließend wurden ausgewählte Regionen mit dem konfokalen Raman Mikroskop Witec alpha 300R (Witec GmbH) und einem 63x Objektiv gescannt. Dabei wurde ein grüner Laser (532 nm) mit 50 mW Laserstärke und einer Integrationszeit von 0,05s/Pixel eingesetzt. Die Scan-Areale waren 250x250 oder 300x300 Pixel groß mit einer Auflösung von 1 µm pro Pixel. Bei noch größeren Scan-Arealen wurde eine Topografie-Korrektion durchgeführt mittels „true surface manual learning“ anhand einer „3-Point-Plane-Correction“ in der Scan-Region.

2.2.3.3 Zyklische Färbung und Bilderfassung mit der MACSima™ Plattform (MACSima™ Imaging Cyclic Staining (MICS))

Das MACSima™ Gerät ist ein hochdurchsatzfähiger Färbeautomat mit kombiniertem Mikroskop. Das Gerät führt vollautomatisch Zyklen aus Fluorochrom-gelabelter Antikörperfärbung, Bildakquisition und Fluorochrom Bleaching durch. Die Bilder wurden gemäß den Herstelleranweisungen generiert und mit der MACS® iQ View Bildanalyse-Software (Mitenyi) analysiert.

2.2.4 Statistische Auswertung

2.2.4.1 Klassische Auswertemethoden

Die klassischen statistischen Messverfahren wie t -Test und Korrelationen wurden mit der Software GraphPad Prism 9.1.2 durchgeführt. Balkendiagramme wurden als Mittelwert \pm S.E.M (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die Gruppengröße bzw. die Anzahl an biologischen Replikaten wurde in den Abbildungslegenden angegeben. Statistische Signifikanz wurde für normalverteilte Daten und zwei Gruppen mithilfe eines Student's oder Welch t -Test berechnet. Korrelationen wurden mittels linearer Regression ermittelt. Ergebnisse mit p -Werten $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die Versuchstiere wurden zufällig den Versuchsgruppen zugewiesen. Die quantitative Auswertung erfolgte verblindet oder automatisiert und damit in allen Fällen Untersucher-unabhängig.

2.2.4.2 Datenpräprozessierung für Raman „Spectromics“

Die akquirierten Spektraldaten der Raman Scans wurden zunächst für die weitere Datenverarbeitung vorprozessiert. Dazu gehören „cosmic ray removal“, „background subtraction“ und „normalization“ mithilfe der proprietären Software Project FIVE 5.2 (Witec). Auf diese Weise wurden störende Peaks und Anstiege in der Grundkurve einheitlich angepasst, sodass eine bessere Vergleichbarkeit der Proben gewährleistet werden konnte.

Anschließend wurden die Rohdaten aus Project FIVE exportiert und in MATLAB (MathWorks Inc.) importiert. Mithilfe eines eigenen Programms wurden nun die Rohdaten in ein besser lesbares Tabellenformat konvertiert. Die exportierten Dateien konnten dann in RStudio (RStudio PBC) geladen und weiter analysiert werden.

Betrachtet wurden entweder das gesamte biologisch relevante Spektrum (im Folgenden „Gesamtspektrum“ genannt) mit Wellenzahlen zwischen 300 und 3000 cm^{-1} oder das „Fingerprint-Spektrum“ zwischen 400 und 1800 cm^{-1} . Die Bereiche wurden bereits in Vorarbeiten definiert^{35,57}.

2.2.4.3 Multiparametrische Analyse der Raman „Spectromics“

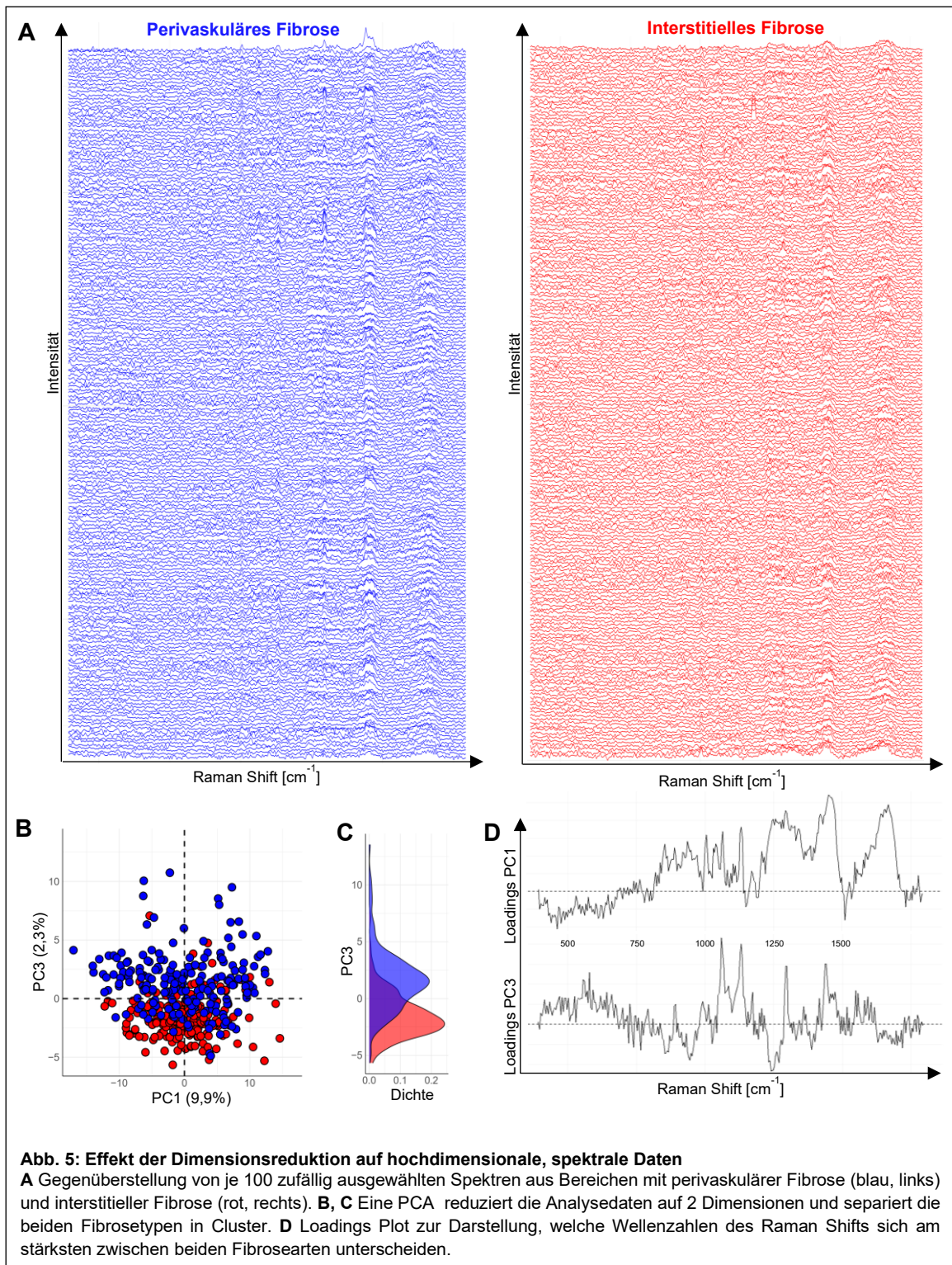
Spektrale Daten werden in der Regel als Kurvendiagramm dargestellt, bei dem entlang der Abszisse die Wellenzahl des Raman-Shifts und auf der Ordinate die Intensität bzw. die Anzahl gemessener Photonen aufgetragen werden. Um Spektraldaten zwischen Gruppen oder Biomaterialien vergleichen zu können, kann die Intensität für bestimmte Raman-Shifts zueinander in Bezug gesetzt werden. Dies kann mit einer einzelnen, oder auch mit n beliebigen Wellenzahlen (also Variablen) erfolgen, wobei die Validität des Vergleichs mit der Anzahl untersuchter Variablen steigt.

Betrachtet man nun beispielsweise isoliert in einem Streudiagramm die Intensitäten zweier Wellenzahlen für verschiedene Messpunkte, so kann man die Intensität der ersten Wellenzahl auf der x -Achse und die der zweiten Wellenzahl auf der y -Achse auftragen. Für drei Intensitäten kann dies in einem dreidimensionalen Koordinatensystem mit x -, y - und z -Achse visualisiert werden – ab 4 Intensitäten kommt man an die Grenzen der grafischen Darstellbarkeit. Für eine umfassende Untersuchung spektraler Daten wurden in dieser Arbeit bis zu 630 verschiedene Peaks untersucht, was folglich 630 Dimensionen entspricht.

Um solche hochdimensionalen Datensätze zu untersuchen, wurden bioinformatische Methoden zur Dimensionsreduktion entwickelt. Dazu zählen u.a. die PCA (Principal Component Analysis), tSNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) und UMAP (uniform manifold approximation and projection). Es handelt sich dabei um Methoden des maschinellen Lernens, die durch mathematische Berechnungen hochdimensionale Daten mit minimalem Informationsverlust auf den zwei- oder dreidimensionalen Raum reduzieren können. Dabei werden in den Analysedaten Muster basierend auf der Ähnlichkeit von Datenpunkten gesucht, und diese Ähnlichkeit wird im geringerdimensionalen Raum versucht abzubilden.

Die Notwendigkeit der angesprochenen Dimensionsreduktion soll Abb. 5 vergegenwärtigen. Untersucht werden soll, ob sich die Raman-Spektren von perivaskulärer und interstitieller Fibrose unterscheiden. Dargestellt sind je 100 Spektren beider Kollagenarten in Blau und in Rot. Bei Betrachtung mit dem Auge

würde man wahrscheinlich keine Unterschiede in den Spektren zwischen beiden Fibrosearten feststellen – die Daten sind zu hochdimensional, um Unterschiede mit dem bloßen Auge zu erkennen. Daher wurde nun im nächsten Schritt eine PCA auf den Datensatz angewandt (Abb. 5B). Zu sehen sind nun Punkte, auf die die Spektren reduziert wurden und die im zweidimensionalen Raum so angeordnet wurden, dass sie bestmöglich ihre hochdimensionale Information wiedergeben. Nun kann das Auge auch erkennen, dass die blauen Punkte eine Punktwolke/Cluster bilden, das weiter oberhalb liegt als die roten Punkte – folglich unterscheiden sich die beiden Fibrosearten doch. Um nun die Unterschiede im Raman-Spektrum herauszufinden, untersucht man im nächsten Schritt die „Loadings“ (Abb. 5D). Loadings können als Gewichte der ursprünglichen Variablen (d.h. Wellenzahlen + Intensitäten) verstanden werden, um die Hauptkomponenten zu berechnen. Genauer gesagt beschreiben die Loadings, wie stark die Variablen mit der gewählten Hauptkomponente korrelieren. Dargestellt als Spektrallinie zeigen sie damit indirekt, welche Wellenzahlen die größten Unterschiede zwischen beiden Fibrosearten aufweisen. Anhand dieser spezifischen Raman Peaks kann dann über die molekulare Zuweisung auf die biologischen Unterschiede rückgeschlossen werden.



Im Folgenden soll kurz auf den mathematischen Hintergrund der wichtigsten Dimensionsreduktionsverfahren eingegangen werden.

2.2.4.3.1 PCA

Die PCA (Principal Component Analysis) ist eine lineare Dimensionsreduktions-Methode, deren Ziel es ist, vorliegende Redundanz in hochdimensionalen Datensätzen in Form von Korrelationen zusammenzufassen, um dann die Datenpunkte mit möglichst geringem Informationsverlust im zweidimensionalen Raum darzustellen⁵⁸.

Mathematisch wird dazu eine Hauptachsentransformation durchgeführt, bei der in einem iterativen Prozess zunächst eine Gerade (die 1. Hauptkomponente) durch den n-dimensionalen Datensatz gelegt wird, bei der die euklidische Distanz zwischen den Datenpunkten und der Gerade minimal ist. Danach wird eine weitere Gerade (die 2. Hauptkomponente) gesucht, die orthogonal zur 1. Hauptkomponente steht und ebenfalls eine möglichst geringe Distanz zu den Datenpunkten aufweist. Dieser Prozess kann nun n-Mal wiederholt werden, wobei mit jeder Iteration die erklärte Varianz geringer wird. In der Regel sind die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) ausreichend, um den Großteil der Gesamtvarianz zu erklären.

2.2.4.3.2 tSNE

Bei der Methode tSNE (t-distributed stochastic neighbor embedding)⁵⁹ handelt es sich um einen nichtlinearen Dimensionsreduktions-Algorithmus, der Muster basierend auf der Ähnlichkeit von Merkmalen verschiedener Datenpunkte findet. Die Ähnlichkeit von Punkten wird als Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der ein Punkt A Punkt B als seinen Nachbarn wählen würde. In der Originalpublikation von van der Maaten und Hinton heißt es genauer:

“The similarity of datapoint x_j to datapoint x_i is the conditional probability p_{ji} , that x_i would pick x_j as its neighbor if neighbors were picked in proportion to their probability density under a Gaussian centered at x_j .”⁵⁹

Der tSNE-Algorithmus bildet also zunächst eine Gauß'sche Wahrscheinlichkeitsverteilung für Punktpaare, wobei ähnlichen Punkten eine höhere Wahrscheinlichkeit zugewiesen wird als unähnlichen Punkten. Als Ähnlichkeitsmetrik wird hier klassischerweise die euklidische Distanz verwendet,

es sind aber auch andere Metriken möglich. Im nächsten Schritt wird die gleiche Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Punkte im niedrigdimensionalen Raum angewandt. Abschließend wird versucht, die Kullback-Leibler-Divergenz (als Maß für die Unterschiedlichkeit zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen) zwischen den beiden Wahrscheinlichkeitsverteilungen zu minimieren, indem die Punkte in entsprechenden Positionen im niedrigdimensionalen Raum angeordnet werden⁵⁹.

2.2.4.3.3 UMAP

Der UMAP (uniform manifold approximation and projection)-Algorithmus ist ebenfalls eine nichtlineare Dimensionreduktions-Technik, die visuell ähnlich dem tSNE-Algorithmus, aber signifikant schneller ist⁶⁰. Der UMAP-Algorithmus basiert auf drei Annahmen über die zu analysierenden Daten: 1) Die Daten sind gleichmäßig in einem Riemannschen Raum verteilt. 2) Die Riemannsche Metrik ist lokal konstant (oder kann als solche angenähert werden). 3) Der Riemannsche Raum ist lokal verbunden⁶¹. Gegenüber tSNE hat UMAP außerdem den Vorteil, dass in der finalen Projektion die globale Datenstruktur besser erhalten bleibt und damit die Beziehungen zwischen Clustern bedeutsamer sind als in einer tSNE-Projektion.

2.2.5 Bioinformatische Tools und Methoden zur hochdimensionalen Auswertung von Raman-Daten

Die derzeitige Analyse von Daten aus der Raman-Spektroskopie beginnt i.d.R. mit der Darstellung einer True Component Analyse (TCA). Die TCA basiert auf nicht-negativer Matrixfaktorisierung und definiert ähnliche Spektren als dieselbe Komponente, die dann als farbkodierte Intensitäts-Heatmap dargestellt werden⁵⁷. Im Anschluss werden durch ein Intensitäts-Thresholding Pixel ausgewählt, mit denen dann eine PCA wie oben beschrieben durchgeführt wird.

Bioinformatische Tools zur integrativen, multiparametrischen oder hochdimensionalen Auswertung von Daten der Raman-Spektroskopie gibt es derzeit nicht. Oft sind die Analyse-Möglichkeiten auf die angebotenen Analyse-Tools proprietärer Hersteller-Software limitiert, die die hochaktuellen Analysealgorithmen (noch) nicht integriert haben.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit Wert gelegt auf den Gebrauch einer Software-Lösung, die sich durch Interoperabilität, Kompatibilität und Quelloffenheit von bisherigen Raman-Analysertools abhebt und zugleich die Durchführung hochdimensionaler, multiparametrischer Analysen ermöglicht. Außerdem werden in dieser Arbeit Auswertemethoden vorgestellt, die die räumliche Auflösung von Raman-Scans effektiv nutzen.

Diesen Anforderungen gerecht wird die Open-Source-Software RStudio⁶², eine integrierte Entwicklungsumgebung für die Statistik-Programmiersprache R. Als quelloffenes System können weltweit WissenschaftlerInnen und EntwicklerInnen Analysetools in R schreiben, die dann in Form von „Packages“ (englisch für Pakete) in die Software-Umgebung geladen werden können und in den eigenen Code eingebunden werden können.

Im Falle dieser Arbeit wurden etablierte, weit verbreitete Packages verwendet, die ursprünglich für Einzelzellanalysen (engl. „Single-Cell-Analyses“), insbesondere Single-Cell-Transcriptomics entwickelt wurden. Diese Packages wurden für die Anwendung auf Raman-Spektrometrie-Daten umgeschrieben, um

eine „unbiased“ (englisch für unverfälscht) Analyse der hochdimensionalen Raman-Daten zu ermöglichen.

Die Idee hinter dieser Translation ist die Folgende: Einzellzellanalysen basieren auf Informationen über Gene bzw. Transkripte und deren Anzahl – Raman-Spektroskopie basiert auf Informationen über Wellenzahlen des Raman Shifts sowie deren korrespondierende Intensität als Maß für die Anzahl der gemessenen Photonen (Tab. 1). Folglich können Raman-Daten theoretisch 1:1 übersetzt werden, bedürfen aber verständlicherweise einer etwas anderen Interpretation.

Tab. 2: Direkte Gegenüberstellung der analysierten Daten bei Einzellzell-Untersuchungen und Raman „Spectromics“

Einzellzell-Transcriptomics	Raman „Spectromics“
Gene/Transkripte	Raman Wellenzahlen
Anzahl an Transkripten	Intensität bzw. Anzahl an gemessenen Photonen
einzelne Zellen	einzelne Pixel

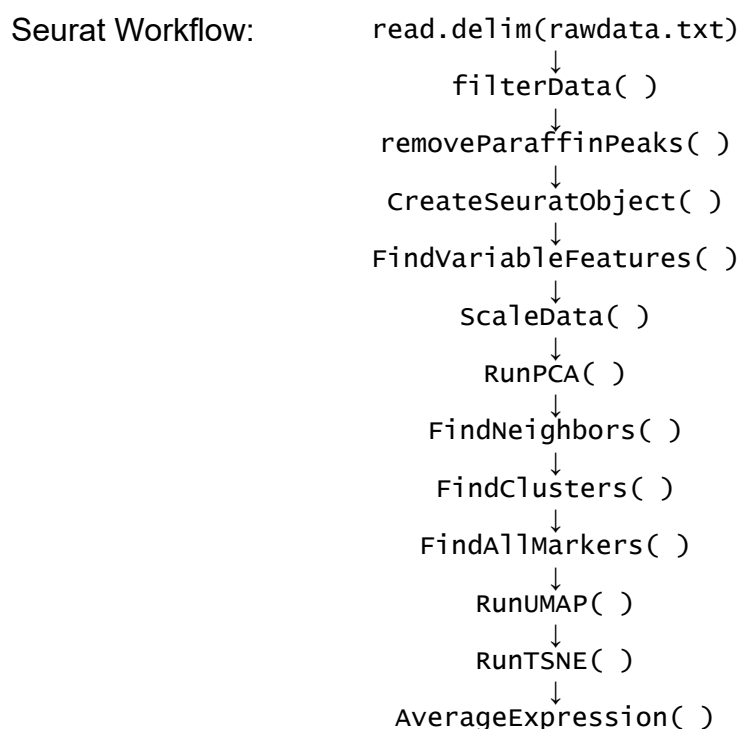
Im Folgenden soll auf die technischen bzw. bioinformatischen Details der angewandten Tools und deren übertragene Bedeutung im Kontext von Raman-Spektroskopie-Daten eingegangen werden.

2.2.5.1 Seurat

Seurat ist ein R Package, das für die Qualitätskontrolle, Analyse und Exploration von Einzellzell-RNA-Sequencing-(scRNA-seq)-Daten designt wurde⁶³. Darüber hinaus erlaubt es die Integration multipler Datentypen mit verschiedenen Technologien, um die Quellen der Heterogenität von Einzelzellanalysen zu identifizieren und zu interpretieren^{64,65}. Statt scRNA-seq-Daten wurden in dieser Arbeit Daten der Raman-Spektroskopie in den Seurat-Workflow eingepflegt. Im ersten Schritt wurde zunächst eine Qualitätskontrolle der Daten durchgeführt,

dann exploriert, wie die Daten beschaffen sind und sich ähnliche Spektren zu Clustern zusammenfassen lassen und schließlich eine umfassende Analyse des Datensatzes durchgeführt. Die Resultate der Analyse sind im Ergebnisteil dieser Arbeit zu finden.

Programmatisch wurde der folgende Workflow für die Analyse mittels Seurat verwendet. Er orientiert sich an den Instruktionen der Seurat-Vignette unter <https://satijalab.org/seurat/index.html>.



2.2.5.2 BayesSpace

Das R Package BayesSpace wurde zur Analyse von Spatial Transcriptomics, also räumlich aufgelösten Transkriptom-Analysen, entwickelt. Die Modellbasierte Clustering-Methode verwendet ein t-verteilttes Fehlermodell, um räumliche Cluster zu identifizieren⁶⁶. Dadurch ist dieses Modell besonders robust gegenüber Artefakten, wie Ausreißern im Dataset und Signalrauschen. BayesSpace implementiert dazu ein volles Bayesianisches Modell mit einem

Markov-Zufallsfeld, das die Hypothese aufstellt, dass Pixel, die zum selben Zelltyp oder Gewebe gehören, näher beieinander liegen sollten⁶⁶. Derzeit ist BayesSpace einer der besten Algorithmen für räumliches Clustering^{66,67}. Für die Cluster-Analyse wurde die Anzahl an Clustern am Wendepunkt der negativen Pseudo-Log-Wahrscheinlichkeitskurve bestimmt.

Der programmatische Workflow orientiert sich an den Instruktionen der BayesSpace-Vignette unter <https://edward130603.github.io/BayesSpace>.

BayesSpace Workflow:



2.2.5.3 Monocle

Monocle ist ein R Package, das Pseudotime-Analysen von Einzelzellen ermöglicht. Die Pseudozeit ist eine fiktive Maßeinheit für den Progress, den eine einzelne Zelle durch Zelldifferenzierung, Aktivierung, Teilung oder Alterung durchmacht⁶⁸. Diese Prozesse liegen Veränderungen in der Genexpression zugrunde. So kann es vorkommen, dass zwei Zellen desselben Zelltyps ein unterschiedliches Genrepertoire aufweisen, weil beispielsweise die eine Zelle sich gerade differenziert und die andere gerade apoptotisch ist.

