

Raman-Spektroskopie – ein leistungsstarkes Werkzeug für biomedizinische Forschung

Michael Schmitt¹ und Jürgen Popp^{1,2}

¹*Institut für Physikalische Chemie und Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-Universität Jena*

²*Institut für Photonische Technologien e.V., Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena*

Im letzten Jahrzehnt konnte ein geradezu explosionsartiger Anstieg an Anwendungen der Raman-Spektroskopie, besonders zur Lösung biomedizinischer Fragestellungen beobachtet werden [1-4]. Neue Konzepte für die Krebsdiagnostik bis hin zur schnellen Erkennung von Sepsis-Erregern gehörten dabei zu den brennenden Fragen, die mittels innovativer Raman-basierter Ansätze erfolgreich beantwortet wurden. Die Raman-Spektroskopie basiert auf dem Streuverhalten von Licht, mit dessen Hilfe molekulare Schwingungen erfasst werden können. Diese Schwingungen sind eindeutig für jede Art von Molekülen bzw. ihre funktionellen Gruppen. Ein Raman-Spektrum kann daher als eine Art charakteristischer „optischer Fingerabdruck“ einer molekularen Spezies interpretiert werden, was die Identifikation organischer, anorganischer oder biologischer Komponenten ermöglicht. Für die Untersuchung biologischer Proben hat sich die Raman-Mikrospektroskopie als besonders wertvoll erwiesen. Durch die Kombination eines Raman-Aufbaus mit einem Mikroskop ist es problemlos möglich Strukturen im Submikrometer-Bereich zu analysieren, d. h. nicht-invasiv und labelfrei Raman-Bilder mit chemischem Kontrast, d. h. hoher molekularer Selektivität aufzunehmen [2-3].

Im Rahmen dieses Beitrags werden neuste eigene Arbeiten auf dem Gebiet innovativer Raman-Spektroskopie zur Beantwortung biomedizinischer Fragestellungen, wie z. B. der schnellen Identifizierung von Mikroorganismen und einer objektiven klinischen Zell- und Gewebe Charakterisierung, kurz allgemein zusammengefasst. Details können den angegebenen Originalpublikationen entnommen werden.

Pathogendiagnostik

So eignet sich die Raman-Mikrospektroskopie besonders für die Untersuchung einzelner Bakterien, die eine ähnliche Größe wie der fokussierte Laserstrahl aufweisen. Durch die Verwendung der Raman-Mikrospektroskopie in Kombination mit chemometrischen Analyseverfahren (siehe auch Zell- und Gewebediagnostik), ist es möglich einzelne Bakterien und Hefen – ohne eine zeitaufwendige Kultivierung – zu identifizieren [5-12]. Eine solche