Die Idee hinter der Übertragung dieser Methode auf die Raman-Spektroskopie besteht darin, die Heterogenität und Homogenität von Geweben sowie die räumliche Korrelation der „Pseudotime Trajectories“ (englisch für Pseudozeit-Entwicklungsbahn, s.u.) aufzudecken. Anstatt Zellen mit Genexpressions-Veränderungen entlang einer Zeitachse zu ordnen, war hier die Idee, Pixel mit Raman-Spektren entlang einer Achse zu ordnen und diese Anordnung durch Veränderungen der Peak-Intensitäten verschiedenster Wellenzahlen bestimmen zu lassen. Erwartet wurde, dass Pixel mit ähnlichen Spektren nahe beieinander platziert werden und kontinuierliche Veränderungen einzelner Peaks dazu führen, dass diese Pixel entlang der Pseudotime Trajectory wandern. Kann keine kontinuierliche Veränderung der Pixel mehr gefunden werden oder Pixel aufgrund andersartiger Peak-Intensitätsveränderungen nicht mehr entlang der Haupt-Trajectory angeordnet werden, so bildet sich aus der geraden Entwicklungsbahn eine Abzweigung. Eine "verzweigte" Trajectory kann dann als spektrale Heterogenität der analysierten Pixel interpretiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde von Monocle der Algorithmus „DDRTree“ („discriminative dimensionality reduction tree“) verwendet, mit dem die Abfolge verschiedener Peak-Intensitätsveränderungen gelernt und entlang der Trajectory angeordnet werden kann.

Der programmatische Workflow orientiert sich an den Instruktionen der Monocle-Vignette unter <http://cole-trapnell-lab.github.io/monocle-release/>.

Monocle2 Workflow:

```

as.CellDataSet(SeuratObject)
  ↓
estimateSizeFactors( )
  ↓
reduceDimensions(...,method = "DDRTree")
  ↓
orderCells( )
  ↓
plot_cell_trajectory( )

```

Monocle3 Workflow:

```

as.cell_data_set(SeuratObject)
  ↓
cluster_cells( )
  ↓
learn_graph( )
  ↓
plot_cells( )

```

2.2.5.4 Spatial trajectories

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zur effektiven Nutzung der räumlichen Distribution von Raman-Spektren zu etablieren und anzuwenden.

Daher wurden „spatial trajectories“ (englisch für räumliche Verlaufskurven) entwickelt. Dabei handelt es sich um Pfade, die in der zweidimensionalen Ebene beliebig verlaufen und auf diesem Weg in Pathologien vordringen können. So kann beispielsweise eine spatial trajectory auf ein fibrotisches Areal zulaufen, oder vom gesunden Gewebe über eine Tumorgrenze in den eigentlichen Tumor. Von Interesse sind nun die Intensitätsveränderungen, die auf diesem Weg durchlaufen werden. Dazu werden aus der gesamten Datenmatrix alle Pixel herausgefiltert, die durchlaufen werden und in die korrekte Reihenfolge gebracht. Es können nun selektiv bestimmte Peaks und deren Intensitätsshift entlang der trajectory untersucht werden, oder auch das gesamte Spektrum. Für letzteres bietet sich die Darstellung als Heatmap an.

Je nachdem wie heterogen das Gewebe ist, können die Intensitätsshifts eine stärkere oder geringere Dynamik aufweisen, d.h. stark geschwungen oder annähernd konstant verlaufen. Die Quantifizierung dieser Dynamiken erfolgte über zwei Herangehensweisen: Zum einen wurde die maximale Differenz zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert der lokalen polynomialen Regressionsanpassungskurve („local polynomial regression fitting curve“, loess) berechnet. Da durch diese Berechnung jedoch die Dynamiken innerhalb des Kurvenverlaufs nicht berücksichtigen kann, wurde zusätzlich die erste Ableitung der loess-Kurve berechnet und der prozentuale Anteil an Kurvenpunkten berechnet, deren Wert größer als der Betrag von 0,4 ist. Statistische Signifikanz wurde anschließend mit einem zweiseitigen, gepaarten Welch t -Test berechnet.

2.2.5.5 Multimodale und integrative Analyse von MALDI- und Raman-Spektroskopie-Daten

Zur genaueren Untersuchung der räumlichen Verteilung von Stoffwechselmetaboliten führten wir gekoppelte MALDI („matrix-assisted laser desorption ionization“, englisch für Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung)- und Raman-Messungen an benachbarten Schnitten durch. Die MALDI-Messungen wurden durch einen Kooperationspartner (Prof. Axel Walch, Helmholtz-Institut München) mit einer Auflösung von 50 µm vorgenommen und die normalisierten Daten als imzML-Datei für weitere Auswertungen zur Verfügung gestellt. Die imzML-Dateien wurden durch das R Package Cardinal in R geladen und in den Seurat Workflow eingespeist. Zur Koregistrierung räumlich übereinanderliegender Messpunkte aus Raman- und MALDI-Messung wurde eine eigene affine Transformationsmethodik angewandt. Hierzu wurden beide Scanbilder bzw. die HE-Färbungen räumlich aufeinander ausgerichtet und der Rotationswinkel, Skalierungsfaktor sowie x/y-Translation definiert. Auf diese Weise konnten korrespondierende Messpunkte automatisch definiert werden.

Die Datensätze korrespondierender Datenpunkte wurden zunächst separat in Seurat eingespeist und der oben beschriebene Workflow durchlaufen. Nach getrennter Betrachtung erfolgte dann die integrative, multimodale Analyse beider Datensätze als `weightest nearest neighbor analysis` (engl. für gewichtete Nächster-Nachbar-Analyse). Die hieraus detektierten Cluster wurden wieder nach ihrer räumlichen Repräsentation geordnet und mit den HE-Färbungen derselben Region verglichen. Die MALDI- bzw. Raman-Peaks in der Infarkt-Randregionen und gesunde „Remote“-Regionen, die durch die Cluster-Analyse identifiziert wurden, konnten dann durch eine Volcano-Plot-Analyse verglichen und statistisch ausgewertet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion reproduzierbarer kardialer Pathologien im Mausversuch

Um kardiale Pathologien möglichst zuverlässig untersuchen zu können, wurden zwei robuste und weit verbreitete Tiermodelle angewandt, die eine hohe Reproduzierbarkeit und Validität versprechen.

Zur Untersuchung des akuten Myokardschadens wurde ein etabliertes Ischämie-Reperusionsmodell des murinen Herzens verwendet, bei dem der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD, left anterior descending coronary artery) transient ligiert und anschließend wieder eröffnet wird. 24 Stunden nach der Operation wurden die Tiere dann getötet und die Herzen zur Untersuchung entnommen.

Zur vergleichenden Untersuchung des chronischen Myokardschadens wurde das Modell der kontinuierlichen Gabe von Ang II durch eine implantierte osmotische Pumpe in *ApoE*-defiziente Mäuse gewählt, wodurch sich über einen Zeitraum von 28 Tagen, im Rahmen des kardialen Remodelings, Fibrose und Hypertrophie entwickeln.

Das Modell des akuten Myokardschadens diente zur Exploration infiltratorischer Immunzellen und des inflammatorischen Mikromilieus. Im Modell der chronischen Myokardschädigung wurde der Fokus der Untersuchung auf das sich umbauende („remodeling“) Myokard gelegt.

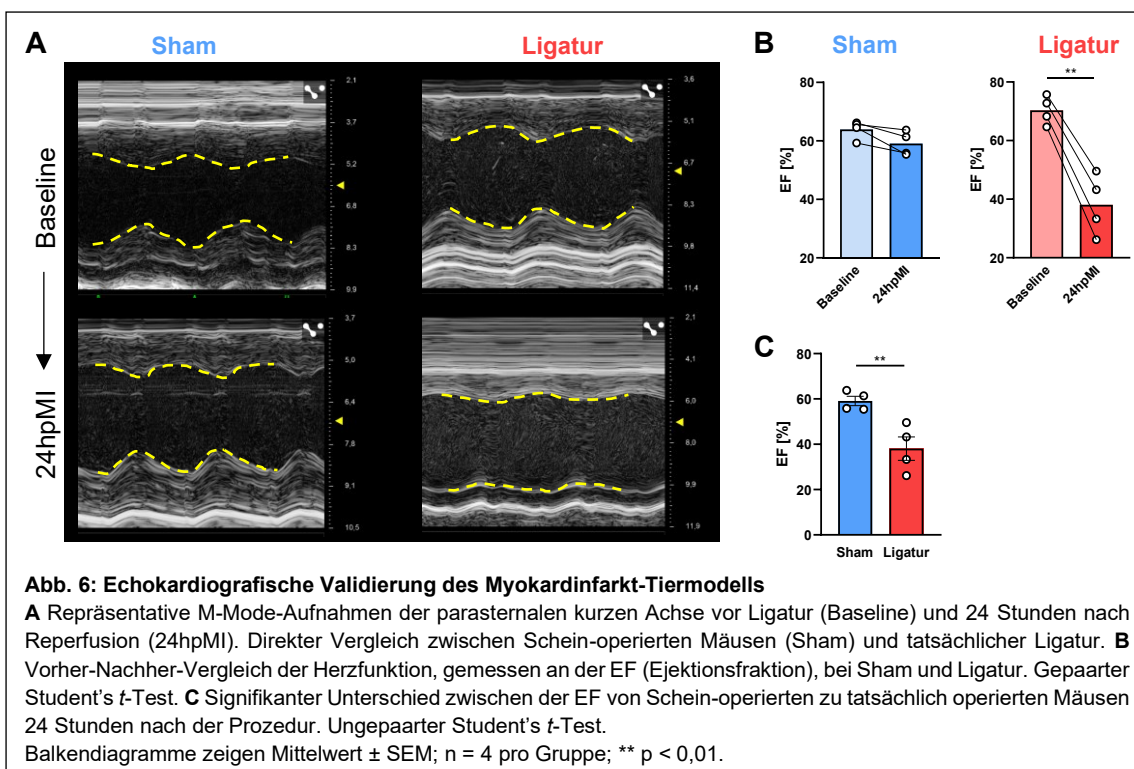
Um den Effekt der experimentell induzierten Pathologien valide zu untersuchen, wurden beide Tiermodelle durch jeweils eine Kontrollgruppe kontrolliert: Beim Infarkt-Modell entspricht dies einer Schein-OP (Sham Operation, siehe Methoden), beim Hypertensions-Modell erfolgte die Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Natriumchlorid, NaCl) statt Ang II durch die osmotische Pumpe. Beide Modelle wurden mit einer Gruppengröße von $n = 4$ untersucht.

Auf die Ergebnisse der Validierungsstudie wird im Folgenden eingegangen.

3.1.1 Validierung der kardialen Pathologien *in vivo*

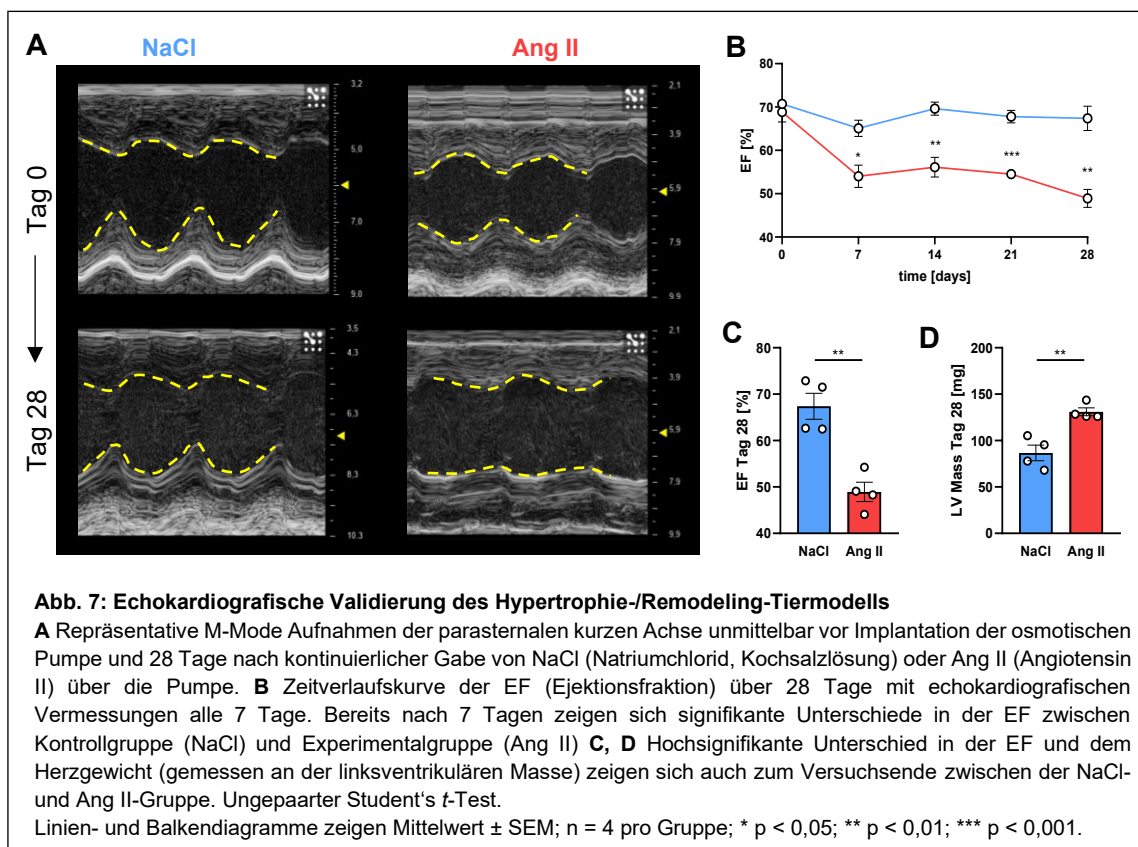
Um den Effekt der induzierten Pathologien auf die Herzfunktion zu verifizieren, wurden echokardiografische Aufnahmen des schlagenden Herzens der sedierten Mäuse aufgenommen.

Im Infarkt-Modell erfolgten dabei die Aufnahmen unmittelbar vor der Operation (Baseline) und 24 Stunden nach der Ligatur. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Ejektionsfraktion (EF, „Ejection Fraction“) zwischen Baseline (also vor OP) und 24hpMI (24 Stunden post Myokardinfarkt) (Abb. 6B). Dagegen trat bei den Schein-operierten Mäusen keine signifikante Reduktion der Herzfunktion auf. Insgesamt zeigte sich nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied der EF zwischen den Schein-operierten Mäusen (Sham) und denen mit einer tatsächlichen Ligatur der LAD (Abb. 6C), sodass in Bezug auf die Herzfunktion das Modell echokardiografisch validiert werden konnte.



Im Hypertrophie-Modell wurde die Herzfunktion in einwöchigem Abstand über 28 Tage untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Herzkontraktilität, gemessen an der EF (Abb. 7B, C). Als weiterer Parameter

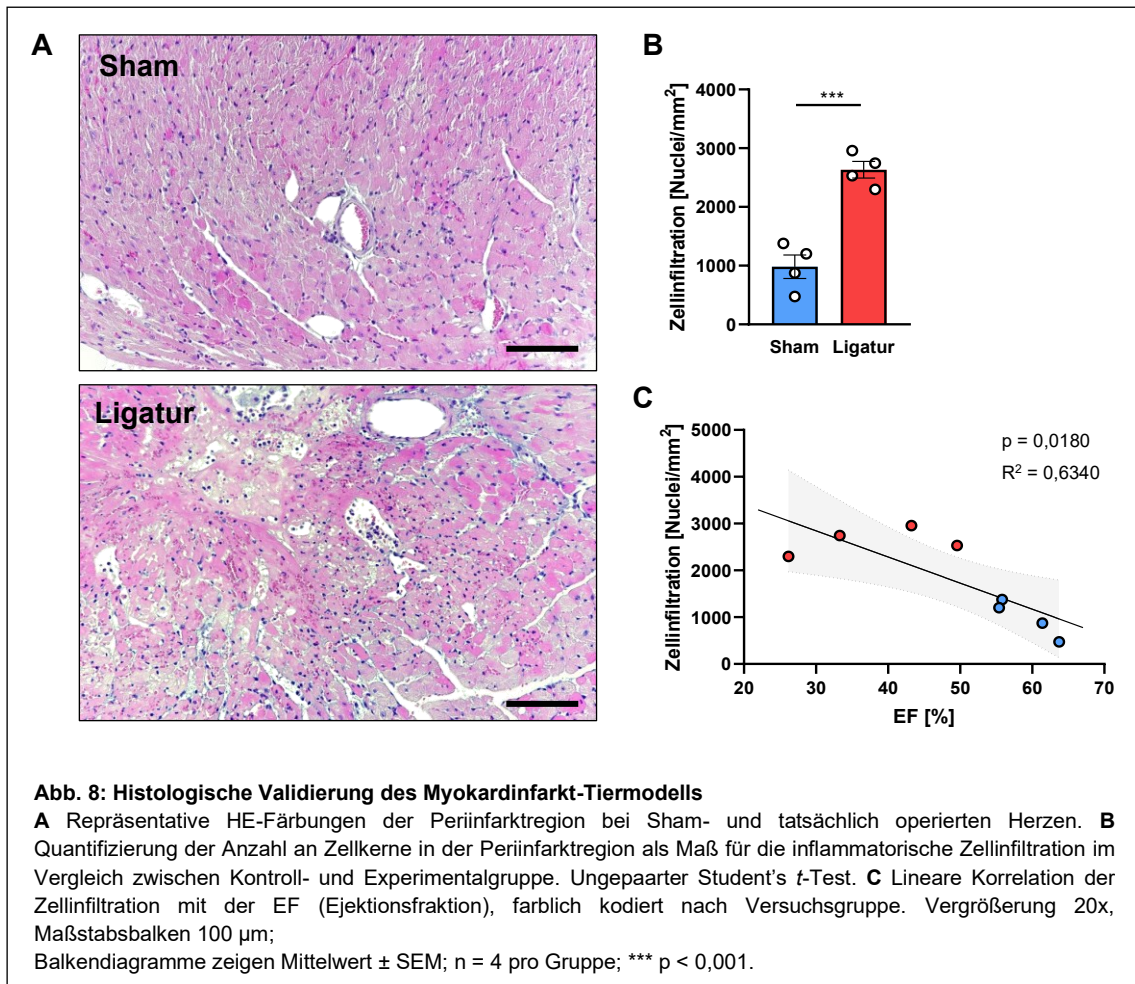
wurde echokardiographisch die linksventrikuläre Masse (LV Mass, „left ventricular mass“) bestimmt, als Marker für kardiale Hypertrophie. Auch hier zeigte sich nach 28 Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen der Interventionsgruppe (Ang II in osmotischer Pumpe) und der Kontrollgruppe (NaCl in osmotischer Pumpe). Insgesamt spricht der signifikante Unterschied der EF und der linksventrikulären Masse am Tag 28 zwischen Intervention- und Kontrollgruppe für die Validität der induzierten Pathologien.



3.1.2 Validierung der kardialen Pathologien *ex vivo*

Im nächsten Schritt wurden die induzierten Pathologien auch auf histologischer Ebene validiert. Beim akuten Infarkt wurde hierzu die Periinfarktregion untersucht, bei der 24h nach Ischämie und anschließender Reperfusion zahlreiche Entzündungszellen einwandern. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl an Zellkernen der Periinfarktregion automatisiert gezählt und mit der der Scheinoperierten Mäuse verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit deutlich mehr inflammatorischen Zellen in den Infarktmäusen (Abb. 8B). Des

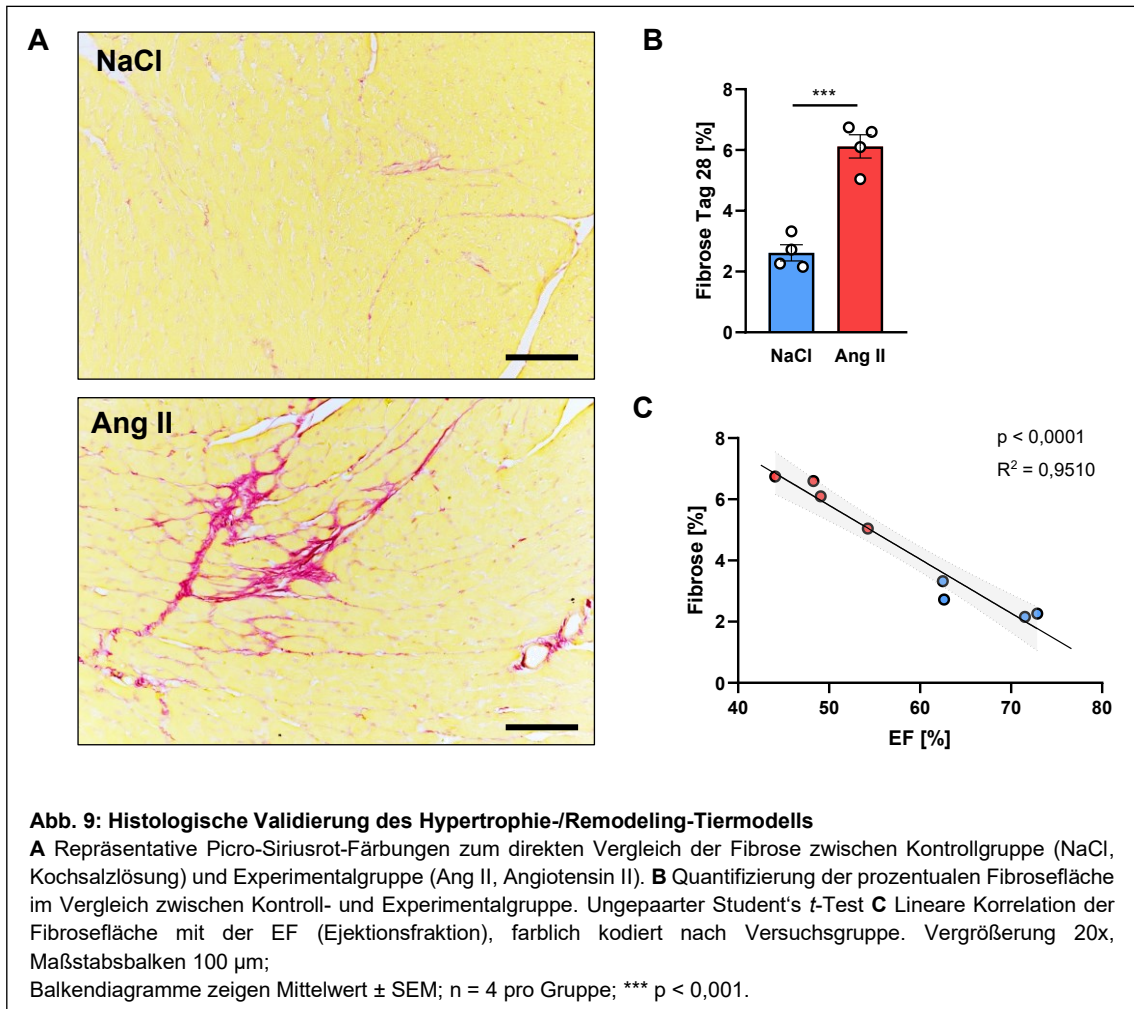
Weiteren unterstreicht die gute Korrelation ($p = 0,0180$ und $R^2 = 0,6340$ bei $n = 4$) zwischen der echokardiografisch gemessenen EF und dem histologisch bestimmten Maß an Zellinfiltration die Validität der experimentell induzierten Pathologie (Abb. 8C).



Für das chronische Hypertrophie-Modell wurde die Fibrosierung des gesamten histologischen Schnittes als Untersuchungsparameter herangezogen. Es zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied der prozentualen Fibrosefläche zwischen Kontroll- und Interventionstieren nach 28 Tagen.

Abschließend wurden auch in diesem Tiermodell die *in vivo*-Analysen mit den *ex vivo*-Untersuchungen korreliert. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Herzfunktion (gemessen an der EF) und histologisch sichtbarem Remodeling (in Form von Fibrose) nach experimenteller Induktion

(Abb. 9B). Auch die direkte Korrelation zwischen EF und Fibrosefläche erwies sich als hochsignifikant und mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,95.



3.2 Translation bioinformatischer Analysetools auf Raman-Spektroskopie

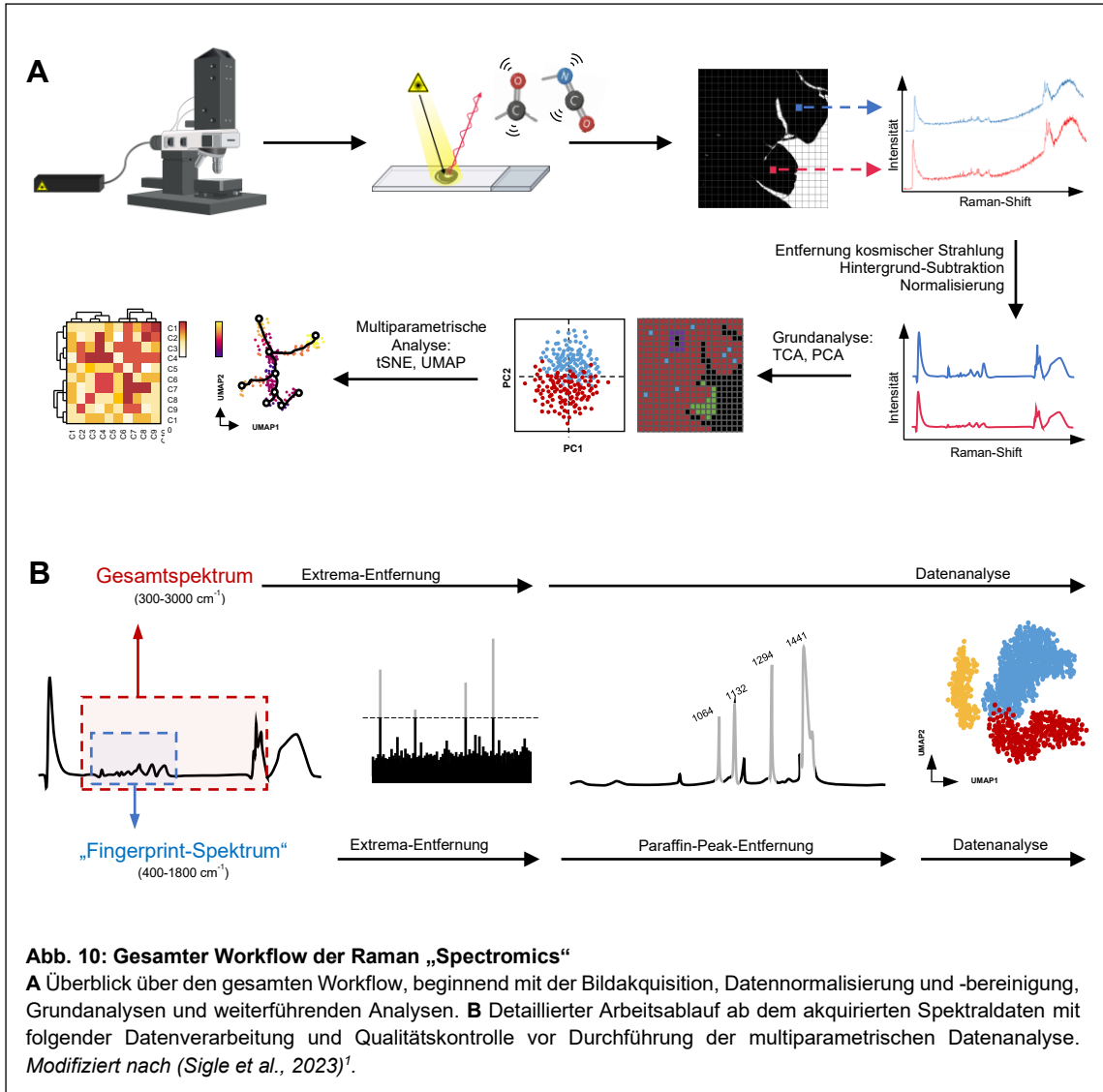
Nachdem die Auswirkung der induzierten Pathologien auf Funktion und Struktur der murinen Herzen validiert wurde, konnten diese für die Analyse mittels Raman-Spektroskopie weiterverwendet werden.

3.2.1 Analyse-Workflow

Zu Beginn des Arbeitsablaufs wurden die entparaffinierten Schnitte in zuvor festgelegten Bereichen mit einem konfokalen Raman Mikrospektroskop (alpha300 R, Witec) gescannt. Dabei wurden die Scans mit einer Auflösung von $1\mu\text{m}/\text{px}$ über eine Fläche von $250 \times 250 \mu\text{m}$ aufgenommen. Aus jedem Pixel wurde anschließend das entsprechende Raman-Spektrum extrahiert und weiter analysiert. Insgesamt konnten auf diese Weise über 43 Millionen Datenpunkte für eine Scan-Region generiert werden.

Im ersten Arbeitsschritt mussten die Spektren für die weitere Datenanalyse aufbereitet werden (Abb. 10A). Die angewandten Methoden zur Datenpräprozessierung sind im Methodenteil dieser Arbeit zu finden.

Zu Etablierungszwecken wurde nun im nächsten Schritt vergleichend das Gesamtspektrum und das „Fingerprint-Spektrum“ betrachtet, die ebenfalls zuvor im Methodenteil definiert wurden (Abb. 10B). Für beide Spektren wurden die durch technische Artefakte bedingten Extremwerte entfernt, sowie im Falle des „Fingerprint-Spektrums“ dieses zusätzlich von charakteristischen Paraffin-Peaks bereinigt. Diese treten bei Paraffin-fixierten Schnitten unweigerlich auf und stellen durch ihre hohen Intensitätswerte Störfaktoren für die weitere Analyse dar. Aus diesem Grund wurden die bereits in der Literatur vorbeschriebenen Paraffin-Peaks bei den Wellenzahlen 1064 , 1132 , 1294 and 1441 cm^{-1} aus dem Datensatz entfernt⁴³.

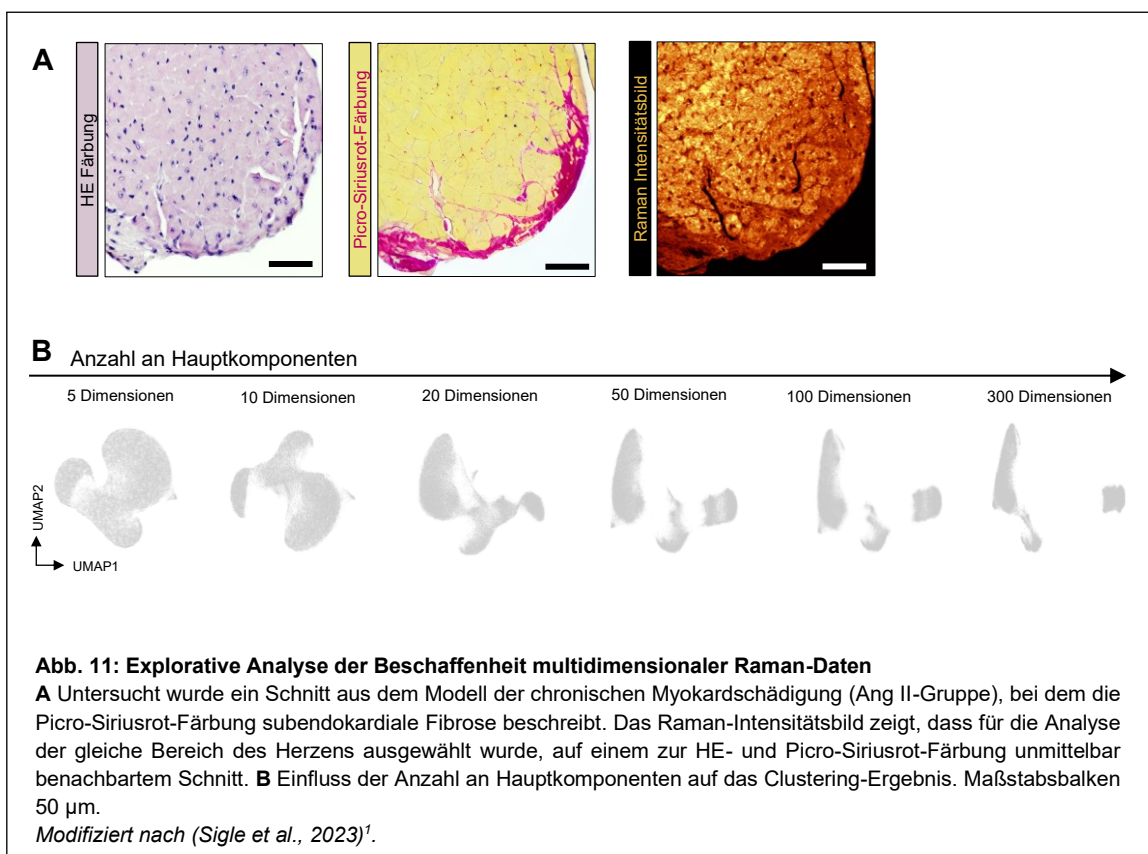


3.2.2 Cluster Analyse von Raman-Daten ohne Integration räumlicher Zusammenhänge („spatially-unaware“)

Zur Untersuchung der Beschaffenheit der hochdimensionalen Raman-Daten wurden zunächst die akquirierten Spektren eines histologischen Schnittes mit subendokardialer Fibrose aus dem Modell des chronischen Myokardschadens analysiert (Abb. 11A). Dazu wurden bioinformatische Tools angewandt, die eigentlich zur Auswertung von Einzellzellanalysen („single cell genomics“) entwickelt, aber im Rahmen dieser Arbeit auf die Anwendung von Raman-Daten umgewidmet wurden (siehe Methoden).

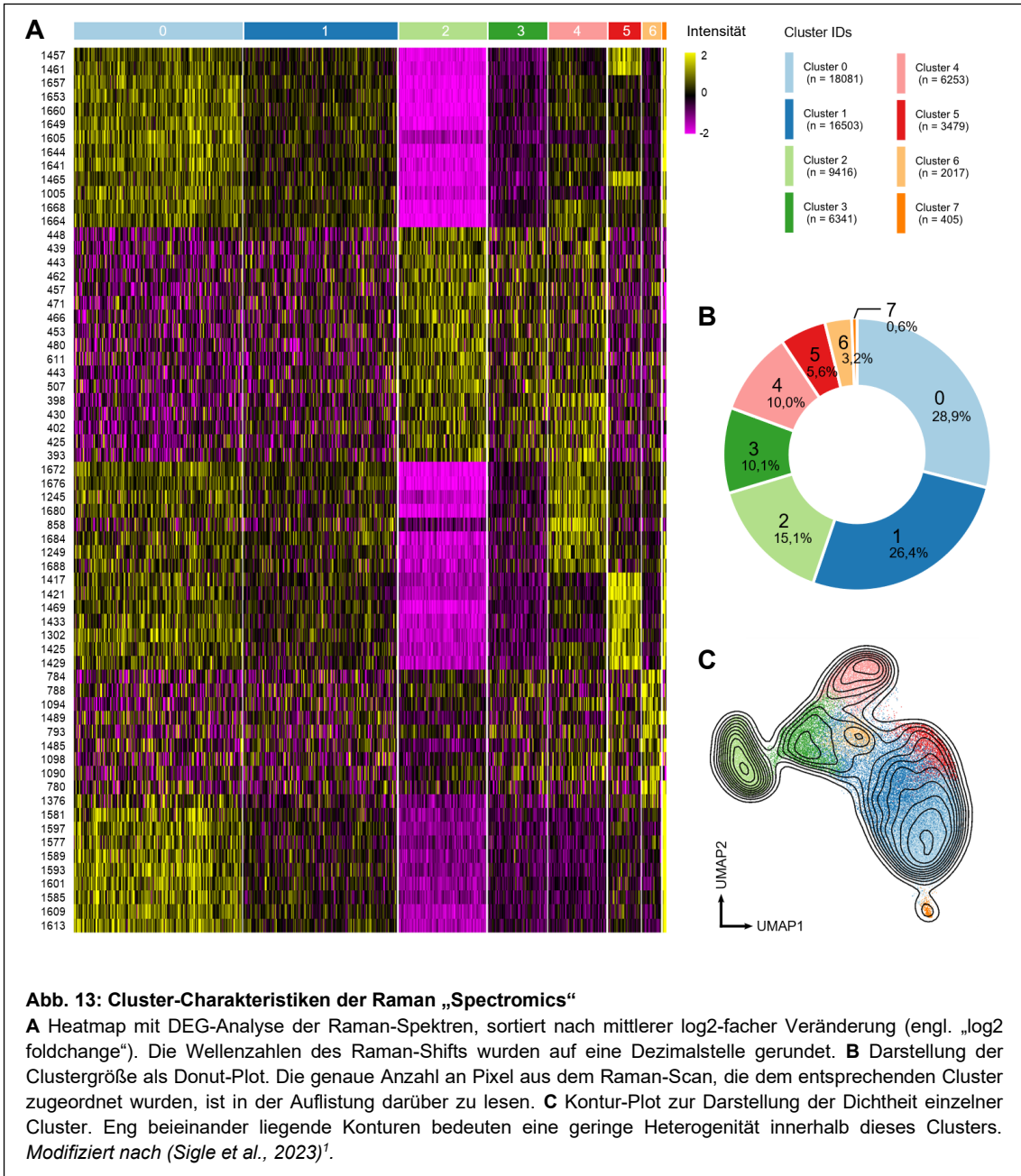
Als erste explorative Analyse wurden die akquirierten Raman-Spektren in den Workflow von Seurat (siehe Kapitel 2.2.4.1) integriert und in UMAP-Projektion mit unterschiedlicher Anzahl an analysierten Hauptkomponenten dargestellt (Abb. 11B). Es zeigte sich eine distinkte Segregation analysierter Pixel, bzw. die innerhalb diesem Pixel gemessenen Spektren, in verschiedene Cluster. Das Clustering entsteht durch Ähnlichkeit einzelner Spektren, wenn diese derselben kardialen Komponente und damit molekularen Komposition entspringen. Solche Komponenten können z.B. Fibrosebereiche sein, oder Gefäße, Myokard oder auch bestimmte Zellen und einzelne Biomoleküle. Welchen genauen Strukturen die Cluster zuzuordnen sind, war in diesem ungerichteten Ansatz („untargeted approach“) zunächst nachrangig und sollte im weiteren Verlauf der Analysen aufgeschlüsselt werden.

Die Segregation der Spektren in Cluster zeigte eine Abhängigkeit von der Anzahl an reduzierten Hauptkomponenten: Mit zunehmender Anzahl an Dimensionen erscheinen die entstandenen Cluster kompakter und liegen weiter auseinander (Abb. 11B).



Im nächsten Schritt galt es zu untersuchen, ob die gefundenen Cluster aufgrund ihrer charakteristischen Spektren kardialen Strukturen oder Kompartimente zugeordnet werden können. Zu diesem Zweck wurde eine „differentially expressed genes“-Analyse (DEG-Analyse) angewandt, die bei Single-Cell-Analysen zur Identifizierung von quantitativen Unterschieden in Expressionslevel bestimmter Gene zwischen verschiedenen Clustern oder Versuchsgruppen verwendet wird. Übersetzt auf Raman-Daten bedeutet dies, dass mittels DEG-Analyse die Raman-Peaks detektiert werden können, die sich am stärksten zwischen den entstandenen Clustern unterscheiden (Abb. 13A). In Zusammenschau mit den Cluster-spezifischen Durchschnittsspektren (Abb. 12B) zeigte sich, dass Cluster 0 und 1 Peaks bei den Wellenzahlen 1005, 1457 und 1640-1668 cm^{-1} aufwiesen, die typischerweise in Myokard gefunden werden^{48,69}. Cluster 2 konnte als Areal mit charakteristischen Glass-Peaks identifiziert werden, bei dem kein Gewebe den Objektträger bedeckte. Cluster 3 zeigte ähnliche Peaks wie Cluster 4, aber mit insgesamt geringerer Intensität und geringeren Unterschieden in relativen Peak-Verhältnissen. Cluster 4 ist Kollagen zuzuordnen, mit charakteristischen Peaks bei 858, 940, 1249 und 1680 cm^{-1} ^{36,70}. Cluster 5 zeigte uneindeutige Peaks bei 889, 1056, 1302 und 1416 cm^{-1} , die potenziell durch spektrale Artefakte (z.B. Paraffin-Bereinigung) bedingt wurden. Cluster 6 wiederum demonstrierte mit Peaks bei den Wellenzahlen 784, 1096, 1376 und 1580 cm^{-1} typische spektrale Eigenschaften von Nukleinsäuren^{36,71,72}. Cluster 7 wies die stärksten Peak-Intensitäten auf, insbesondere in den Regionen zwischen 1200 und 1700 cm^{-1} mit starken Peaks bei 1123, 1343, 1401, 1605 and 1637 cm^{-1} . Diese Peaks sind charakteristisch für das Porphyrin bzw. Häm in Erythrozyten^{36,38}.

Folglich konnte durch die post-hoc-Analyse von Clustern, die durch einen unsupervidiert Workflow für Transkriptom-Analysen gefunden wurden, biologische Kompartimente in einer histologischen Probe identifiziert werden und charakteristische spektrale Unterschiede visualisiert werden. Darüber hinaus konnten technische Artefakte durch spezifische Zuweisung zu einem Cluster aus den sonstigen Spektren extrahiert werden.



Um den relativen Beitrag der verschiedenen detektierten Cluster an der Gesamtprobe zu visualisieren, wurde die Clustergröße als Donut-Plot (Abb. 13B) visualisiert, in dem die Anzahl an Pixeln, die dem entsprechenden Cluster zugeordnet wurden, visualisiert wurden. Die Kompaktheit einzelner Cluster und damit die Homogenität der Pixel-Spektren innerhalb eines Clusters wurde mittels eines Kontur-Plots grafisch veranschaulicht (Abb. 13C) und soll an späterer Stelle genauer untersucht werden.

Bisher wurde die räumliche Information, die mit jedem Pixel bzw. dessen Spektrum verknüpft ist, außen vorgelassen und die Pixel losgelöst von ihrem räumlichen Kontext betrachtet. Daher wurden im nächsten Schritt Cluster-spezifische Peaks aus der DEG-Analyse genutzt und deren Intensitätsverteilung in UMAP-Projektion und in räumlich korrekt angeordneten Pixeln dargestellt (Abb. 14). Die Intensitätsverteilungen von Peaks charakteristisch für Cluster 0, 2, 4 und 7 wurden mittels DEG-Analyse (Abb. 13A) und Durchschnittsspektren (Abb. 12B) ausgewählt. Die exemplarischen Peaks bei 1457, 480, 858 und 1605 cm^{-1} wurden verwendet, um Myokard, Glass, Kollagen und infiltrierte zu identifizieren. Dabei konnte nun sowohl die räumliche Verteilung als auch die molekularen Zuweisungen zu den Peaks mit Amid II-Bande und C-C Vibration von Proteinen, Glas, Hydroxyprolin von Kollagen und Hämin aus Erythrozyten zur Interpretation herangezogen werden.

Bei solchen univariaten Spektralanalysen muss bedacht werden, dass bei Spektraldaten – anders als bei transkriptomischen Analysen – die Unterschiede zwischen Clustern durch eine Vielzahl kleinerer Intensitätsunterschiede entstehen und es oft nicht einen einzelnen charakteristischen Peak gibt. Stattdessen weisen Raman-Spektren natürlicherweise Redundanzen auf (im Sinne von teilweise übereinstimmenden Peaks trotz unterschiedlicher Biomaterialien), wenn sie ein gleiches molekulares Grundgerüst aufweisen. Diese Tatsache war bereits in der DEG-Analyse zu sehen (Abb. 13A).