schnelle und verlässliche Identifizierung von Bakterien, welche vielfach als Verursacher für Krankheiten, Allergien oder Lebensmittelverderb bekannt sind, aus unterschiedlicher Umgebung (z. B. aus humanen Proben aber auch aus Luft, Wasser, Fleisch) ist von großer Wichtigkeit, um Erkrankungen von Patienten und Konsumenten, aber auch Produktionsausfälle der Industrie zu verhindern. Eine Möglichkeit einzelne Mikroorganismen in komplexen Probenmatrices zu lokalisieren, ist die aktive Fluoreszenzfärbung [13-15]. Wichtig hierbei ist, dass sich die Farbstoffabsorption und die verwendete Raman-Anregungswellenlänge spektral unterscheiden, um fluoreszenzuntergrundfreie Raman-Spektren der Bakterien zu erhalten. Dieses Verfahren der Auswahl bzw. Vorsortierung relevanter Partikel (meist lebende Bakterien) durch Fluoreszenzfärbung und anschließender Identifizierung mittels der Raman-Mikrospektroskopie wurde vor Kurzem kommerzialisiert und in ein automatisiertes Messsystem den Bio-Partikel-Explorer, überführt. Dabei erfolgt zuerst eine Lokalisierung aller Partikel mittels Dunkelfeld-Mikroskopie. Im Anschluss daran wird durch einen Vergleich mit den Fluoreszenzaufnahmen die Lage möglicher Bakterien bestimmt, welche dann in einem letzten Schritt mit dem Raman-Anregungslaser angefahren werden, um einen „molekularen Fingerabdruck“ des Bakteriums zu registrieren. Dieser „molekulare Fingerabdruck“ wird dann durch speziell entwickelte chemometrische Auswerteverfahren mit bekannten „Fingerabdrücken“ aus einer Datenbank verglichen. Dadurch ist es möglich Bakterien innerhalb einer realen Probenmatrix, wie z. B. Boden, innerhalb weniger Stunden zu identifizieren. Der Biopartikel-Explorer ist vor allem für Krankenhäuser sowie für Produzenten von Medikamenten und Lebensmitteln eine wichtige Hilfe beim Nachweis schädlicher Keime in der Raumluft. Ein schneller Nachweis von auftretenden Keimen in der Luft ermöglicht es dort, schnell Gegenmaßnahmen einzuleiten, um drohende gesundheitliche und finanzielle Schäden abzuwenden.

Während Raman-Mikrospektroskopie eine extrem leistungsstarke Methode ist, um einzelne Bakterienzellen zu untersuchen, wird ihr Einsatz zur Untersuchung und Identifizierung einzelner Viren durch deren 100 mal kleineren Größe im Vergleich zu Bakterien und den intrinsisch schwachen Raman-Effekt behindert. Eine Methode, um Raman-Banden zu verstärken, ist die sogenannte oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (*surface enhanced Raman spectroscopy* - SERS) [16,17]. Dabei nutzt man die Eigenschaften von nanostrukturierten Metallobjekten aus, welche eine ausgeprägte elektromagnetische Feldverstärkung erreichen. Durch die Wechselwirkung dieser starken elektromagnetischen Felder mit Analyt-Molekülen werden deren Raman-Banden um 3 – 6 Größenordnungen verstärkt. Dieser Effekt kann durch die Verwendung von besonders „spitzen“ Strukturen und Dimeren von Metallpartikeln bis zu 10^{11}

erhöht werden. Die gebräuchlichsten Materialien für die Herstellung sogenannter SERS-Substrate sind Silber und Gold. Um die örtliche Auflösung und die Sensitivität der Raman-Spektroskopie zu erhöhen und damit den Bereich der nanobiologischen Analytik zu erschließen, wird nun die SERS-Technologie mit der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* - AFM) kombiniert. Dieses Verfahren wird spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (*tip enhanced Raman spectroscopy* - TERS) genannt [18,19]. Dabei wird der Laserstrahl von unten auf eine silberbeschichtete AFM-Spitze fokussiert, während die Probe unabhängig dazu bewegt wird. Das verstärkte Raman-gestreute Licht der Probe wird dann mit einem Mikroskopobjektiv gesammelt, mit dem auch die Probe bestrahlt wird. Mittels eines solchen TERS-Aufbaus gelang es Raman-Spektren einzelner Tabak-Mosaik-Viren von ungefähr 300 nm Länge und 20 nm Breite aufzunehmen [20]. Dabei zeigte sich, dass alle TERS-Banden entweder Protein- oder RNA-Schwingungen zugeordnet werden können. Die TERS-Spektroskopie ist somit eine leistungsstarke Methode, die sowohl detaillierte Informationen über die Morphologie (AFM-Aufnahme) als auch präzise molekulare Fingerprint-Informationen (Raman-Spektren) von einzelnen Viren liefern kann. Diese Methode öffnet damit neue Möglichkeiten für eine schnelle Identifikation von Einzelviren, da jede Virus-Spezies eine individuelle biochemische Zusammensetzung vorweist und somit der spektroskopische Raman-Fingerabdruck hochspezifisch ist. Voraussetzung dabei ist allerdings die Erstellung einer Datenbank mit allen infrage kommenden Spezies.