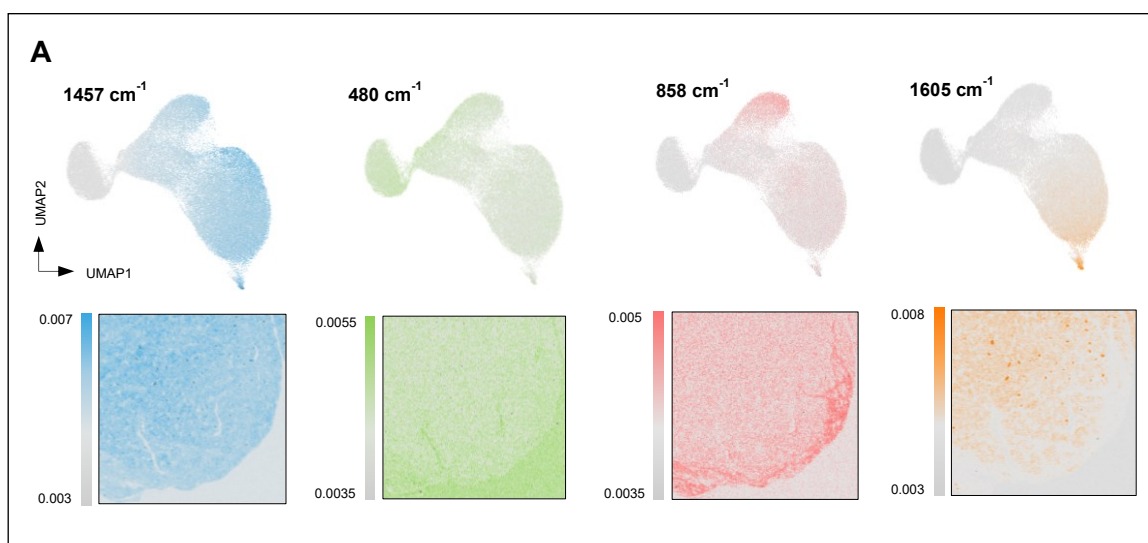


Abb. 14: Intensitätsprojektionen zur räumlichen Entschlüsselung von entdeckten Clustern

UMAP-Projektion aller Pixel bzw. entsprechender Spektren aus dem obigen Scan mit korrespondierenden Intensitäten der aufgeführten Raman Shifts, farbcodiert mit der Clusterfarbe aus obiger Analyse. Unten: Raman-Intensitätsbild, bei dem die obigen Pixel in ihrer richtigen räumlichen Beziehung zueinander angeordnet sind, ebenfalls mit farbcodierter Intensität des spezifischen Raman Shifts.

Modifiziert nach (Sigle et al., 2023)¹.

Im finalen Schritt der Voranalyse wurden alle Pixel des Raman Scans in der entsprechenden Clusterfarbe koloriert. Obwohl in die Analyse, die zu den besagten Clustern geführt hat, keinerlei Information über die räumliche Beziehung einzelner Pixel zueinander eingeflossen sind, zeigte sich eine deutliche räumliche Kompartimentierung des Bildes, mit starken Ähnlichkeiten zur HE- und Picro-Siriusrot-Färbung (Abb. 15A).

Das Ergebnis der unsupervidierten Cluster-Analyse wurde abschließend manuell verifiziert und die einzelnen Cluster der zugrundeliegenden kardialen Struktur zugewiesen. Diese Zuordnung wurde mittels „Sankey-Plot“ visualisiert (Abb. 15B). Die Grundwahrheit („ground truth“) des kardialen Biomaterials (Abb. 15C) wurde auf Grundlage der räumlichen Anordnung sowie der Cluster-spezifischen und Material-charakteristischen Peaks festgelegt.

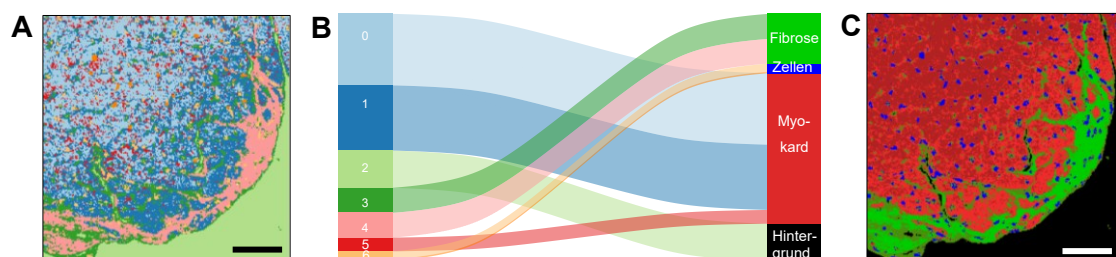


Abb. 15: Transition von unsupervidiertem zu supervidiertem Clustering

A Die einzelnen Pixel des zweidimensionalen Raman Scans (250x250 Pixel) wurden entsprechend des zugeordneten Clusters aus obiger Analyse farbcodiert. **B** Sankey Plot mit manueller Zuordnung der Cluster zu bestimmten kardialen Strukturen, basierend auf der räumlichen Verteilung und materialspezifischer Peaks. **C** Resultierendes neu eingefärbtes Bild nach supervidierter Färbung der Cluster entsprechend der Grundwahrheit („ground truth“). Maßstabsbalken 50 µm.

Modifiziert nach (Sigle et al., 2023)¹.

Überraschenderweise konnte das unsupervidierte Clustering teilweise mehr als nur ein Cluster finden, das einer bestimmten kardialen Struktur zuordenbar war. So zeigten sich zwei der Fibrose zuordenbare Cluster, von denen Cluster 3 das Cluster 4 zu umschließen scheint. Cluster 4 entspricht aufgrund der guten Korrelation mit der Fibrosefärbung (Abb. 11A) dem eigentlichen Fibroseareal, während Cluster 3 aufgrund spektraler Gemeinsamkeiten als präfibrotische Grenzzone um die eigentliche Fibrosezone interpretiert werden kann. Diese Eigenschaft konnte nur durch die spektroskopische Bildgebung detektiert werden, nicht aber durch konventionelle Histologie. Die unsupervidierte Analyse­methode konnte weiterhin zwei Cluster identifizieren, die dem Myokard zugeordnet werden können (Cluster 0 und 1). Auffallenderweise zeigen die zugehörigen Pixel eine klare räumliche Anordnung, die von weiter entfernt (Cluster 0) bis direkt an die Fibrose heranreichend (Cluster 1) reicht. Man kann vermuten, dass dieses räumliche Muster die Folge des kardialen Remodelings in den nahe der Fibrose gelegenen Myokardabschnitten ist. Man könnte somit Cluster 1 (dunkelblau) als eine Art Transitionszone zwischen gesundem Myokard (Cluster 0) und Fibrose (Cluster 4) interpretieren. Spannenderweise wurde dieses Muster von einem „unbiased“, „spatially-unaware“ Clustering-Algorithmus gefunden und war durch konventionelle Histologie nicht ersichtlich. Es kann dementsprechend geschlussfolgert werden, dass die Herangehensweise mit Raman „Spectromics“ eine sensitive Methode zur Identifikation versteckter molekularer Muster in Gewebe darstellen kann.

3.2.3 Integration räumlicher Information in Raman “Spectromics” („spatially-aware”)

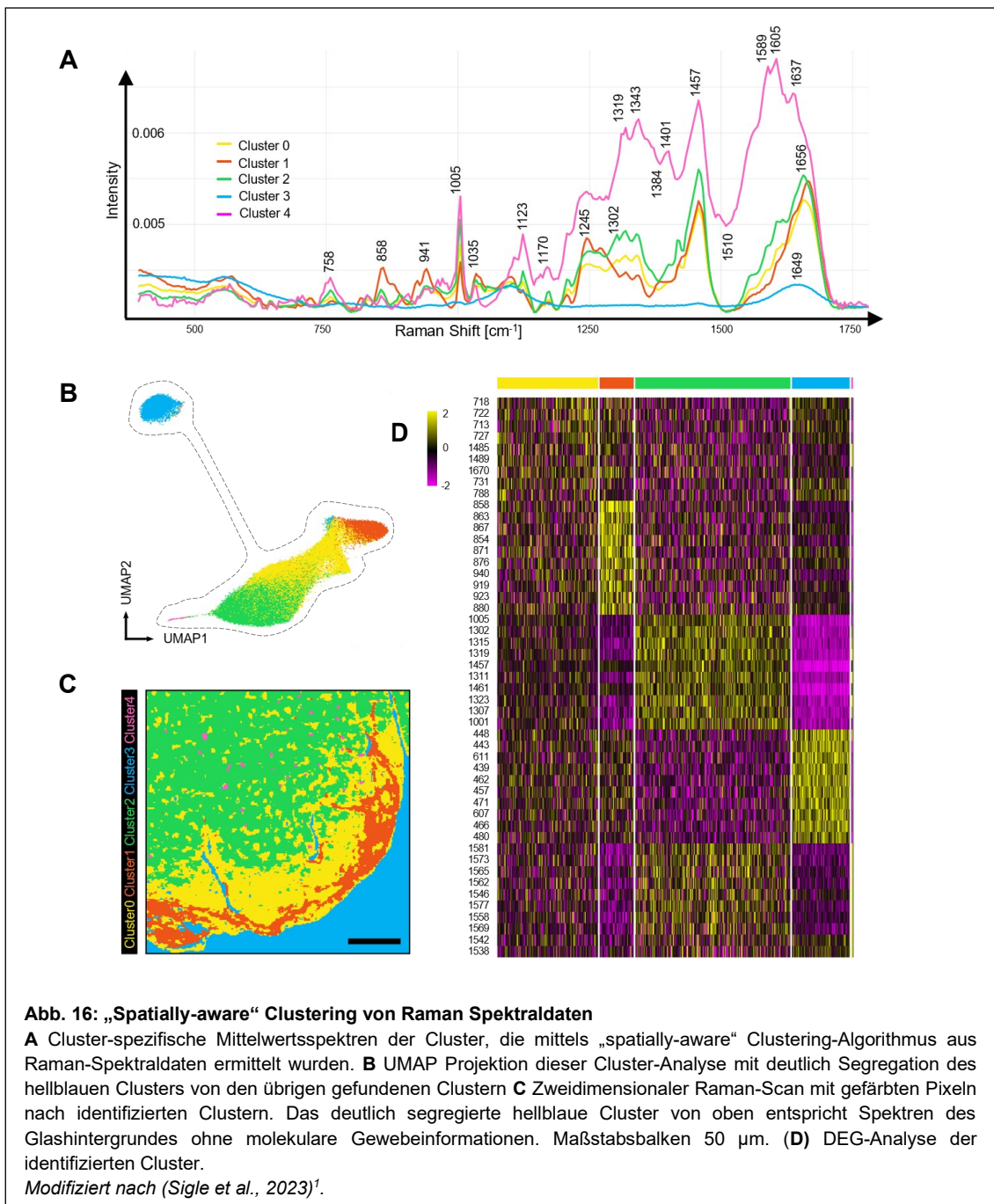
Die bisherigen Analysen haben sich auf isolierte Pixel bzw. deren Spektren beschränkt, ohne die räumliche Lokalisation dieses Pixels im Gesamtbild zu beachten. Im nächsten Schritt sollten die hochdimensionalen Analysen durch die Integration der räumlichen Auflösung bereichert werden. Ziel dieser „spatially-aware Raman Spectromics“-Strategie war es zum einen, mithilfe eines anderen Clustering-Algorithmus die Analyseergebnisse aus den vorigen Untersuchungen zu verifizieren. Zum anderen kann die zusätzliche räumliche Information helfen, analytische Herausforderungen wie Artefakte und Signalrauschen zu bewältigen⁶⁶, indem über räumlich benachbarte Spektren – und damit solche mit hoher Wahrscheinlichkeit eines ähnlichen „Raman-Fingerprints“ – geglättet wird.

Für die Analyse der räumlich aufgelösten Raman-Daten („spatially-aware Raman Spectromics“) wurde erneut ein bioinformatisches Tool in die „Raman-Welt“ translatiert, welches zur Analyse von Spatial Transcriptomics entwickelt wurde. „BayesSpace“ nutzt als Clustering-Algorithmus ein t -verteilttes Fehlermodell, um räumliche Cluster zu identifizieren. Dieses Modell gilt als besonders robust gegenüber statistischen „Ausreißern“ und Signalrauschen, wofür Raman-Analysen durch technische Artefakte in Probenvorbereitung oder Bildaufnahme besonders empfindlich sind. Die genauere Methodik, die BayesSpace dabei verwendet, ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben.

Als Datensatz für die Anwendung des „spatially-aware“ Clusterings wurde derselbe verwendet wie oben beschrieben. Die Analyse ergab eine detektierte Clusteranzahl von 5 für das „Fingerprint-Spektrum“, wobei diese Zahl wie oben beschrieben durch den Wendepunkt der negativen Pseudo-Log-Wahrscheinlichkeitskurve bestimmt wurde.

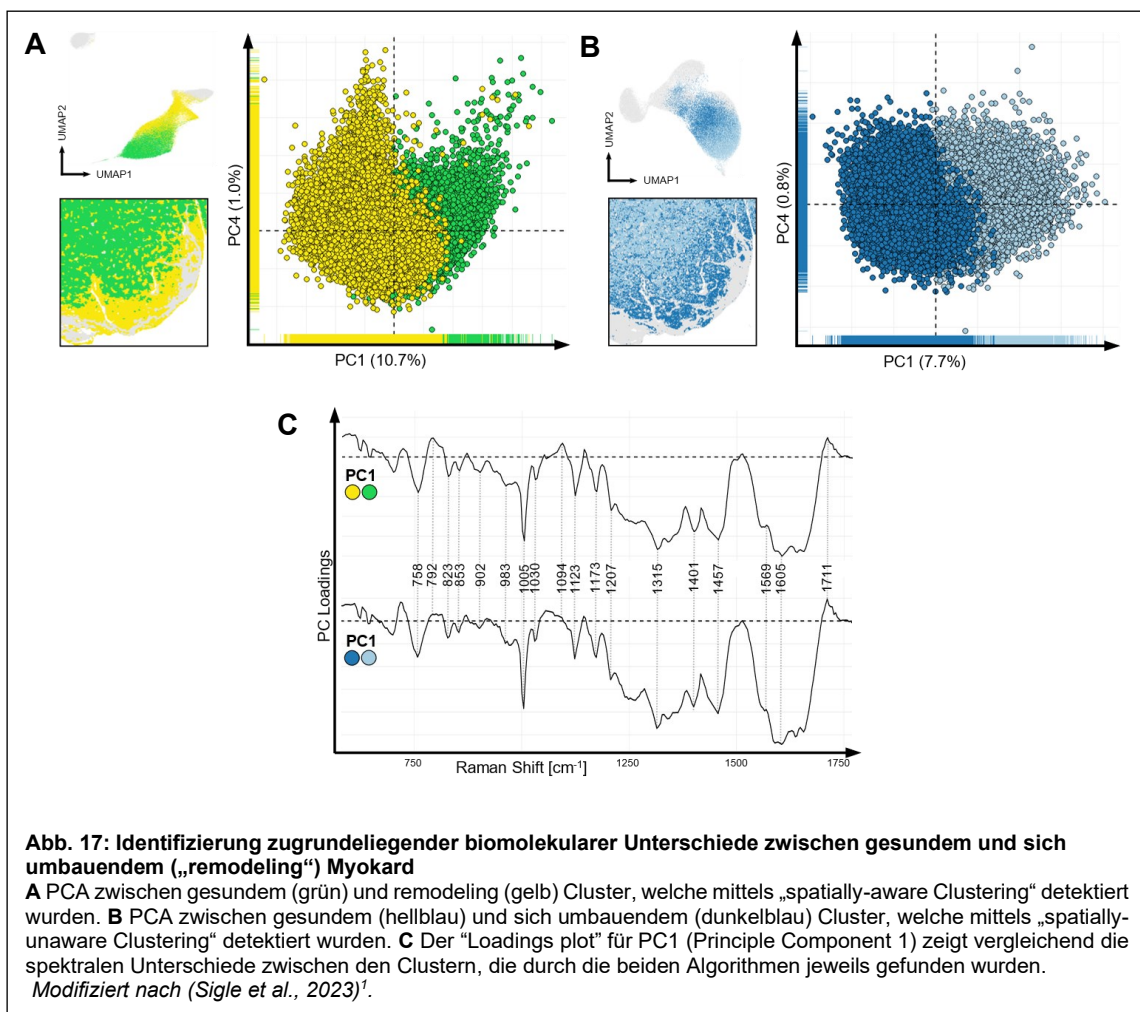
Auffallenderweise präsentiert die UMAP-Analyse des „spatially-aware“ Clusterings eine komplett andere Projektion im Vergleich zur obigen UMAP-Analyse ohne die Integration räumlicher Informationen (Abb. 16B): Ein Cluster zeigt eine deutliche Segregation weg von den übrigen Clustern, die sich wiederum nicht oder nur gering zu anderen Clustern abgrenzen. Dies ist als

Konsequenz des veränderten Clustering-Algorithmus zu werten. Beachtenswerterweise konnte die Integration der räumlichen Information die Clustering-Spezifität nochmals verbessern, wenn man das nun generierte Cluster-Bild (Abb. 16C) mit dem vorherigen Cluster-Bild (Abb. 15A) und der Picro-Siriusrot-Färbung (Abb. 11A) vergleicht. Berücksichtigt man allerdings die Tatsache, dass zuvor Artefakte durch ein dediziertes Cluster aus den Analysen der übrigen Cluster herausgefiltert wurden, so bedeutet das Bild des „spatially-aware“ Clusterings, dass die einzelnen Cluster mehr Artefaktspektren enthalten können.



Dennoch lässt sich feststellen, dass sich durch die Integration räumlicher Informationen die vorherige „spatially-unaware“ Cluster-Analyse reproduzieren lässt. Denn überraschenderweise konnte auch das „spatially-aware“ Clustering die vorherige Beobachtung eines zusätzlichen myokardialen Clusters zwischen gesundem Myokard und fibrotischem Subendokard reproduzieren. Es wurde daher erneut die Hypothese aufgestellt, dass dieses Cluster eine Transitionszone des Myokards darstellt, die gekennzeichnet ist durch umfangreiches Remodeling, Degradation und Synthese.

Um die zugrundeliegenden biomolekularen Unterschiede zwischen dem gesunden und sich umbauenden Myokard zu identifizieren, wurde daher eine „Principal Component Analysis“ (PCA, Hauptkomponenten-Analyse) zwischen den beiden Clustern durchgeführt. Es wurde außerdem unterschieden, ob die Cluster „spatially-unaware“ oder „spatially-aware“ detektiert wurden (Abb. 17).



Für beide Datensätze wurde eine Verschiebung des Myokardumbau-Clusters zu negativen PC1-Werten beobachtet (Abb. 17C). Die wichtigsten Raman-Peaks, die in den PC1-Loadings identifiziert wurden, lagen bei 758, 823, 853, 1005 und in der Amid-I-Region zwischen 1605-1650 cm^{-1} , was auf Unterschiede in einzelnen Aminosäuren wie Tryptophan (758 cm^{-1}), Tyrosin (823 and 853 cm^{-1}) und Phenylalanine (1005 cm^{-1}) hindeutet. Darüber hinaus konnten Alterationen in der Form der Amid-I-Bande zwischen 1605 und 1650 cm^{-1} festgestellt werden, die auf eine Veränderung der Sekundärstruktur von Proteinen hin zu β -Faltblattstrukturen hindeuten. Darüber hinaus zeigten die „spatially-unaware“ loadings (Abb. 17C, unten) Hinweise auf Unterschiede im Glykogen, was neben einer Veränderung der Proteinkomposition auch auf Metabolismus-Änderungen im Rahmen des kardialen Remodelings hindeutet.

Zur Validierung der Robustheit unseres neuartigen Vorgehens zur hochdimensionalen Analyse von Raman-spektroskopischen Daten, wurde die Methode der Raman „Spectromics“ in weiteren histologischen Schnitten im Tiermodell der kardialen Hypertrophie und Remodeling (Abb. 18) sowie im Myokardinfarkt (Abb. 19) inklusive der entsprechenden Kontrollgruppen getestet und reproduziert.

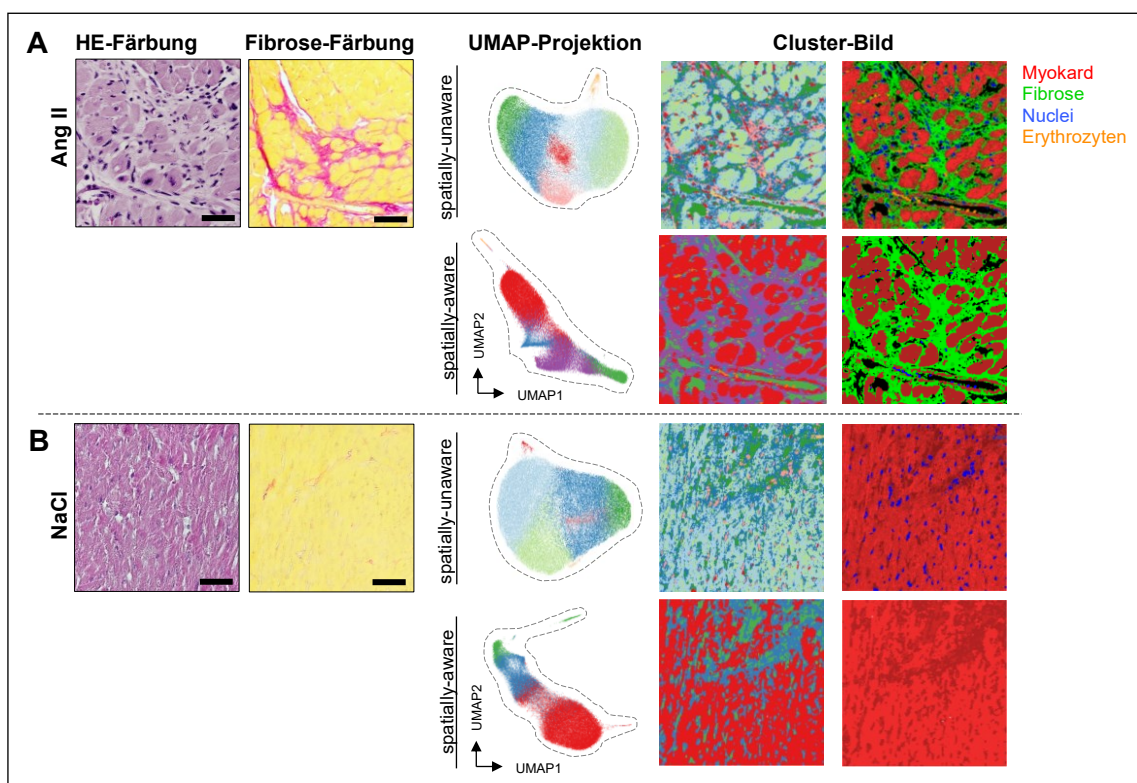


Abb. 18: Validierung anhand weiterer Schnitte im Tiermodell der kardialen Hypertrophie und Remodeling

A Tiere der Interventionsgruppe mit Angiotensin II (Ang II) entwickeln über 28 Tage neben einer Hypertrophie auch fibrotische Narben. Sowohl „spatially-unaware“ als auch „spatially-aware“ Clustering kann die in den Standardfärbungen ersichtlichen Kompartimente detektieren, wobei „spatially-aware“ Clustering die Fibroseareale am ehesten überschätzt. **B** In der Kontrollgruppe mit Natriumchlorid (NaCl) über 28 Tage ist ein gesundes Herz zu sehen. Demensprechend homogen erscheint auch die spektroskopische Analyse des Schnittes. Die Streifen sind am ehesten als Faltenartefakte des Paraffinschnittes zu werten.

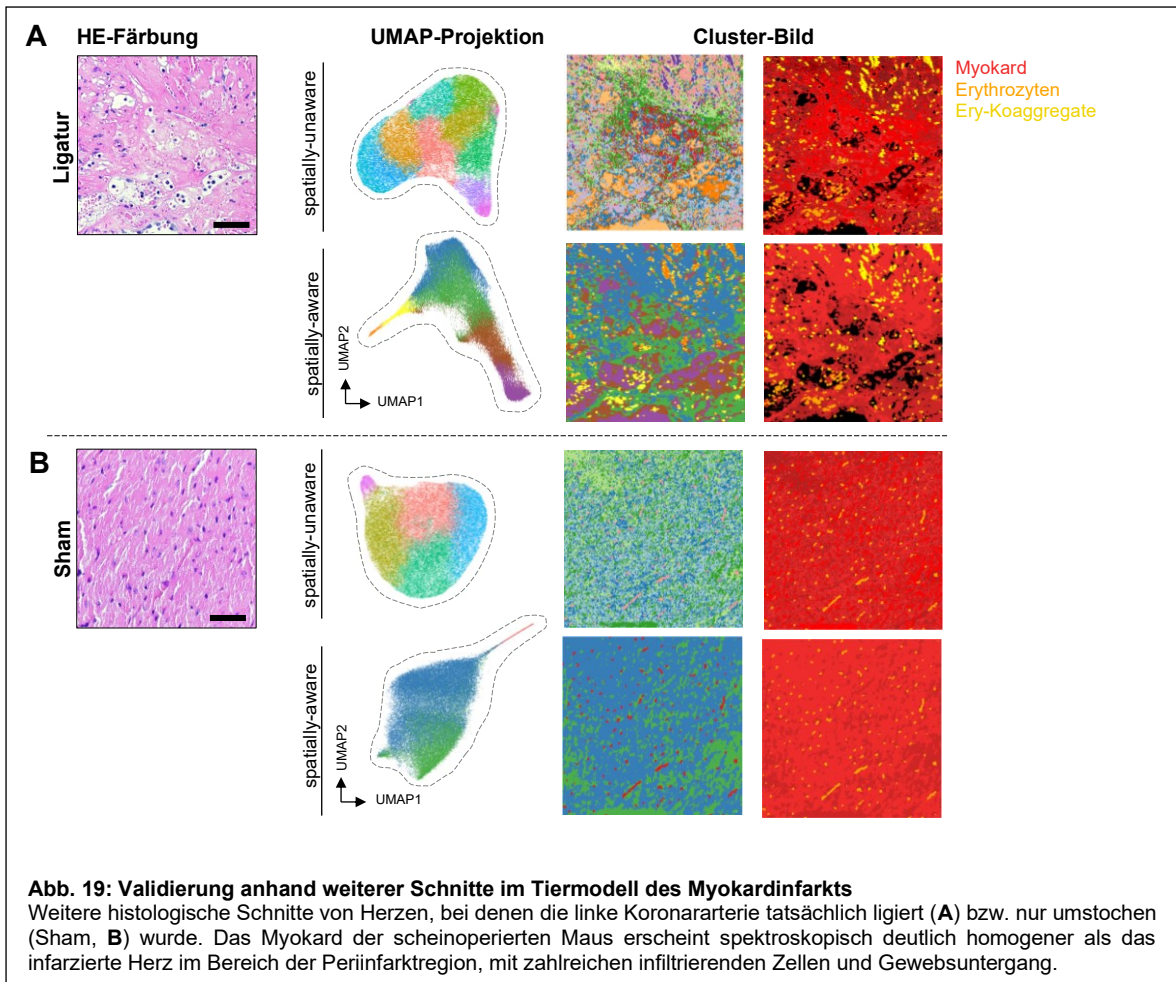


Abb. 19: Validierung anhand weiterer Schnitte im Tiermodell des Myokardinfarkts

Weitere histologische Schnitte von Herzen, bei denen die linke Koronararterie tatsächlich ligiert (**A**) bzw. nur umstochen (**B**) wurde. Das Myokard der scheinoperierten Maus erscheint spektroskopisch deutlich homogener als das infarzierte Herz im Bereich der Perinfarktregion, mit zahlreichen infiltrierenden Zellen und Gewebsuntergang.

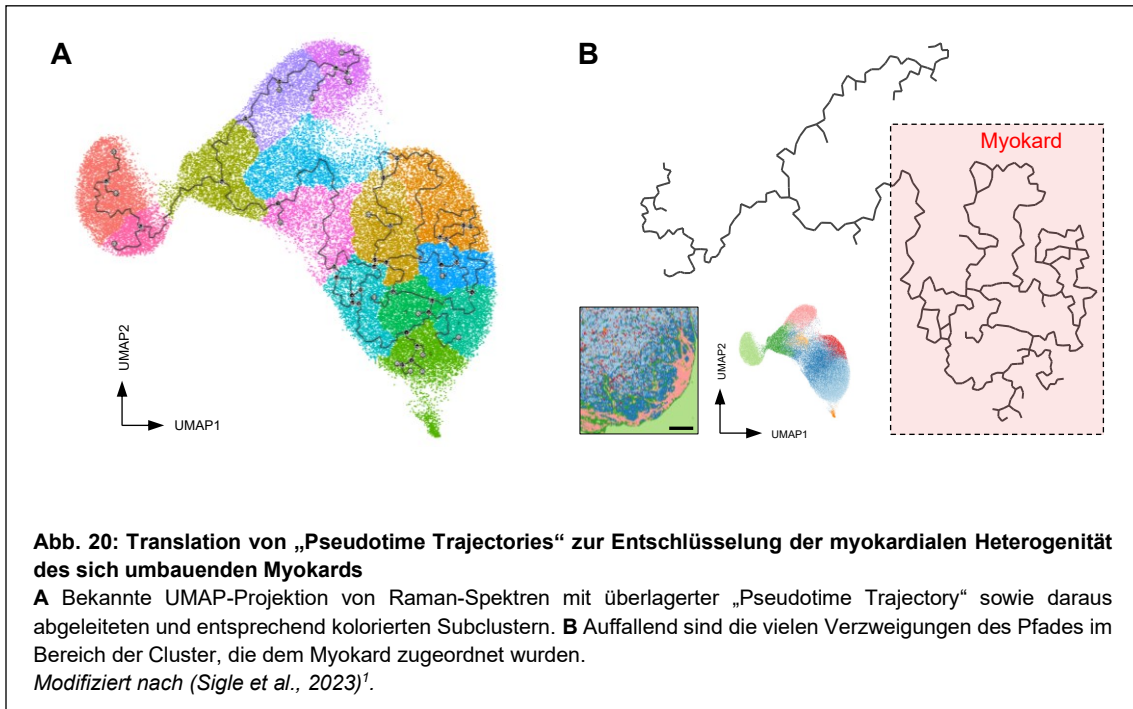
3.2.4 Entschlüsselung der Intra- und Intercluster-Heterogenität durch Translation von „Pseudotime-Trajectories“

Wie zuvor beschrieben, war ein unsupervidierter Clustering-Algorithmus in der Lage Myokard-Zonierungen zu finden, welche die klassischen histologischen Färbungen nicht aufdecken konnten. Daher soll nun die Heterogenität der myokardialen Spektren näher untersucht werden, die zur Entstehung dieser dedizierter Subcluster beigetragen haben.

Um dies zu bewerkstelligen, wurde das Bioinformatik-Tool Monocle^{73,74} auf Raman-Analysen umgewidmet. Monocle kann sogenannte „Pseudotime“-Analysen bei Einzelzellen durchführen. Dabei stellt die Pseudotime ein Maß für den Progress dar, den eine einzelne Zelle durch Prozesse wie Differenzierung, Aktivierung und Teilung während ihres gesamten Lebens durchmacht⁷³.

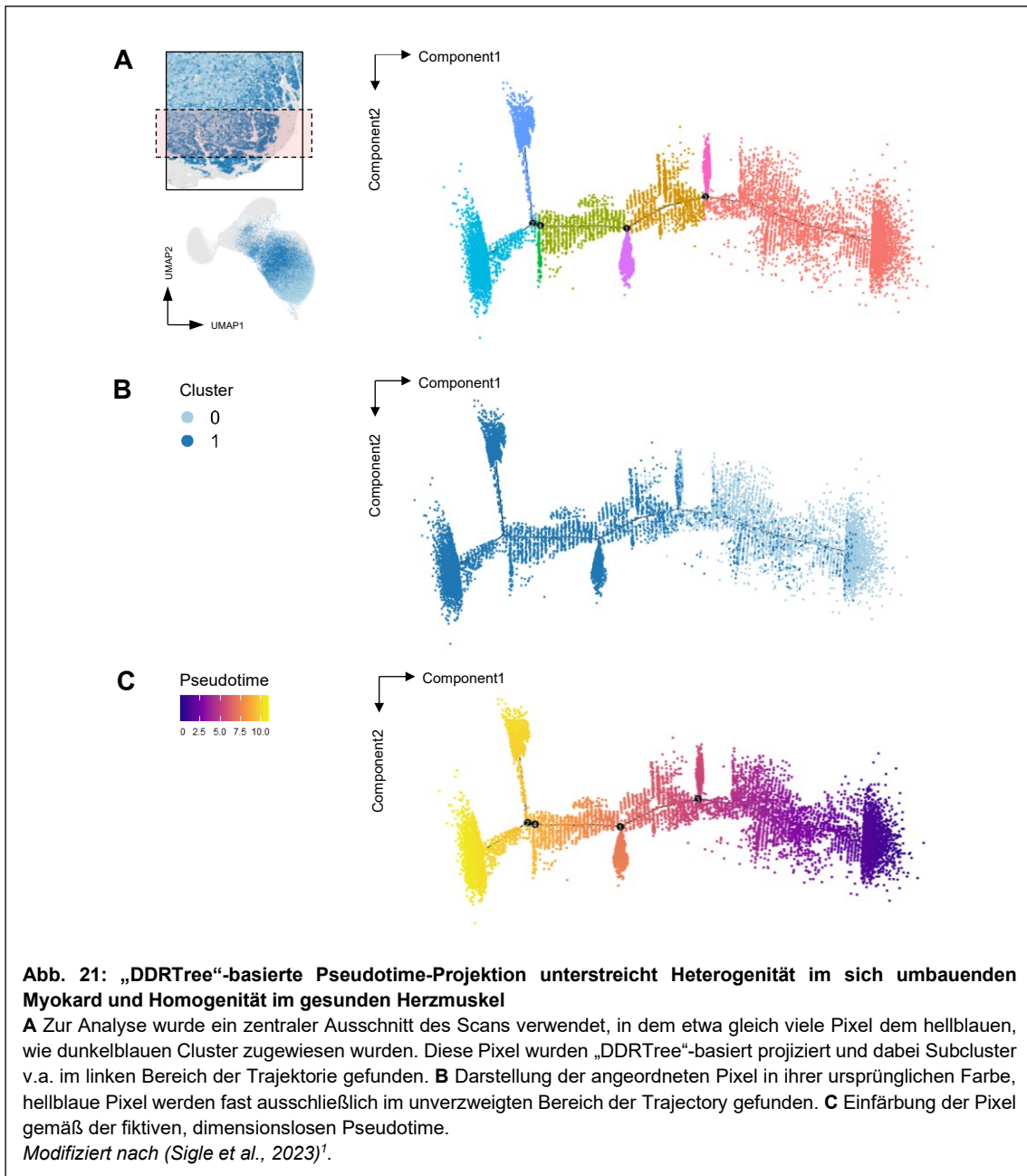
Übersetzt auf Raman-Analysen können mit dieser Methodik gescannte Pixel bzw. deren Spektren, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit einem bestimmten Cluster zugeordnet wurden, auf Heterogenität und Homogenität untersucht werden. Unterscheiden sich die Spektren innerhalb eines Clusters stark, so spricht dies für eine hohe „Intracluster“-Heterogenität. Die Verschiedenheit zu den Spektren anderer Cluster kann durch die „Intercluster“-Heterogenität beschrieben werden. Eine genauere Beschreibung der Methodik hinter der Pseudotime und ihrer translationalen Bedeutung für die Raman-Spektroskopie ist im Methodenteil dieser Arbeit zu finden.

Für die Pseudotime-Analyse der Raman-Daten wurde die Seurat-Analyse des „Fingerprint-Spektrums“ des Schnittes mit subendokardialer Fibrose in die Monocle-Umgebung integriert. Bei Betrachtung der UMAP-Projektion mit der darübergelegten „Pseudotime Trajectory“ fällt auf, dass diese insbesondere im Bereich der zuvor identifizierten Myokardcluster (hellblau und dunkelblau) stark verzweigt zu sein scheint (Abb. 20). Dieses Ergebnis impliziert, dass innerhalb der Myokardclustern eine hohe Heterogenität vorliegen muss, da der Pseudotime-Algorithmus die einzelnen Pixel bzw. die entsprechenden Spektren nicht entlang einer einzelnen Trajektorie anordnen konnte.



Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt eine Region im Zentrum des Raman Scans gewählt, bei der etwa die gleiche Anzahl an Pixel dem gesunden (Cluster 0, hellblau) oder remodeling (Cluster 1, dunkelblau) Myokard zugeordnet wurden (Abb. 21A, links). Die Spektren dieser Pixel wurden anschließend mit der von Monocle verwendeten Methode „DDRTree“ (siehe Methoden) analysiert.

Im ersten Analyseschritt wurden die Pixel bzw. Spektren entlang einer langen geradlinigen „Pseudotime Trajectory“ angeordnet und alle Verzweigungen, als Zeichen für Heterogenität im Sortierungsprozess, wurden als Subcluster farbcodiert (Abb. 21A, rechts). Im nächsten Schritt wurde überprüft, welchem myokardialen Cluster (s.o.) diese Pixel zugeordnet werden können. Überraschenderweise zeigte die Analyse, dass die Pixel mit gesundem Myokard (hellblau) fast ausschließlich im unverzweigten, rechten Bereich der Trajektorie liegen, während die Pixel des remodeling Myokards (dunkelblau) im stark verzweigten linken Bereich der „Pseudotime Trajectory“ zu finden sind (Abb. 21B). Demzufolge weisen die Spektren des dunkelblauen Clusters eine hohe Heterogenität auf, die durch die zahlreichen ablaufen biochemischen Prozesse im sich umbauenden Myokard gut erklärbar sind.



3.3 Molekulare Dynamiken bei räumlicher Annäherung an kardiale Fibrose

Wie die vorherige Analyse zeigen konnte, unterliegt dem sich umbauenden Myokard eine hohe Dynamik im Auf-, Ab- und Umbau von Biomaterialien. Die bisherige Analyse hat aber dabei die räumliche Organisation des Remodelings bisher außer Acht gelassen. Im nächsten Schritt wurden daher räumliche Pfade

untersucht, die sich der Pathologie bzw. der subendokardialen Fibrose annähern. Ziel dieser Analyse war es, die der Heterogenität des sich umbauenden Myokards zugrundeliegenden molekularen Veränderungen zu identifizieren und zu untersuchen, wie diese Dynamiken räumlich organisiert sind.

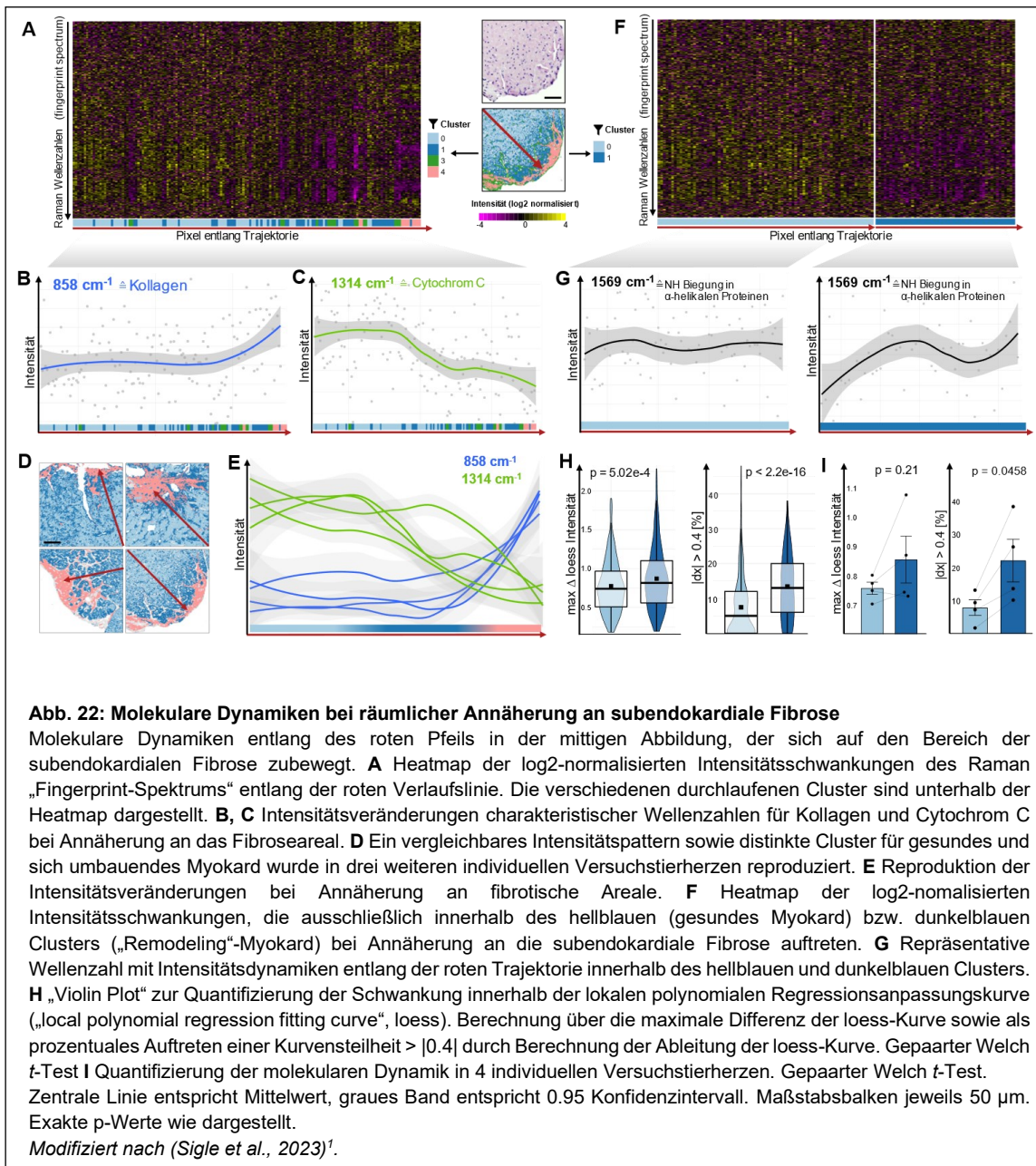
Zu diesem Zweck wurden lineare Trajektorien gebildet, die sich auf die Pathologie zubewegen, und die auf diesem Weg durchlaufenen Pixel wurden entlang der Abszisse angeordnet. Die log₂-normalisierten Intensitäten des „Fingerprint-Spektrums“ der durchlaufenen Pixel wurde auf die Ordinate aufgetragen (Abb. 22).

Die durchlaufenen Pixel wurden zu Analyse Zwecken entweder auf alle relevanten Cluster (Cluster 0,1,3,4) ohne die zuvor als Artefakt-Cluster identifizierten Cluster gefiltert (Abb. 22A). Außerdem wurden explizit nur die durchlaufenen Pixel für gesundes (Cluster 0, hellblau) oder remodeling (Cluster 1, dunkelblau) Myokard betrachtet, um die Dynamiken innerhalb der Cluster nochmals zu verifizieren (Abb. 22F).

Ausgewählte Intensitäts-Dynamiken entlang des räumlichen Pfades auf die subendokardiale Fibrose zu wurden anschließend näher untersucht. So zeigte beispielsweise der Raman-Shift bei der Wellenzahl 858 cm⁻¹, der charakteristisch für die C-C-Schwindung von Hydroxyprolin des Kollagens ist, dass bereits außerhalb des eigentlichen Fibrosebereich bereits auf molekularer Ebene ein präfibrotischer Umbau festzustellen ist (Abb. 22B). Dieses Ergebnis bestätigt die vorherige Vermutung eines präfibrotischen Gürtels um die eigentliche Fibrose-Zone. Weiterhin wurde eine deutliche Dynamik in den Intensitäten der Cytochrom C-Bande von Kardiomyozyten (1318 cm⁻¹) festgestellt. Spannenderweise reflektieren die Alterationen der Intensität die Passage durch das gesunde Myokard, die zuvor beschriebene Remodeling-Zone und das Fibrose-Areal (Abb. 22C). Dieselben Ergebnisse wurden in insgesamt 4 individuellen Mäusen reproduziert (Abb. 22D, E).

Des Weiteren wurde die „Intracluster“-Heterogenität genauer untersucht. Dazu wurden entlang des Pfades alle Pixel herausgefiltert, die dem Cluster 0 bzw. 1 zugeordnet wurden (Abb. 22F). Beachtenswerterweise zeigten sich

insbesondere innerhalb des Clusters 1, was zuvor als Remodeling-Cluster identifiziert worden war, starke Intensitätsdynamiken (d.h. deutliche Intensitätsschwankungen) (Abb. 22G). Dieses Ergebnis unterstützt unsere vorherigen Analysen mit der „Pseudotime Trajectory“, mittels derer hohe Dynamiken fast ausschließlich ebenfalls in Cluster 1 gefunden wurden (vergleiche Abb. 21B).



Um diese Dynamiken über alle Wellenzahlen und damit unvoreingenommen zu quantifizieren, wurde die maximale Differenz der lokalen polynomialen Regressionsanpassungskurve („local polynomial regression fitting curve“, loess) (Abb. 22H) berechnet sowie über die Ableitung dieser Regressionskurve die Dynamik im Verlauf (Abb. 22I). Auch hier zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen Cluster 0 und 1.