Zell- und Gewebediagnostik

Die Entschlüsselung der molekularen Fingerabdrücke von Krankheiten steht heutzutage weit oben auf der Prioritätenliste biomedizinischer Forschung. Detailliertes Wissen über die Änderungen der chemischen Zusammensetzung bei pathologischen Zell- und Gewebefunktionen kann die Entwicklung neuartiger Therapieansätze potenziell beeinflussen, einschließlich der Entwicklung effektiverer und wirkungsgenauerer Medikamente. In den letzten Jahren hat die Raman-Spektroskopie gezeigt, dass sie alle diese zuvor genannten Anforderungen erfüllt und daher eine extrem leistungsstarke biomedizinische Diagnostikmethode für das Studium von eukaryotischen Zellen und Gewebe darstellt [2,3].

Ein intensiv erforschtes Gebiet ist die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen. Basierend auf solchen Zellen kann man den Primärtumor einer Tumorerkrankung diagnostizieren, dessen Grad erkennen und die optimale, patientenspezifische Behandlung vorschlagen. Die eindeutige

Identifizierung der wenigen Krebszellen neben den vielen gesunden Blutzellen stellt jedoch eine sehr große Herausforderung dar. Momentan wird als neuer Ansatz die Raman-Spektroskopie mit optischen Fallen in mikrofluidischen Systemen kombiniert, um Tumorzellen unter nicht-destruktiven Bedingungen zu identifizieren, zu sortieren und diese für weitere Experimente zu nutzen. Bisher konnten erfolgreich chemometrische Klassifikationsmodelle (siehe auch weiter unten) entwickelt werden, die es erlauben, Zellen, die im peripheren Blut gefunden werden können, anhand ihrer Raman-Spektren zu unterscheiden und zu identifizieren. Ein erstes Modell wurde auf getrocknete Zellen angewendet [21], das dann zur Analyse von Zellen in Lösung weiterentwickelt wurde [22]. Als Beispielzellen wurden Leukozyten und Erythrozyten aus menschlichem Blut, sowie Leukämiezellen (OCI-AML3) und zwei Brustkrebs-Zelllinien (MCF-7 und BT-20) verwendet. Die Raman-Messungen wurden mit einer Anregung von 785 nm durchgeführt. Bei den Messungen in Lösung diente der Raman-Laser gleichzeitig als optische Pinzette, um die Zellen während der Messung (2-10 Sekunden) zu fangen. Erste aussichtsreiche Schritte zur automatisierten Zellsortierung konnten in einem Mikrofluidikchip in einer quadratischen Kapillare realisiert werden [23]. Um die Zellen während der Messdauer von mehreren Sekunden stabil zu halten, wurden optische Pinzetten, die auf einem fokussierten Laserstrahl basieren, oder optischen Fallen, die auf zwei divergenten Laserstrahlen basieren, verwendet. Die Zellen werden über ein Spritzenpumpensystem in die Kapillare injiziert, gefangen und ein Raman-Spektrum wird registriert. Dazu wurden ebenfalls Klassifikationsmodelle trainiert, um die oben genannten Zellen zu identifizieren. Die Raten der korrekten Klassifikation waren in allen Ansätzen in ähnlicher Größenordnung (> 99%). Dieser Ansatz bietet das Potenzial ein vollautomatisches RACS (*Raman-activated cell sorting*) an Einzelzellen zu realisieren. Zellen, welche sich in der Falle befinden, werden mit einem Video-System erkannt. Anschließend wird ein Raman-Spektrum von der Zelle aufgenommen und die Zellen mit einem Klassifikationsmodell identifiziert. Das Ergebnis bewirkt, dass Spritzenpumpen die Zellen in den gewünschten Kanal leiten. Die getrennten Zellen befinden sich in einer Spritze und können einer weiteren Verwendung, zum Beispiel Kultivierung, zugeführt werden.