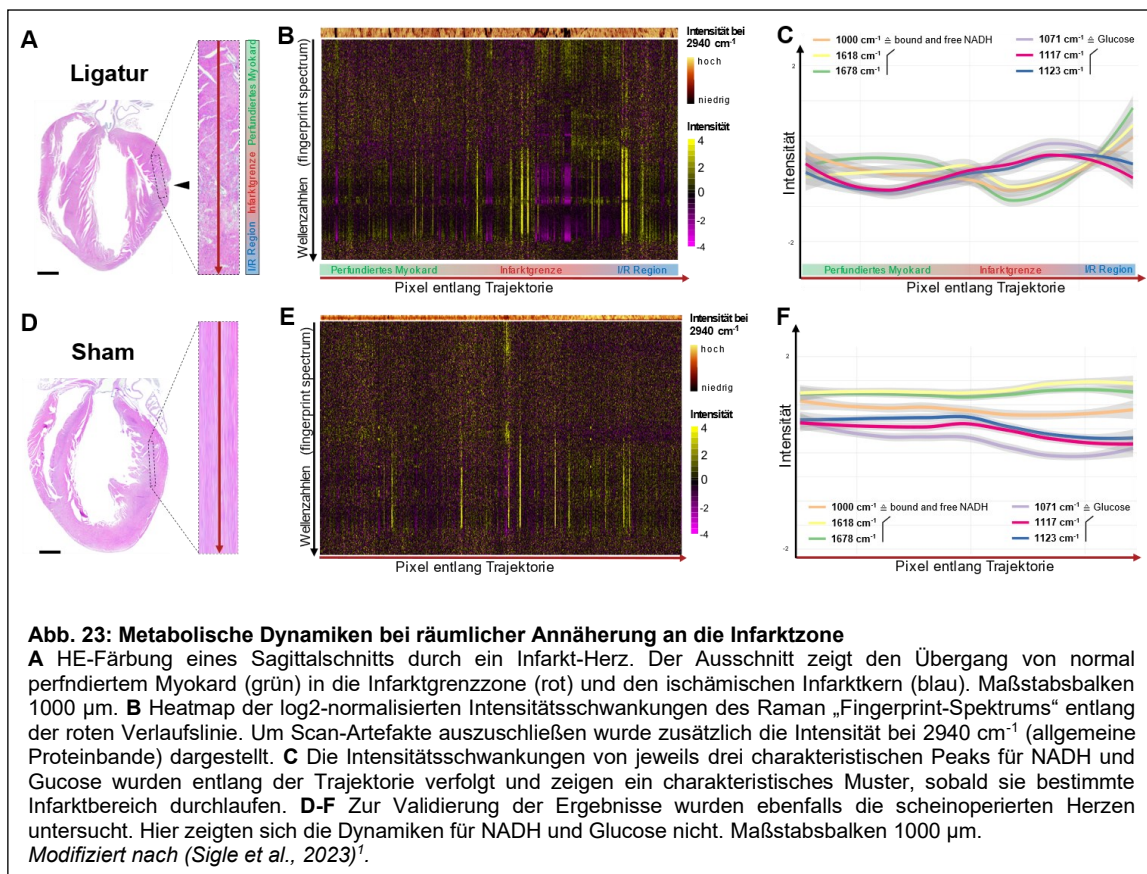
3.4 Hochdimensionale Charakterisierung metabolischer Alterationen im Myokardinfarkt mittels räumlicher Trajektorien und multimodalen Raman-MALDI-Multi-Omics

Um die neuartige Methodik zur Darstellung molekularer Dynamiken entlang räumlicher Pfade weiter herauszufordern, wurden die Analysen im zweiten Tiermodell, dem akuten Myokardinfarkt, angewandt. Aus dem experimentell-induzierten Vorderwandinfarkt (siehe Methoden) resultiert ein ischämisches Infarktareal, das von einer hypoperfundierten „Area at Risk“ umgeben ist⁷⁵. Daran schließt sich die Periinfarktregion an, in die 24 Stunden nach dem Infarkt inflammatorische Zellen eingewandert sind. Die Periinfarktregion geht dann wiederum in das gesunde, vom Infarkt nicht affektiert Myokard über (Abb. 23A). Ziel dieser Analyse war es, metabolische Dynamiken auf Grundlage spektroskopischer Daten beim Durchlaufen dieser verschiedenen Infarktbereiche zu untersuchen.

Dazu wurden jeweils drei charakteristische Peaks für NADH (Nicotinamidadenindinukleotid)^{36,45} und Glucose^{36,44} ausgewählt und deren Intensitätsschwankungen entlang des Pfades untersucht (Abb. 23C). Interessanterweise wiesen beide Metabolite ein spezifisches Muster beim Durchlaufen der Infarktbereiche auf. NADH zeigte sich an der Infarktgrenze erniedrigt und stieg mit Vordringen in die Ischämie-/Reperfusionregion (I/R-Region) deutlich an. Dies deutet auf einen mitochondrialen Kompensationsmechanismus als Energielieferant hin. In Gegensatz dazu war Glucose in der Periinfarktregion erhöht, aber erniedrigt in den benachbarten

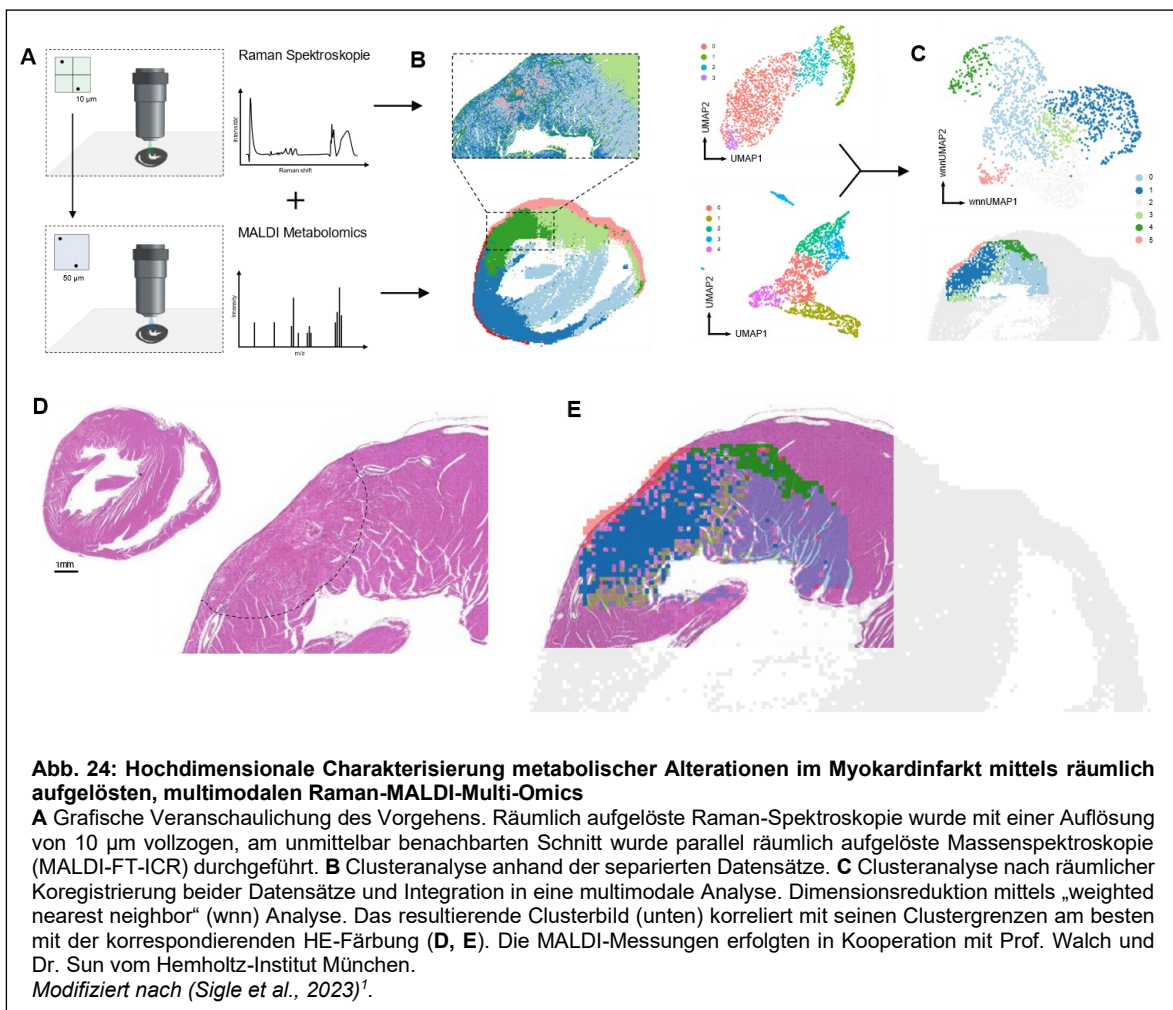
Regionen. Man kann dies interpretieren als einen verstärkten Glucose-Transport in Richtung des erkrankten Herzgewebes, wo inflammatorische Zellen das Gewebe infiltrieren und hohe Mengen an Energie verbrauchen; es kann aber auch als Ausdruck einer verstärkten Glykolyse der Kardiomyozyten betrachtet werden.

Wohlgemerkt zeigte sich eine solche metabolische Dynamik nicht in den scheinoperierten Herzen (Abb. 23D-F).



Zur weiteren Untersuchung der metabolischen Aspekte im Tiermodell des akuten Myokardinfarktes wurden im nächsten Schritt Raman-Spektroskopie mit MALDI-Imaging zu Raman-MALDI-Multi-Omics gekoppelt. Dazu wurden direkt benachbarte Schnitte von drei individuellen Infarkt Herzen jeweils für Raman bzw. MALDI Messungen in der gleichen Region verwendet (Abb. 24A) Hierbei erfolgte aus technischen Gründen die Raman-Messungen mit 10 μm Auflösung, der MALDI-Messungen mit 50 μm . Nachdem beide Datensätze in den Seurat-Workflow integriert wurden, erfolgte zunächst eine separate Cluster-Analyse

(Abb. 24B). Im nächsten Schritt wurden beide Datensätze in Form einer „weighted nearest neighbor“- (wnnUMAP) Analyse integrativ untersucht und die identifizierten Cluster erneut auf den räumlichen Kontext projiziert (Abb. 24C). Interessanterweise konnte gerade die integrative Datenanalyse aus Raman- und MALDI-Messungen die Infarktregion, wie sie in der HE-Färbung zu erahnen ist, am besten widerspiegeln (Abb. 24D, E) – verglichen mit den räumlich projizierten Clustern der separaten Analysen (Abb. 24B, links).



Basierend auf spektralen und metabolischen Unterschieden konnte durch die integrative Multi-Omics-Analyse erfolgreich eine Periinfarktregion (Ischämie-Reperfusionsgrenze, I/R-Grenze) von der gesunden Remote-Region räumlich abgegrenzt werden. Um nun die spektralen und metabolischen Unterschiede zwischen diesen beiden Regionen näher zu analysieren, wurden Raman- bzw.

MALDI-Intensitätsunterschiede (Photonenanzahl bzw. m/z-Intensität) hinsichtlich ihrer Signifikanz und ihrer Differenz untersucht. Die gemessenen Daten wurden in Volcano-Plots visualisiert (Abb. 25A, B), die insgesamt betrachtet die Herunterregulation von Metaboliten in der I/R-Region zeigen. Dies kann als Ausdruck des Gewebeuntergangs in diesem Bereich interpretiert werden. Spezifisch für die Raman-Spektroskopie wurde noch das durchschnittliche Spektrum in den jeweiligen Regionen dargestellt (Abb. 25C).

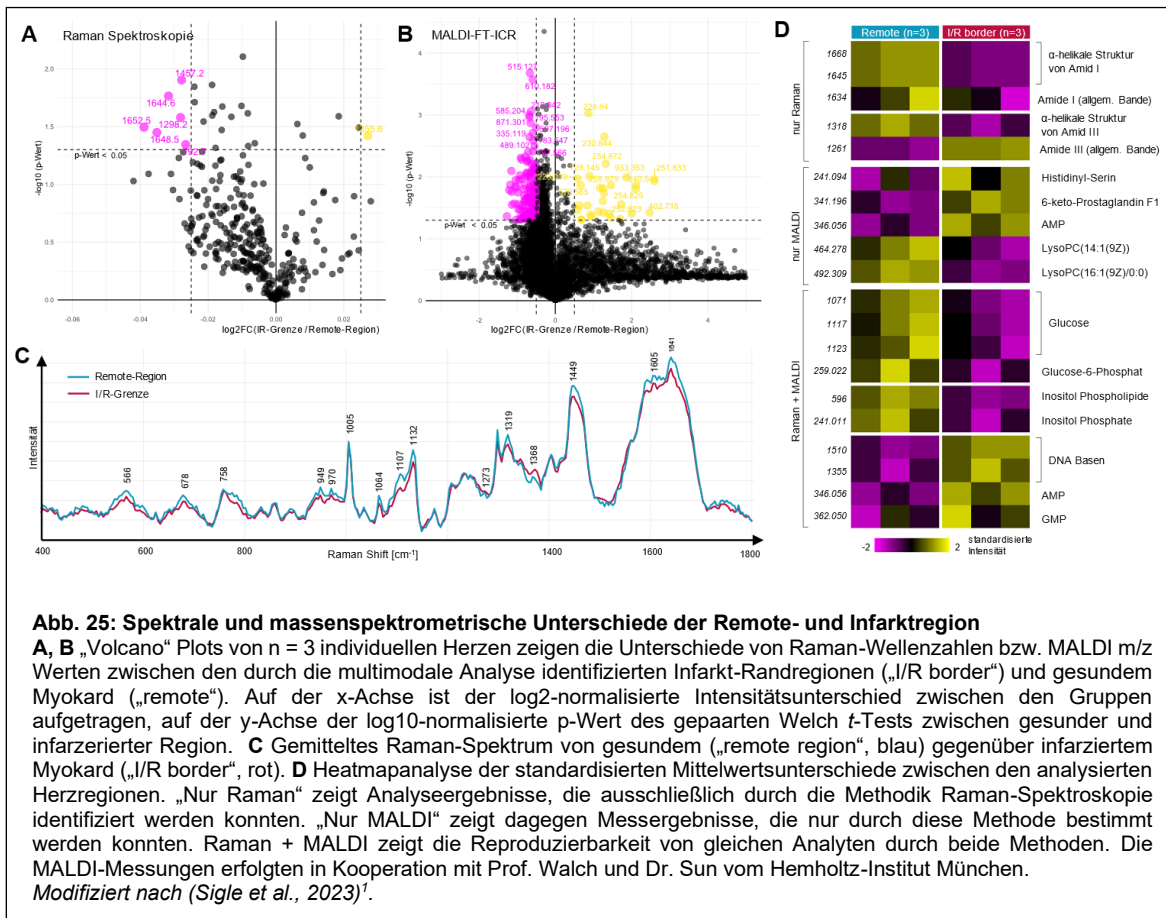
Sowohl Raman- als auch MALDI-Imaging liefern hilfreiche Informationen zur Bestimmung metabolischer Alterationen in der Infarktregion des Herzens. Es gibt jedoch – aufgrund technischer Natur oder aufgrund fehlender Evidenz – bestimmte Metabolite, die eine Entität identifizieren kann, die andere jedoch nicht. Ebenso gibt es Metabolite, die von beiden Messmethoden gleichsam quantifiziert werden können. Dieser Aspekt sollte in der nächsten Analyse untersucht werden. Hierzu wurden die standardisierten Mittelwertsunterschiede zwischen den beiden Herzregionen für spezifische Peaks bzw. m/z-Werte untersucht (Abb. 25D). Zu den molekularen Alterationen, die nur durch Raman-Spektroskopie identifiziert werden können, gehört so beispielsweise die Tatsache, dass in der I/R-Grenzregion weniger α -helikale Konfigurationen von Proteinen gefunden wurden. Zusammen mit unseren vorherigen Ergebnissen im remodeling Myokard, indem es einen Shift der Protein-Sekundärstruktur in Richtung β -Faltblattstrukturen gibt, liefert dieser Befund in der akuten myokardialen Pathologie einen weiteren Hinweis auf Mechanismen des kardialen Remodelings im Frühstadium myokardialer Schädigung.

Andere Metabolite konnten dagegen nur durch MALDI identifiziert werden. Histidinyl-Serin ist beispielsweise ein Abbauprodukt des Proteinkatabolismus und der zellulären Signaltransduktion (HMDB0028894), und dieses Protein zeigte sich in der Infarktgrenzregion erhöht. Lysophosphatidylcholinen werden antiinflammatorische Effekte (HMDB0010380, HMDB0010383) zugeschrieben, und diese zeigten sich in der Infarktregion verringert.

Darüber hinaus gibt es auch Metabolite, die von beiden Messverfahren gleichsam identifiziert und quantifiziert werden können. Diese Metabolite dienen

zusätzlich als Validierung der Messergebnisse mittels einer anderen orts aufgelösten Messmethode. So zeigten sich vergleichbare Messergebnisse für Glucose, Inositolphosphate sowie DNA-Basen.

Zusammenfassend konnte durch diese angewandte Methodik gezeigt werden, dass hierdurch Stoffwechselveränderungen mit höchster räumlicher Auflösung visualisiert und identifiziert werden können.



3.5 Hochdimensionale Definierung der zellulären Immunlandschaft im akuten Myokardinfarkt

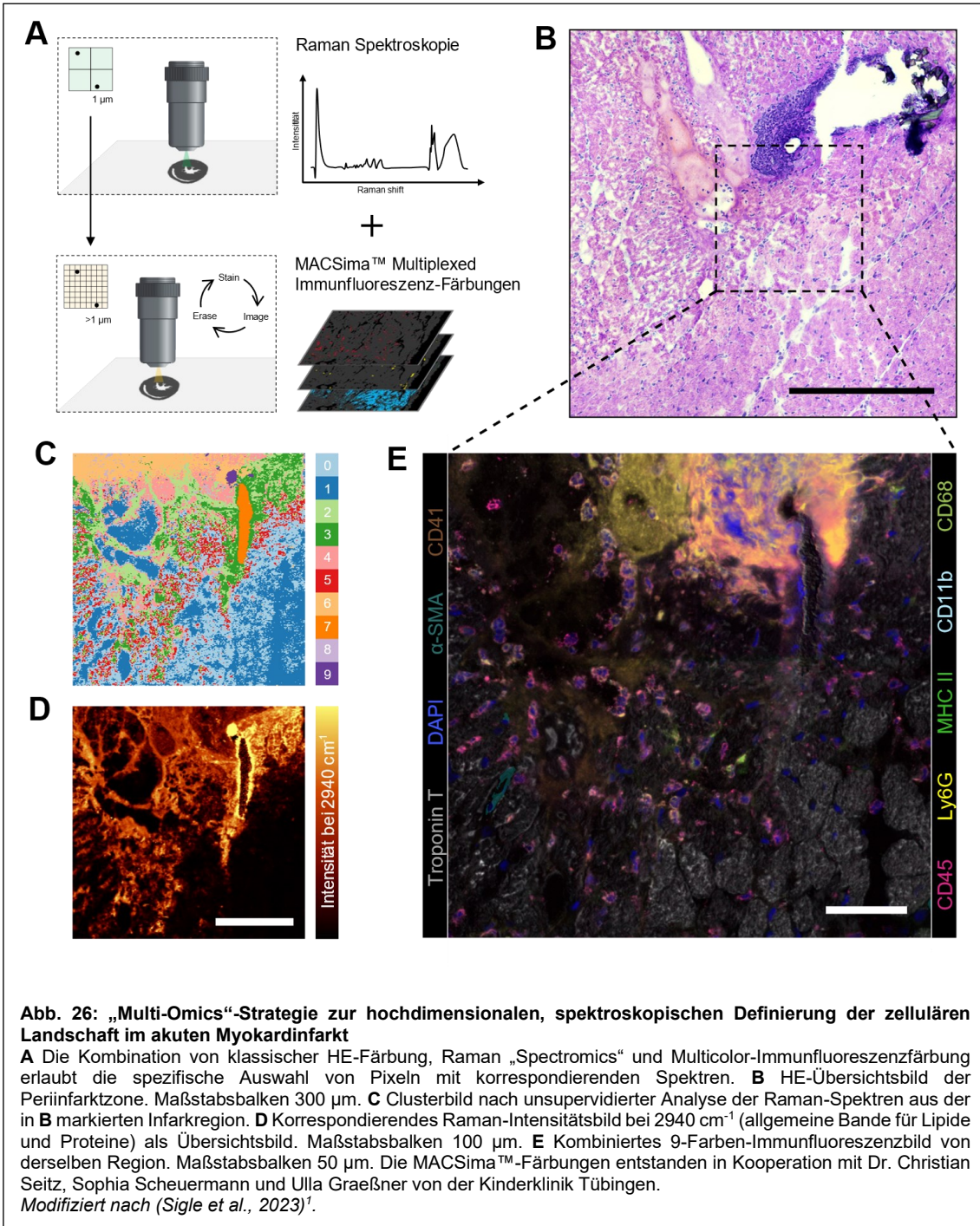
Nach Ischämie und Reperfusion des infarzierten Herzens wandern Immunzellen in Infarktregion ein, um abgestorbenes Gewebe zu entfernen, zu reparieren oder umzubauen und eine fibrotische Narbe zu ersetzen⁷⁶. Dabei stellen in der frühen Phase (24 Stunden nach Infarkt) insbesondere neutrophile Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, T-Zellen, aber auch Erythrozyten und Thrombozyten und die prominentesten infiltrierenden Mitspieler dar⁷⁶.

Nachdem in den bisherigen Analysen der Fokus auf dem Gewebe und der Extrazellulärmatrix lag, soll nun die zelluläre Landschaft im akuten Myokardinfarkt mittels räumlich aufgelöster Raman „Spectromics“ untersuchen.

3.5.1 Multiparametrische Detektion von Inflammationszellen durch Kombination von Raman-Spektroskopie und Multifarben-Immunfluoreszenzfärbung

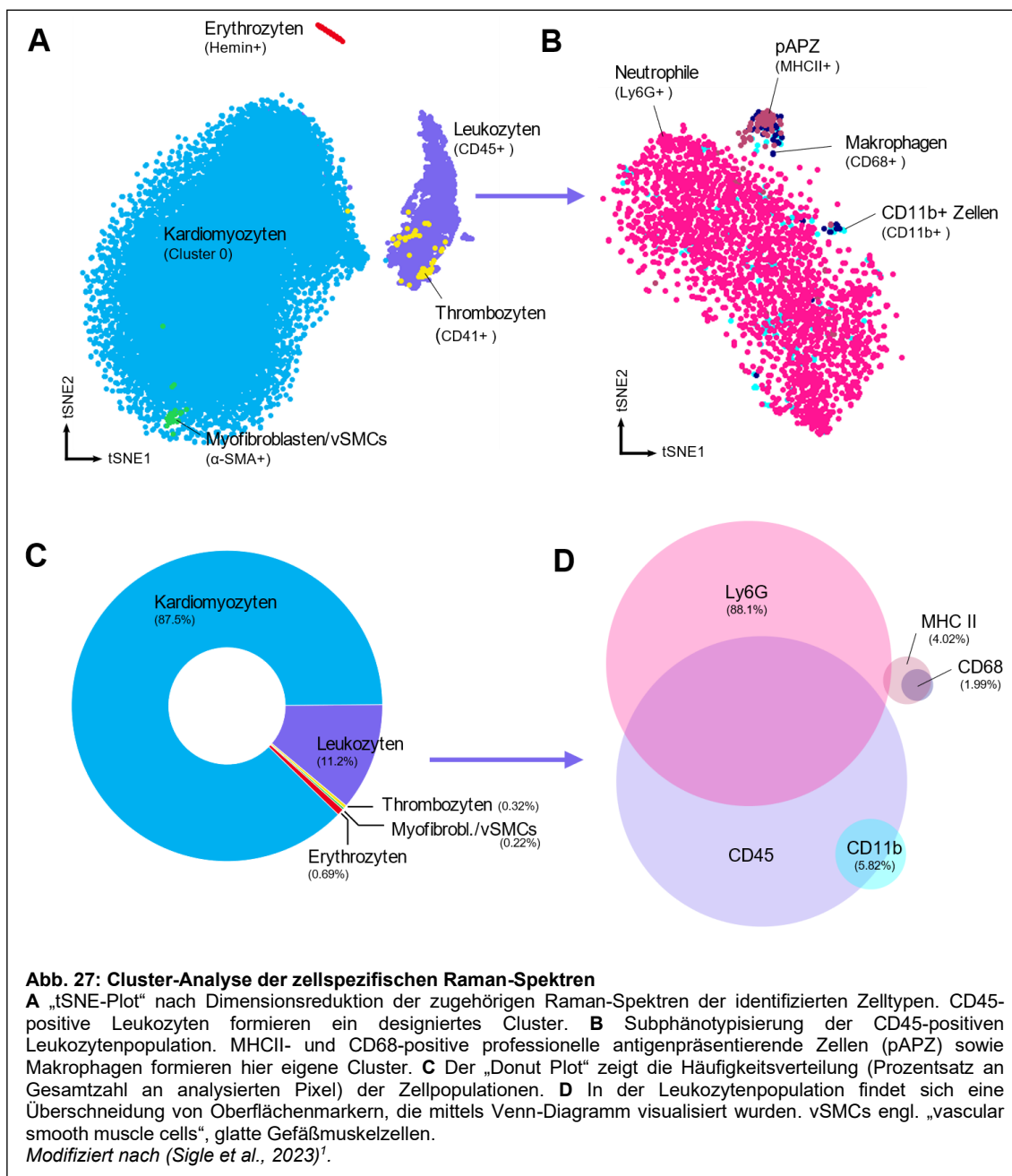
Um zelluläre Subtypen anhand Spektraldaten definieren zu können, wurden mit HE-Färbungen die Periinfarktregion identifiziert und anschließend Raman- und MACSimaTM-Scans derselben Region mit derselben Probe angefertigt.

Durch das Übereinanderlegen des Raman Scans mit einem Multifarben-Immunfluoreszenzbild (siehe Methoden) konnten die Pixel ausgewählt werden, die durch die Immunfluoreszenzfärbung einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden konnte und nun auch ein charakteristisches Raman-Spektrum aufzuweisen hat. Dieses „Multi-Omics“-Vorgehen erlaubt die direkte Identifikation von Zelltypen durch Antikörper-basierte Immunmarkierung und Zuordnung des entsprechenden spektralen Fingerabdrucks (Abb. 26). Um eine korrekte Überlagerung beider Scans sicherstellen zu können, wurde sich die hohe Autofluoreszenz von Erythrozyten in der Immunfärbung sowie starke Hämin-Banden im Raman-Scan zunutze gemacht.



Nachdem alle Pixel mit positiver Immunmarkierung selektiert wurden, konnten die darunterliegenden Raman-Spektren mittels multidimensionaler Analyse untersucht werden. „T-distributed stochastic neighbor embedding“ (tSNE) wurde als Dimensionsreduktions-Methode verwendet, um Pixel mit ähnlichen Spektren in Clustern anzuordnen (Abb. 27A). Kardiomyozyten repräsentierten dabei die größte Kohorte (Abb. 27B) mit der größten spektralen Heterogenität, unter

Berücksichtigung der geringen Kompaktheit des Clusters. Auch zahlreiche Erythrozyten waren in der Periinfarktregion zu finden, die dagegen ein dicht gepacktes Cluster darstellten. Interessanterweise ähneln sich die Spektren von alpha-smooth muscle actin-positiven (α -SMA+) Myofibroblasten bzw. glatten Gefäßmuskelzellen und Ly6G-positiven neutrophilen Granulozyten derart, dass die beiden Cluster direkt aneinandergrenzen.



Die Mittelwertsspektren, die für den entsprechenden Zelltyp gefunden wurden, sind ebenfalls dargestellt (Abb. 28).

Die wichtigsten spektralen Eigenschaften der Erythrozyten waren die Hämin-Banden bei 757, 1372 und 1604 cm^{-1} . Aufgrund dieses einzigartigen spektralen Musters zeigte auch die tSNE-Projektion keine Interferenz mit den Spektren anderer Zellen.

Die Spektren von α -SMA-positive Pixeln waren charakterisiert durch Banden, die CH_3 und C-C (940 cm^{-1}), C-O (853 cm^{-1}) und Amid III (1245 cm^{-1})-Schwingungen von Aminosäuren zugewiesen werden können. Diese können sowohl von Myofibroblasten als auch glatten Gefäßmuskelzellen stammen.

Neutrophile Granulozyten wurden als Ly6G-positive Pixel identifiziert, die sich nahe den Spektren der α -SMA-positiven Pixel geclustert haben. Allerdings konnten – im Gegensatz zu allen anderen Spektren – deutliche DNA-verwandte Banden abgeleitet werden, wie beispielsweise bei 783, 1093, 1376 und 1581 cm^{-1} .

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass durch die Bestimmung der spatiellen Verteilung von Biomolekülen mittels räumlich aufgelöster, hochdimensionaler Raman „Spectromics“, Homogenität, Heterogenität und Dynamik in Zellen und Geweben mit subzellulärer Auflösung beleuchtet und näher charakterisiert werden können. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit exemplarisch an zwei Modellen kardialer Erkrankungen gezeigt, ist aber grundsätzlich auf alle Bereiche der Biowissenschaften und Grundlagenforschung übertragbar.

Die vorgestellte Arbeit führt den Begriff der „untargeted Spatial Raman Spectromics“ ein und präsentiert diese neuartige, ortal aufgelöste Omics-Methode als robuste und praktikable Verfahrensweise, die eine umfangreiche Charakterisierung von Zellen und Matrix auf molekularer Ebene ermöglicht – und dies markerfrei, nicht-invasiv und nicht-destruktiv.

Zur Etablierung der Raman „Spectromics“ wurden bereits bestehende, erprobte bioinformatische Tools für Einzelzellgenomik, ortal aufgelöste Transkriptomik und Pseudotime-Analysen in die „Raman-Welt“ translatiert, was eine bisher einzigartige Nutzung bioinformatischer Ressourcen auf der einen Seite und multiparametrischer beziehungsweise hochdimensionaler Raman-Datensätze auf der anderen Seite darstellt. Folglich liefert diese Arbeit auch einen Ideenanstoß für eine umfassende Charakterisierung hochdimensionaler Datensätze aus anderen Bereichen der Grundlagenforschung.

4.1 Vorteile und Möglichkeiten der Raman „Spectromics“

4.1.1 Allgemeine Vorteile der Methode Raman-Spektroskopie

Zunächst einmal stellt die Raman-Spektroskopie eine Methode dar, nicht-invasiv und nicht-destruktiv, sowie markerfrei ein Gewebe oder Zellen zu charakterisieren. Dies kann beispielsweise einen Vorteil darstellen, wenn *in vitro* lebendige Zellen untersucht werden sollen, die nicht aus ihrem Zellverband herausgelöst werden können und bei denen die Zugabe von Substanzen ins Medium die Analyse verfälschen würde. Auch *in vivo* hat die Methode den großen Vorteil, einen molekularen Fingerabdruck von Gewebe zu erstellen, ohne dass dieses aufbereitet werden oder zwangsläufig aus seinem Verbund gelöst werden muss. So gibt es bereits Forschung an Endoskopen, die mit einem Raman-Mikroskop an der Spitze versehen sind und zur nicht-invasiven Diagnostik von Tumoren eingesetzt werden⁷⁷.

Auch im Falle von Biopsien mit nur wenig Probenmaterial stellt die Raman-Spektroskopie eine hilfreiche Methode dar, da die analysierte Biopsie unverändert aus der Analyse hervorgeht und somit auch unverändert für weitere Diagnostik zur Verfügung steht. Außerdem bietet die non-invasive Diagnostik den Vorteil, dass keine Gewebemodifikation oder -verdau notwendig ist, was den Spielraum an nachfolgenden Analysemöglichkeiten in keiner Weise einschränkt. Des Weiteren bedarf es keiner umfangreichen Gewebepreparation vor der Analyse, was zeit-, kosten- und personalschonend ist.

Darüber hinaus ist die Raman-Spektroskopie sowohl mit Kryogeweben als auch Formalin-fixiertem, in Paraffin-eingebettetem Gewebe kompatibel, was die retrospektive Analyse von Proben ermöglicht, die bereits vor Dekaden in Biobanken gesammelt wurden¹.

Und schließlich überzeugt die Raman-Mikrospektroskopie durch seine räumliche Auflösung im Mikrometerbereich, was die Auflösung aktueller kommerzieller Spatial Transcriptomic-Analysen in enormen Ausmaßen übersteigt, beispielsweise die des Herstellers 10X Genomics um den Faktor 7000.¹

4.1.2 Vorteile der hochdimensionalen Raman „Spectromics“

Diese bereits bekannten Vorteile der Raman-Spektroskopie werden durch die in dieser Arbeit vorgestellten hochdimensionalen Auswertemethode nochmals aufgewertet.

Durch Raman „Spectromics“ kann der gesamte akquirierte Datensatz der Raman-Spektroskopie nebst dessen räumlicher Verortung unsupervidiert und dadurch unvoreingenommen („unbiased“) analysiert werden.

Die vorgestellte Methodik kann – ganz im Sinne des maschinellen Lernens – ein unsupervidiertes Clustering eines Gewebes vornehmen, das die analysierte Probe aufgrund ähnlicher biomolekularer Zusammensetzung in Kompartimente zu unterteilen vermag. Die Information über die unterschiedlichen Kompartimente kann dann für anschließende Analysen genutzt werden, wie im vorliegenden Fall zur Identifizierung und vergleichenden Analyse einer Transitionszone zwischen gesundem Myokard und subendokardialer Fibrose.

Dabei hat Raman „Spectromics“ das Potenzial, komplexe spatiomolekulare Informationen zu erfassen, die in dieser Form derzeit durch keine andere Omics Technologie erfasst werden können. So können simultan Extrazellulärmatrix und Zellen charakterisiert werden, basierend auf deren molekularen Beschaffenheit.

Darüber hinaus generiert Raman „Spectromics“ einen Datensatz, der wiederum in andere bioinformatische Analysen einfließen kann oder mit weiteren Omics-Strategien zu Multi-Omics verknüpft werden kann.

Und schließlich kann die vorgestellte Analysemethode der Raman „Spectromics“ in grundlegend allen Bereichen der biomaterial-bezogenen Grundlagenforschung angewandt werden, insbesondere auch im Bereich der Tumorforschung.

4.1.3 Raman „Spectromics“ im Vergleich zu gegenwärtigen Auswertemethoden der Raman-Spektroskopie

Die bisherige Analyse von Daten, die mittels Raman-Spektroskopie akquiriert wurden, beschränkt sich i.d.R. auf die Möglichkeiten, die die proprietäre Software des Geräteherstellers anbietet. Diese Software ist i.d.R. nicht quelloffen und daher die genaue Analysemethodik nicht nachvollziehbar und mit anderen Auswertungen kombinierbar.

Des Weiteren begrenzt sich die Analyse häufig auf einzelne Pixel bzw. deren Spektren, die mittels True Component Analyse (TCA, siehe Methoden) identifiziert wurden und anschließend über eine Schwellwertbildung ausgewählt wurden. Dadurch ergibt sich verständlicherweise ein Bias.

Die Analyse des gesamten akquirierten Datensatzes mit Methoden des maschinellen Lernens bringt außerdem den Vorteil mit sich, dass auf diese Weise hochsensibel Unterschiede detektiert werden können, die durch klassische statistische Auswertungen nicht zu ergreifen wären. In dieser Arbeit sind bis zu 600 Parameter in die Analyse eingeflossen.

Darüber hinaus wurde in den bisherigen Publikationen die räumliche Auflösung des Raman Scans nicht sinnvoll genutzt, sondern i.d.R. „spatially-unaware“ (d.h. losgelöst vom räumlichen Kontext) einzelne Pixel untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt, wie die Ortsauflösung geschickt in die Analysen einfließen kann, sei es zur Verminderung von Cluster-Artefakten durch spezielle „spatially-aware“-Clustering-Algorithmen oder in Form von Spatial Trajectories.

Dazu kommt, dass bisher verschiedenste Softwareplattformen genutzt werden mussten, wenn eine tiefergehende Analyse benötigt wurde. Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Analysemethodik werden (fast) alle Auswerteschritte auf der Plattform RStudio⁶² vereint, die noch dazu ein Open-Source-Projekt ist. Das erleichtert nicht nur die Handhabung des Datensatzes, sondern verbessert auch die Interoperabilität mit anderen Analyseplattformen. Die „klassischen“ Auswertemethoden wurden auf dieser Plattform ebenfalls angewandt, aber durch sinnvolle, weitere Analysetechniken ergänzt.

Eine hohe Interoperabilität wiederum bietet den entscheidenden Vorteil, dass die gewonnenen Daten nicht für sich alleinstehend betrachtet werden müssen, sondern mit weiteren Analysen verknüpft werden können. Dies bezieht sich zum einen auf Teilschritte im Analyseworkflow: So wird in dieser Arbeit ebenfalls eine PCA angewandt, um die wichtigsten Hauptkomponenten-Peaks zu detektieren, aber anders als bisher, werden die PCA-Ergebnisse für tSNE- und UMAP-Projektion weiterverwendet. Zum anderen bezieht sich die erwähnte Verknüpfung auf den Gesamtdatensatz, der mit Raman „Spectromics“ akquiriert wurde und mit anderen Omics- oder orts aufgelösten Methoden (wie beispielsweise Multicolor-Immunfluoreszenzfärbungen) kombiniert werden kann. Dies bezeichnet man als integrative Analyse.

4.2 Limitationen und Fehlerquellen

Dennoch weist die vorgestellte Methodik auch Limitationen auf, die überwiegend technischer Natur sind.

4.2.1 Technische Limitationen der Raman-Spektroskopie

Raman-Spektroskopie ist bereits an sich eine hoch sensitive Methode, die folglich anfällig für Artefakte ist. Diese Artefakte können technischer Natur sein und während der Bildakquisition durch Probenverunreinigung hervorgerufen werden, sie können aber beispielsweise auch durch Paraffinreste von in Paraffin eingebetteten Geweben entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde den möglichen Artefakten durch Paraffinresten dadurch begegnet, dass alle charakteristischen Paraffin-Peak-Wellenlängen aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Selbstverständlich gibt es auch Biomaterialien, die an eben jenen herausgefilterten Raman-Wellenlängen eigentlich auch charakteristische Peaks hätten, die folglich nicht in der Analyse berücksichtigt werden konnten. Trotzdem stellt die Exklusion der Paraffin-Peaks die einzige Methode dar, reproduzierbare Ergebnisse über verschiedene Paraffinschnitte hinweg zu erhalten.

Extreme Ausreißer-Werte, die durch technische Artefakte bei der Bildakquisition entstanden sind, wurden durch einen Intensitätsfilter aus der Gesamtanalyse herausgerechnet und damit der Pixel und das entsprechende Spektrum komplett aus der Analyse entfernt. Die Gefahr, dass nach selektivem Herausfiltern nur eines einzelnen Peaks weiterhin Artefakte im Spektrum bestehen, wäre ansonsten zu groß. Folglich entstehen durch die in dieser Arbeit vorgestellten Herangehensweise „blinde Flecken“ in der Bildanalyse, die aber glücklicherweise i.d.R. sehr gering waren (ca. 0,008-0,02% der Pixel).

Eine entscheidende Herausforderung an „Spatial Raman Spectromics“ ist weiterhin die Verarbeitung enorm großer Datenmengen. So generiert eine Raman-Scan-Area von 250x250 px einen Datensatz von etwa 43.000.000 Datenpunkten. Der Export dieser Datenmenge in eine einfache Textdatei produziert daher bereits etwa 500 MB an Rohdaten. Die Analyse dieses Datensatzes mit dem „spatially-unaware“ Clustering-Algorithmus von Seurat war überraschend schnell, wohingegen durch die Integration der räumlichen Daten der „spatially-aware Clustering-Algorithmus“ etwa 60 min für Datenanalyse gebraucht hat (12 GB RAM Windows Rechner). Folglich werden künftige Innovationen im Umgang mit Big Data und räumliche Clustering-Algorithmen erforderlich sein, um größere Gewebebereiche zu untersuchen.

4.2.2 Methodische Limitationen der Raman „Spectromics“

Die hier vorgestellte Arbeit ist als „Prototyp“ für eine hochdimensionale, räumlich aufgelöste, unsupervidierte Auswertemethode für Raman Spektraldaten zu verstehen, bei der die Methodik im Vordergrund stehen soll. Als Folge der ungerichteten („untargeted“) Analysestrategie ist das primäre Ziel, so viele Informationen aus der Probe zu generieren, wie möglich. Erst im nächsten Schritt wird dann analysiert, auf welche molekularen Strukturen festgestellte Unterschiede zurückzuführen sind. In der vorliegenden Arbeit war der Fokus der Analysen überwiegend auf dem primären Ziel verortet, sodass die Identifizierung der eigentlichen molekularen Unterschiede vernachlässigt wurde. So wurden die identifizierten Unterschiede zwischen gesundem und „remodeling“ Myokard auch

nicht bis zur statistischen Signifikanz getestet, indem die Analysen an mindestens drei biologischen Replikaten wiederholt wurden. Doch dies soll auch nicht der Anspruch dieser Arbeit sein, die eher von methodisch-explorativem Charakter sein und den Grundstein für die zukünftige Analyse der eigentlichen biomolekularen Unterschiede legen soll.

Um die Effektivität der neuen Methodik zu beurteilen, führten wir vergleichende Analysen der selben Datensätze mit konventionelle Datenverarbeitungspipelines für Raman-Daten sowie auch Deep-Learning-Modelle durch¹. Traditionelle Techniken wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA) und die k-means-Clusteranalyse können räumliche Informationen nicht optimal nutzen und lassen somit wertvolle Informationen außer Acht. Im Gegensatz dazu birgt die Verwendung von Deep-Learning-Modellen großes Potenzial für die Raman-Spektralanalyse^{54,56,78}. Wir trainierten drei verschiedene Deep-Learning-Modelle, und deren Clustering-Ergebnisse wurden mit denen unseres vorgeschlagenen Ansatzes verglichen. Diese Daten sind nicht Bestandteil dieser Dissertation, können jedoch in der dazugehörigen Publikation nachgelesen werden¹. Dabei war die Deep-Learning-Technologie nur bedingt in der Lage, biologisch relevante Cluster zu erkennen und zu replizieren, die die vorgestellte Raman-„Spectromics“-Methode dagegen sicher abgrenzen konnte¹. Jedoch können die wahren Stärken von Deep Learning erst in der Anwendung auf noch größere Datenmengen ausgespielt werden, sodass eine tatsächliche Überlegenheit von Raman „Spectromics“ gegenüber Deep Learning-Modellen noch ausführlicher untersucht werden muss.

4.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie die neuartige Analyseverfahren der „Spatial Raman Spectromics“ Homogenität, Heterogenität und Dynamik von Zellen und Matrix auf molekularer Ebene aufzeigen kann, indem modernste, etablierte bioinformatische Analysetools, die normalerweise für Transkriptomanalysen verwendet werden, für die Anwendung auf Spektraldaten der Raman-Analysen translatiert werden. Durch die Untersuchung

von Schnitten des akuten Herzinfarkts und der chronischen Herzhypertrophie bei Mäusen waren wir in der Lage, myokardiale Subcluster aufzudecken, molekulare Dynamiken bei räumlicher Annäherung an Pathologie zu untersuchen und die den akuten Infarkt umgebende zelluläre Immunlandschaft zu definieren. Unser innovativer, markerfreier und nicht-invasiver "Spectromics"-Ansatz könnte daher neue Horizonte für eine tiefgreifende Charakterisierung histologischer Proben eröffnen und gleichzeitig ein adaptier- und erweiterbares Framework für anschließende, weiterführende Analysen darstellen.

Aufbauend auf unserem neuartigen Ansatz kann die Erforschung räumlich aufgelöster, molekularer Muster neue Einblicke in die grundlegenden Prinzipien des Gewebebaus und der Gewebeorganisation geben. Unsere Methodik kann dabei die Untersuchung der mechanistischen Grundlagen einer Transition von Physiologie zu Pathologie erleichtern, auf der Grundlage der biomolekularen Gewebezusammensetzung von Zellen und Geweben.

4.4 Ausblick

Raman-Spektroskopie als Methode ist bereits seit vielen Jahren bekannt, doch die Verfahren zur Analyse der resultierenden Daten haben sich seitdem nur wenig geändert. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode soll einen Grundstein legen und Denkanstoß liefern für eine umfassende, auf Methoden des maschinellen Lernens basierende Gewebeuntersuchung mittels Raman-Spektroskopie, die von Haus aus hochdimensionale Daten mit hoher Ortsauflösung liefert.

Die aus den multidimensionalen Raman „Spectromics“ gewonnenen Informationen sind bewusst in einem quelloffenen System generiert worden, was eine Adaptierbarkeit und Integration in andere Datensysteme erleichtert. Da nach dem Raman-Scan die Probe unverändert hervorgeht, kann derselbe Schnitt im Anschluss für weitere Analysen verwendet werden, wie Multicolor-Immunfluoreszenzfärbungen, Spatial Transcriptomics, Spatial Proteomics oder Spatial Metabolomics. Die Raman-Spektroskopie stellt dabei stets den Anfang

der Analyseketten dar, da die Methode als einzige der aufgezählten nicht-invasiv, nicht-destruktiv und markerunabhängig ist.