Neben einzelnen Zellen können auch ganze Gewebeschnitte, wie sie bei Biopsien oder Operationspräparaten anfallen, auf molekularer Ebene mit der Raman-Mikroskopie untersucht werden [2,3]. Der pathologische Goldstandard bildet die Histopathologie, d. h. die mikroskopische Krankheitsdiagnostik an speziell gefärbten Gewebeschnitten. Dabei ist die am weitesten verbreitete Färbemethode zur morphologischen Charakterisierung von Gewebe die Hämatoxylin-Eosin (= H&E) - Färbung.

Färbefreie molekular spektroskopische Bildgebungsverfahren, wie die Raman-Mikrospektroskopie, sind extrem vielversprechende Methoden etablierte klinische Diagnosemethoden wie die Histopathologie zu unterstützen bzw. zu ergänzen, da sie das Potenzial für eine objektive medizinische Diagnostik aufweisen. Jedoch bedarf es dazu der Entwicklung innovativer mathematischer Ansätze, um die Zusammenhänge zwischen der molekularen Gewebestruktur und den spezifischen krankheitsbedingten Raman-Signaturen aufzuklären [24-27]. Mit anderen Worten, um die Gewebe-Raman-Signaturen, wie auch die weiter oben beschriebenen zellulären Raman-Fingerabdrücke für diagnostische Zwecke nutzen zu können, bedarf es einer sorgfältigen Spektrenanalyse und Klassifizierung mittels hochspezifischer chemometrischer Analyseverfahren. So konnte durch die Auswertung von Raman-Images von menschlichen Darmschnitten mit einem zwei-Stufen-Klassifizierungsverfahren eindeutig zwischen den entzündlichen Darmerkrankungen „Morbus Crohn“ und „Colitis ulcerosa“ unterschieden werden [28]. In der ersten Klassifizierungsstufe wurde die Gewebemorphologie visualisiert, um die Raman-Spektren des Epithelgewebes aus den Raman-Scans herauszufiltern, da das intestinale Epithel, welches als immunophysiologische Barriere wirkt, ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von entzündlichen Darmerkrankungen darstellt, d. h. nur die Epithelgeweberegionen sind für eine Diagnose von entzündlichen Darmerkrankungen geeignet. Dazu wurde mittels dem Vergleich der Raman-Bilder und dem korrespondierenden H&E-gefärbten Schnitt eine Einteilung in die fünf Gruppen Schleim, Bindegewebe, Epithel, Blut und nicht notierbar durchgeführt. Diese fünf Gruppen wurden mit einer sog. SVM (*Support Vector Machine*) erlernt, sodass eine solche Einteilung automatisch aus den Raman-Spektren erzeugt werden kann. So konnte ein auf statistischen Grundlagen basierendes Modell erstellt werden, das die Expertise eines Pathologen simulieren kann, indem die entsprechenden Informationen aus Raman-Spektren gefiltert werden. Dies ermöglicht die Einschränkung des Untersuchungsbereichs auf das Epithel, von dem aus eine Diagnose der beiden entzündlichen Darmerkrankungen untersucht werden kann. In anderen Worten nachdem ein medizinisch sinnvolles Vorfiltern automatisiert werden konnte, war es möglich zu testen, ob und inwieweit sich das Epithelgewebe von an „Colitis Ulcerosa“ und „Morbus Crohn“ erkrankten Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe unterscheidet. Zugleich konnte überprüft werden, ob sich Entzündungen in den Raman-Scans niederschlagen. So gelang es mit den Raman-Spektren des Epithelgewebes der drei Gruppen „Colitis Ulcerosa“, „Morbus Crohn“ und der gesunden Kontrollgruppe eine SVM zu trainieren, die eine Klassifikationsrate von 98,90% besitzt. Dies zeigt, dass mittels eines solchen hierarchischen

Klassifikationssysteme eine objektive Diagnose von entzündlichen Darmerkrankungen basierend auf der Raman-Mikrospektroskopie möglich ist.