Auf Seiten der Datengenerierung eröffnet der vorgestellte Ansatz neue Dimensionen durch Kombination mit weiteren räumlich aufgelösten Analysemethoden. Auf Seiten der Datenanalyse können zukünftig durch eine synergistische Nutzung der Auswertepipelines von Raman „Spectromics“ und Deep-Learning-Modellen innovative Analysemethoden etabliert werden.

Die generierten hochdimensionalen Multi-Omics-Datensätze können neuartige Einblicke in Gewebe gewähren, und dem Verständnis von Pathologie und Pathogenese eine neue Dimension verleihen.

5 Zusammenfassung

Hochdimensionale Analysen zur Charakterisierung histologischer Proben, allen voran „Spatial Transcriptomics“, haben die Grundlagenforschung in den Biowissenschaften revolutioniert und beispiellose Einblicke in die genetischen Prozesse gewährt, die in Gewebeumbau und -reorganisation involviert sind. Während die meisten Aussagen über diesen dynamischen Prozess überwiegend auf der Analyse genomischer Daten beruhen, wurde die eigentliche biomolekulare Komposition des vorliegenden Gewebes vernachlässigt.

Raman-Mikrospektroskopie stellt eine Methode dar, diese Lücke mit spatiomolekularen Informationen auf subzellulärer Auflösung zu füllen. Dabei wird eine Gewebeprobe mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt und reflektierte, inelastische Streuung gemessen. Der Energieshift dieser inelastischen Streuung (Raman-Streuung) basiert auf induzierten Schwingungszuständen polarisierbarer Moleküle und ist charakteristisch für bestimmte Biomoleküle der Probe.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Anwendung einer neuartigen multiparametrischen Analyseform basierend auf Methoden des maschinellen Lernens, um akquirierten Daten der Raman-Spektroskopie auf hochdimensionale, adaptier- und erweiterbare Weise zu analysieren. Diese Methode wurde exemplarisch an histologischen Schnitten kardialer Pathologien, in Form von Tiermodellen des akuten Herzinfarkts und der chronischen Herzhypertrophie, getestet und validiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hochdimensionale, multiparametrische „Spatial Raman Spectromics“-Analyse es erlaubt, Homogenität, Heterogenität und Dynamiken von Gewebe und Zellen mit molekularer Auflösung zu charakterisieren, und dies in einer Untersucher-unabhängigen („unbiased“), nicht-invasiven, nicht-destruktiven und markerunabhängigen Art und Weise. Durch Translation bestehender, etablierter bioinformatischer Tools für Einzelzellanalysen in die Welt der Raman-Spektroskopie konnten myokardiale Subkompartimente von sich umbauendem

Myokard detektiert, molekulare Dynamiken bei räumlicher Annäherung an kardiale Pathologien untersucht und die umgebende zelluläre Immunlandschaft definiert werden.

Die neuartige Methode der „Spatial Raman Spectromics“ könnte daher neue Horizonte für eine umfassende, hochdimensionale Gewebecharakterisierung eröffnen, und darüber hinaus durch konsekutive, weiterführende Analysen derselben histologischen Probe ergänzt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Sigle, M. *et al.* Translating genomic tools to Raman spectroscopy analysis enables high-dimensional tissue characterization on molecular resolution. *Nat Commun* **14**, 5799 (2023).
- 2 Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102, doi:10.1126/science.1164680 (2009).
- 3 Valussi, M. *et al.* Repression of *Osmr* and *Fgfr1* by miR-1/133a prevents cardiomyocyte dedifferentiation and cell cycle entry in the adult heart. *Sci Adv* **7**, eabi6648, doi:10.1126/sciadv.abi6648 (2021).
- 4 Max-Planck-Gesellschaft. *miR1 und miR133a blockieren Teilung von Herzzellen*, <<https://www.mpg.de/17838397/mir1-und-mir133a-blockieren-zellteilung-bei-herzzellen>> (accessed 04/24/2022).
- 5 Remme, W. J., Swedberg, K., Task Force for the, D. & Treatment of Chronic Heart Failure, E. S. o. C. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* **22**, 1527-1560, doi:10.1053/euhj.2001.2783 (2001).
- 6 Stewart, S., MacIntyre, K., Hole, D. J., Capewell, S. & McMurray, J. J. V. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *European Journal of Heart Failure* **3**, 315-322, doi:10.1016/s1388-9842(00)00141-0 (2001).
- 7 ESC-Pocket-Guidelines. *Akute und chronische Herzinsuffizienz*, <<https://leitlinien.dgk.org/2022/pocket-leitlinie-akute-und-chronische-herzinsuffizienz-version-2021/>> (accessed 04/24/2022).
- 8 BÄK-KBV-AWMF. *Nationale VersorgungsLeitlinie (NVL) Chronische Herzinsuffizienz*, **3. Auflage**, <<https://www.leitlinien.de/themen/herzinsuffizienz>> (accessed 04/10/2022).
- 9 Schirone, L. *et al.* A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 3920195, doi:10.1155/2017/3920195 (2017).
- 10 Kehat, I. & Molkentin, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **122**, 2727-2735, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268 (2010).
- 11 Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-262, doi:10.1152/physrev.1999.79.1.215 (1999).
- 12 Silvis, M. J. M. *et al.* Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success. *Front Immunol* **11**, 599511, doi:10.3389/fimmu.2020.599511 (2020).
- 13 Frangogiannis, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* **11**, 255-265, doi:10.1038/nrcardio.2014.28 (2014).
- 14 Thomas, T. P. & Grisanti, L. A. The Dynamic Interplay Between Cardiac Inflammation and Fibrosis. *Front Physiol* **11**, 529075, doi:10.3389/fphys.2020.529075 (2020).
- 15 Kuppe, C. *et al.* Spatial multi-omic map of human myocardial infarction. *Nature* **608**, 766-777, doi:10.1038/s41586-022-05060-x (2022).

- 16 Hill, M. C. *et al.* Integrated multi-omic characterization of congenital heart
disease. *Nature* **608**, 181-191, doi:10.1038/s41586-022-04989-3 (2022).
- 17 Litvinukova, M. *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* **588**, 466-472,
doi:10.1038/s41586-020-2797-4 (2020).
- 18 Hasin, Y., Seldin, M. & Lusis, A. Multi-omics approaches to disease.
Genome Biol **18**, 83, doi:10.1186/s13059-017-1215-1 (2017).
- 19 Biovariance. *Omik-Tools*, accessed 05/17/2022).
- 20 Ferreira, J. P. *et al.* Proteomic Bioprofiles and Mechanistic Pathways of
Progression to Heart Failure. *Circ Heart Fail* **12**, e005897,
doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005897 (2019).
- 21 Lau, E. *et al.* Integrated omics dissection of proteome dynamics during
cardiac remodeling. *Nat Commun* **9**, 120, doi:10.1038/s41467-017-02467-
3 (2018).
- 22 Rao, A., Barkley, D., Franca, G. S. & Yanai, I. Exploring tissue architecture
using spatial transcriptomics. *Nature* **596**, 211-220, doi:10.1038/s41586-
021-03634-9 (2021).
- 23 Grünblatt, E. Was sind Omics? *PSYCH up2date* **8**, 343-346,
doi:10.1055/s-0034-1387400 (2014).
- 24 Marx, V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics. *Nat
Methods* **18**, 9-14, doi:10.1038/s41592-020-01033-y (2021).
- 25 Krassowski, M., Das, V., Sahu, S. K. & Misra, B. B. State of the Field in
Multi-Omics Research: From Computational Needs to Data Mining and
Sharing. *Front Genet* **11**, 610798, doi:10.3389/fgene.2020.610798 (2020).
- 26 Stajlar, I. The power of OMICs. *Biochem Biophys Res Commun* **479**, 607-
609, doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.095 (2016).
- 27 Li, R., Li, L., Xu, Y. & Yang, J. Machine learning meets omics: applications
and perspectives. *Brief Bioinform* **23**, doi:10.1093/bib/bbab460 (2022).
- 28 Kang, M., Ko, E. & Mersha, T. B. A roadmap for multi-omics data
integration using deep learning. *Brief Bioinform* **23**,
doi:10.1093/bib/bbab454 (2022).
- 29 Reel, P. S., Reel, S., Pearson, E., Trucco, E. & Jefferson, E. Using
machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review.
Biotechnol Adv **49**, 107739, doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107739
(2021).
- 30 Leichtle, A. Neue «-omics»-Technologien und die Herausforderungen der
Dateninterpretation. *Pipette – Swiss laboratory medicine* **4** (2013).
- 31 Lay, J. O., Liyanage, R., Borgmann, S. & Wilkins, C. L. Problems with the
“omics”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **25**, 1046-1056,
doi:10.1016/j.trac.2006.10.007 (2006).
- 32 Mosca, S., Conti, C., Stone, N. & Matousek, P. Spatially offset Raman
spectroscopy. *Nature Reviews Methods Primers* **1**, doi:10.1038/s43586-
021-00019-0 (2021).
- 33 Butler, H. J. *et al.* Using Raman spectroscopy to characterize biological
materials. *Nat Protoc* **11**, 664-687, doi:10.1038/nprot.2016.036 (2016).
- 34 Mishchenko, M. I. a. T., L. D. and Lacic, A. A.}. Scattering, Absorption, and
Emission of Light by Small Particles. *Cambridge University Press* (2002).
- 35 Marzi, J., Brauchle, E. M., Schenke-Layland, K. & Rolle, M. W. Non-
invasive functional molecular phenotyping of human smooth muscle cells

- utilized in cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater* **89**, 193-205, doi:10.1016/j.actbio.2019.03.026 (2019).
- 36 Movasaghi, Z., Rehman, S. & Rehman, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **42**, 493-541, doi:10.1080/05704920701551530 (2007).
- 37 Rygula, A. *et al.* Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy* **44**, 1061-1076 (2013).
- 38 Wood, B. R. & McNaughton, D. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo. *Journal of Raman Spectroscopy* **33**, 517-523 (2002).
- 39 Draux, F. *et al.* Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study. *Analyst* **134**, 542-548 (2009).
- 40 Krafft, C., Knetschke, T., Siegner, A., Funk, R. H. & Salzer, R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **32**, 75-83 (2003).
- 41 Pascut, F. C. *et al.* Noninvasive detection and imaging of molecular markers in live cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Biophysical Journal* **100**, 251-259 (2011).
- 42 Frushour, B. G. & Koenig, J. L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers* **14**, 379-391, doi:https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140211 (1975).
- 43 Mian, S. A., Colley, H. E., Thornhill, M. H. & Rehman, I. u. Development of a Dewaxing Protocol for Tissue-Engineered Models of the Oral Mucosa Used for Raman Spectroscopic Analysis. *Applied Spectroscopy Reviews* **49**, 614-617, doi:10.1080/05704928.2014.882348 (2014).
- 44 Tu, A. T. Raman spectroscopy in biology. *Principles and Applications* **1** (1982).
- 45 Malini, R. *et al.* Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. *Biopolymers* **81**, 179-193, doi:10.1002/bip.20398 (2006).
- 46 Puppels, G. J., Garritsen, H. S., Segers-Nolten, G. M., de Mul, F. F. & Greve, J. Raman microspectroscopic approach to the study of human granulocytes. *Biophysical Journal* **60**, 1046-1056, doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82142-7 (1991).
- 47 Brazhe, N. A., Treiman, M., Faricelli, B., Vestergaard, J. H. & Sosnovtseva, O. In Situ Raman Study of Redox State Changes of Mitochondrial Cytochromes in a Perfused Rat Heart. *PLOS ONE* **8**, e70488, doi:10.1371/journal.pone.0070488 (2013).
- 48 Nishiki-Muranishi, N. *et al.* Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy. *Anal Chem* **86**, 6903-6910, doi:10.1021/ac500592y (2014).
- 49 Yamamoto, T. *et al.* Label-free Evaluation of Myocardial Infarct in Surgically Excised Ventricular Myocardium by Raman Spectroscopy. *Sci Rep* **8**, 14671, doi:10.1038/s41598-018-33025-6 (2018).
- 50 Ohira, S. *et al.* Label-free detection of myocardial ischaemia in the perfused rat heart by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep* **7**, 42401, doi:10.1038/srep42401 (2017).

- 51 Zimmermann, E. *et al.* Detection and Quantification of Myocardial Fibrosis Using Stain-Free Infrared Spectroscopic Imaging. *Arch Pathol Lab Med*, doi:10.5858/arpa.2020-0635-OA (2021).
- 52 Tombolesi, N. *et al.* Early cardiac-chamber-specific fingerprints in heart failure with preserved ejection fraction detected by FTIR and Raman spectroscopic techniques. *Sci Rep* **12**, 3440, doi:10.1038/s41598-022-07390-2 (2022).
- 53 Guo, S., Popp, J. & Bocklitz, T. Chemometric analysis in Raman spectroscopy from experimental design to machine learning-based modeling. *Nat Protoc* **16**, 5426-5459, doi:10.1038/s41596-021-00620-3 (2021).
- 54 Luo, R., Popp, J. & Bocklitz, T. Deep Learning for Raman Spectroscopy: A Review. *Analytica* **3**, 287-301, doi:10.3390/analytica3030020 (2022).
- 55 Hollon, T. C. *et al.* Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks. *Nat Med* **26**, 52-58, doi:10.1038/s41591-019-0715-9 (2020).
- 56 Huang, L. *et al.* Rapid, label-free histopathological diagnosis of liver cancer based on Raman spectroscopy and deep learning. *Nat Commun* **14**, 48, doi:10.1038/s41467-022-35696-2 (2023).
- 57 Sugiyama, K. *et al.* Raman microspectroscopy and Raman imaging reveal biomarkers specific for thoracic aortic aneurysms. *Cell Rep Med* **2**, 100261, doi:10.1016/j.xcrm.2021.100261 (2021).
- 58 Jolliffe, I. T. & Cadima, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **374**, 20150202, doi:10.1098/rsta.2015.0202 (2016).
- 59 Laurens van der Maaten, G. H. Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* **9**, 2579-2605 (2008).
- 60 McInnes, L., Healy, J., Saul, N. & Großberger, L. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. *Journal of Open Source Software* **3**, doi:10.21105/joss.00861 (2018).
- 61 McInnes, L. *UMAP*, 2018).
- 62 RStudio-Team. *RStudio: Integrated Development for R.*, <<http://www.rstudio.com/>> (2020).
- 63 Satija, R. & Hoffmann, P. *SEURAT - R toolkit for single cell genomics*, accessed 05/22/2022).
- 64 Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* **36**, 411-420, doi:10.1038/nbt.4096 (2018).
- 65 Hao, Y. *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **184**, 3573-3587 e3529, doi:10.1016/j.cell.2021.04.048 (2021).
- 66 Zhao, E. *et al.* Spatial transcriptomics at subspot resolution with BayesSpace. *Nat Biotechnol* **39**, 1375-1384, doi:10.1038/s41587-021-00935-2 (2021).
- 67 Shang, L. & Zhou, X. Spatially Aware Dimension Reduction for Spatial Transcriptomics. doi:10.1101/2022.01.19.476966 (2022).
- 68 Trapnell, C. *Constructing single-cell trajectories*, <<https://cole-trapnell-lab.github.io/monocle3/docs/trajectories/>> (2019).

- 69 Zbinden, A. *et al.* Nidogen-1 Mitigates Ischemia and Promotes Tissue Survival and Regeneration. *Adv Sci (Weinh)* **8**, 2002500, doi:10.1002/advs.202002500 (2021).
- 70 Frushour, B. G. & Koenig, J. L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers* **14**, 379-391, doi:10.1002/bip.1975.360140211 (1975).
- 71 Draux, F. *et al.* Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study. *Analyst* **134**, 542-548, doi:10.1039/b812610k (2009).
- 72 Krafft, C., Knetschke, T., Siegner, A., Funk, R. H. W. & Salzer, R. Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **32**, 75-83, doi:10.1016/s0924-2031(03)00049-3 (2003).
- 73 Trapnell, C. *et al.* The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* **32**, 381-386, doi:10.1038/nbt.2859 (2014).
- 74 Qiu, X. *et al.* Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods* **14**, 979-982, doi:10.1038/nmeth.4402 (2017).
- 75 Borst, O. *et al.* Methods employed for induction and analysis of experimental myocardial infarction in mice. *Cell Physiol Biochem* **28**, 1-12, doi:10.1159/000331708 (2011).
- 76 Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **62**, 24-35, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.023 (2013).
- 77 Ärzteblatt, D. *Spezial-Mikroskop soll Tumordiagnostik schneller und genauer machen*, accessed 05/27/2022).
- 78 Shin, H. *et al.* Single test-based diagnosis of multiple cancer types using Exosome-SERS-AI for early stage cancers. *Nat Commun* **14**, 1644, doi:10.1038/s41467-023-37403-1 (2023).

6 Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden hier veröffentlicht:

- 1.) **Sigle M**, *et al.* Translating genomic tools to Raman spectroscopy analysis enables high-dimensional tissue characterization on molecular resolution. *Nat Commun* **14**, 5799 (2023).

Eigenbeteiligung:

- Konzipierung der Studie, Entwicklung der Methodik, Verfassung der R-Skripte, statistische Auswertung
- Verfassen des Manuskripts
- Etablierung des Tiermodells der chronischen Herzhypertrophie (Ang II), Durchführung des Tierversuchs (Operation, Ultraschall, Tötung und Organentnahme)
- Anfertigung FFPE und Cryosections, klassische Histologie inklusive Auswertung
- Raman Scan des Großteils der Schnitte

An folgendem Projekt wurde im Rahmen der Dissert. zusätzlich mitgearbeitet:

- 2.) Rohlfing AK, Kolb K, **Sigle M**, *et al.* ACKR3 regulates platelet activation and ischemia-reperfusion tissue injury. *Nat Commun* **13**, 1823 (2022).

Eigenbeteiligung:

- murine Echokardiographie der Versuchstiere für den Versuchsteil Agonisten und 28 Tage Reperfusion, inklusive Auswertung
- Etablierung und Auswertung 3D Strain Analyse
- Organentnahme, Anfertigung FFPE-Schnitte, klassische Histologie (HE-Färbungen, Picro-Siriusrot-Färbungen), IHC (CD31, TNF- α , IL-1 β), inklusive Auswertung
- multidimensionale FACS-Analyse (Omiq-Plattform)
- statistische Auswertung
- Genotypisierung der verwendeten Tierlinien (Acr3, Pf4-Cre, ROSA)

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ang II	Angiotensin II
<i>ApoE</i>	Gen für das Apolipoprotein E
ca.	circa
d	Tag, Tage
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DEG	Differentially Expressed Gene (differenziell exprim. Gen)
EF	Ejection fraction, Ejektionsfraktion
engl.	Englisch
FS	Fractional shortening; Verkürzungsfraction
h	Stunde, Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
LAD	left anterior descending (coronary) artery
LV	linker Ventrikel, linksventrikulär
min	Minute, Minuten
NaCl	Natriumchlorid, physiologische Kochsalzlösung
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	Principal Component Analysis; Hauptkomponenten-Analyse
px	Pixel
sog.	sogenannte,r,s
Tab.	Tabelle
tSNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin III für Kardiologie und Angiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Meinrad Gawaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie, Entwicklung und Umsetzung der neuartigen Methode erfolgte durch Herrn Manuel Sigle. Die Idee zur Anwendung der Raman-Spektroskopie bei kardialen Pathologien stammt von Prof. Gawaz.

Das Mausmodell der Ang II-induzierten kardialen Hypertrophie wurde von Herrn Manuel Sigle etabliert und vollständig von ihm durchgeführt (Operationen, Ultraschall). Dazu lag eine Ausnahmegenehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen vor. Die Versuche zum Mausmodell des Myokardinfarkts wurde von Frau Dr. Jessica Sudmann und Frau Dr. Rohlfing durchgeführt (Operationen, Ultraschall). Alle histologischen Schnitte und Färbungen wurden von Herrn Sigle vorgenommen. Die Multicolor-Immunfluoreszenzfärbungen wurden von Frau Sophia Scheuermann und Frau Ulla Graeßner am MACSima™ Imaging System der Abteilung I der Kinderklinik Tübingen durchgeführt. Der Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Raman Scans wurde von Herrn Sigle eigenständig durchgeführt. Die Einweisung erfolgte zuvor durch Frau Dr. Julia Marzi, durch die auch eine Einführung in die Standard-Auswertung von Raman-Daten (TCA, PCA) erfolgte. Die Interpretation spezifischer Raman Peaks erfolgte mit Unterstützung von Frau Dr. Julia Marzi. Die Messungen für die Spatial Metabolomics (MALDI Mass Spectrometry Imaging) wurde von Frau Dr. Na Sun und Prof. Dr. Axel Walch vom Helmholtz Institut München vorgenommen. Die Rohdaten wurden Herrn Sigle für die integrative Analyse zur Verfügung gestellt. Die Deep Learning Modelle wurden von Martin Kenny, PhD entwickelt und auf die zur Verfügung gestellten Raman-Daten angewandt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den _____

Manuel Sigle

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre ideelle, materielle oder emotionale Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Meinrad Gawaz, Ärztlicher Direktor der Medizinischen Klinik III für Kardiologie und Angiologie Tübingen. Er begleitete meinen wissenschaftlichen Werdegang von Anfang an, war immer für mich erreichbar und wusste mich fachlich und motivierend zu unterstützen. Es ist ein Privileg einen Mentor zu haben, der sich in einem solchen Maß um einen kümmert.

Weiter möchte ich Frau Dr. Julia Marzi, Junior-Arbeitsgruppenleiterin im Labor von Frau Prof. Dr. Schenke-Layland danken. Sie hat mich in die Raman-Welt eingeführt, die Standard-Analysen beigebracht und sich viel Zeit genommen für die Diskussion meiner zahllosen Ideen und Einfälle. Herzlichen Dank auch für die Erlaubnis zur Benutzung der Gerätschaften und des Raman-Mikroskops im Schenke-Layland Lab.

Ebenso danke ich Frau Dr. Rohlfing, Prof. Seizer und Dr. David Heinzmann für die Betreuung und Unterstützung.

Den Doktoranden der AG Gawaz sowie den weiteren Labormitarbeiterinnen und -mitarbeitern möchte ich für die großartige Arbeitsatmosphäre im Labor danken.

Außerdem will ich meiner Familie für den emotionalen Support danken.

Zuletzt möchte ich meinen Dank dem IZKF Promotionskolleg Tübingen aussprechen, das diese Arbeit finanziell unterstützt hat.