All diese Beispiele zeigen, dass sich die Raman-Spektroskopie besonders für eine labelfreie und chemisch empfindliche Mikrospektroskopie von Zellen und Gewebe eignet, da die chemische Empfindlichkeit aufgrund der selektiven Vibrationsstruktur der Analyten zustande kommt [2,3]. Jedoch liegen die verschiedenen molekularen Bausteine in Zellen und Gewebe mitunter in sehr geringen Konzentrationen vor, was zu niedrigen Raman-Signal-Intensitäten und daher zu langen Aufnahmezeiten führt. Um diesen Nachteil auszugleichen, werden Mittel zur Verstärkung des Raman-Signals eingesetzt. Kohärente anti-Stokesche Raman-Spektroskopie (*coherent anti-Stokes Raman spectroscopy* - CARS), eine nichtlineare Variante der Raman-Spektroskopie, gehört zu den meistversprechenden Techniken, da sie Signalverstärkung, basierend auf ihrer kohärenten Natur, mit weiteren Vorteilen wie einer gerichteten Abstrahlung, einer schmalen spektralen Bandbreite und dem Fehlen eines bei der normalen Raman-Spektroskopie oft störenden Autofluoreszenz-Hintergrunds kombiniert [29]. CARS-Mikroskopie erlaubt eine schnelle Bilderfassung (bis hin zu Echtzeit), welche die Verteilung der Raman-Intensität einer bestimmten molekularen Schwingung innerhalb der Probe zeigt. So konnte gezeigt werden, dass CARS-Bilder von dünnen Darmschnitten gut mit den entsprechenden Raman-Images korrelieren [30]. Während CARS-Bilder jedoch univariate Datensätze darstellen (d. h. räumliche Verteilung einer einzelnen Raman-Mode) sind die Raman-Maps von multivariater Natur (d. h. bestehen aus einem kompletten Raman-Spektrum für jeden einzelnen Bildpunkt). So lassen sich zwar Abweichungen innerhalb von Darmgewebeschnitten von gesundem, entzündlichem und karzinogenem Material sowohl in den CARS- wie auch Raman-Bilder visualisieren, eine genaue Identifikation der Gewebeart sowie die molekulare Charakterisierung der Abweichungen zwischen den verschiedenen Gewebeschnitten ist jedoch nur mittels einer genauen chemometrischen Auswertung der multivariaten Raman-Bilder möglich. D. h. , eine genaue molekulare Identifizierung des Gewebetyps kann nur durch die Analyse von mehreren Raman-Moden erfolgen. Daher stellt ein kombinierter Raman-CARS Ansatz, bei dem durch die chemometrische Auswertung von Raman-Maps kleiner Flächen spektrale Regionen und spektrale Markerbanden zur Gewebeklassifizierung identifiziert werden, die dann mittels CARS-Imaging großflächig und mit hoher Geschwindigkeit abgefragt werden, eine vielversprechende Methode für eine biomedizinische Echtzeitdiagnostik dar [2,3,29,30].

Die diagnostische Aussagekraft eines derartigen kombinierten Raman-CARS Ansatzes, welcher die komplementären Stärken von Raman- und CARS-Mikrospektroskopie ausnutzt, lässt sich erhöhen durch die Kombination mit weiteren nicht-linearen optischen Bildgebungsverfahren wie der Erzeugung der zweiten Harmonischen (*second-harmonic generation* - SHG) und der Zwei-Photonen-Fluoreszenz (*two-photon fluorescence* - TPF). Ein derartiger multimodaler Mikroskopie-Ansatz, welcher die Entschlüsselung molekularer Fingerabdrücke mittels Raman-Spektroskopie mit schnellen nichtlinearen Mikroskopie-Verfahren wie CARS, SHG und TPF kombiniert, liefert wertvolle Informationen über die morphochemische Struktur der untersuchten Gewebeproben. D. h. Raman bzw. CARS liefert chemische Informationen, während SHG und TPF morphologische Details hervorheben. SHG-Mikroskopie ist empfindlich gegenüber höchst geordneten, aber nicht zentrosymmetrischen Strukturen. Bei biologischem Gewebe ist diese Bedingung hauptsächlich für kollagene Strukturen erfüllt. Bei TPF regen zwei Photonen Moleküle im Gewebe an, deren Fluoreszenz dann detektiert wird. Mittels spektralem Entmischen können verschiedene Autofluorophore in der Gewebeprobe wie z. B. NADP(H), Flavine, Elastin etc. unterschieden werden. Der große Vorteil dieses Verfahrens ist, dass keine externen Färbemittel benötigt werden. Die drei nichtlinearen optischen Mikroskopie-Werkzeuge, d. h. CARS, SHG und TPF heben jeweils verschiedene Aspekte der Gewebezusammensetzung hervor. Ihre gemeinsame Integration zu einem multimodalen Bildgebungsansatz stellt den Schlüssel für eine leistungsstarke klinische Diagnostik dar. Verglichen mit herkömmlichen histopathologisch gefärbten Mikroskopie-Bildern enthüllt die multimodale CARS/SHG/TPF Bildgebung einen umfangreichen Blick auf das Gewebe. Ergebnisse aus dem Bereich der Neuropathologie [31], Dermatologie [32,33] und Hals-Nasen-Ohren-Medizin [34] illustrieren die erfolgreichen Schritte auf dem Weg, die multimodale Bildgebung als ein Werkzeug mit großem Potenzial in der pathologisch klinischen Diagnostik zu etablieren. Die Ergänzung dieses multimodalen Bildgebungsansatzes durch automatische Mustererkennung ermöglicht zudem eine quantitative Auswertung der erhaltenen multimodalen Images und ist ein weiterer Schritt in Richtung schneller klinischer Gewebebeurteilung [35-37].

Für eine *In-vivo*-Anwendung der Raman-Spektroskopie bzw. der nicht-linearen Echtzeit-Bildgebungsverfahren müssen diese jedoch in einen endoskopischen Ansatz überführt werden [3,38]. So wurden vor kurzem erste *In-vivo*-Raman-Experimente an Kaninchen zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzungen von arteriosklerotischen Ablagerungen (Plaques) innerhalb der Aorta mit faseroptischen Raman-Sonden durchgeführt [39]. Informationen über die chemischen Zusammensetzungen der Plaques zu erhalten, ist für einen

Kardiologen von großem Interesse. Der verwendete Raman-Sondenkopf besteht aus einer zentralen Anregungsfaser, umgeben von zwölf Erfassungsfasern. In die Sondenhülse sind Bandpass- und Langpassfilter integriert. Die gewählte Sondengeometrie ermöglicht das komfortable Einführen in Blutgefäße durch einen flexiblen Katheder. Die Raman-Spektren wurden mit Hilfe eines 785 nm Laser aufgenommen, da diese Wellenlänge als nichtinvasiv für biologisches Gewebe gilt. Die Bestrahlungszeiten variierten von 3 s bis 10 s – ausreichend um spektrale Informationen guter Qualität zu erhalten. Die Raman-Spektren welche an verschiedenen Positionen innerhalb der Aorta aufgenommen wurden, zeigen signifikante spektrale Unterschiede, aufgrund von dominierenden Eigenschaften von Proteinen oder Lipiden. Aktuell werden neue dedizierte Fasern und Sondengeometrien entwickelt, um die Empfindlichkeit und Flexibilität für zukünftige *In-vivo*-Anwendungen zu steigern. Eine Klassifizierungsroutine soll zukünftig automatisierte *In-vivo* Gewebsanalysen ermöglichen.

Zusammenfassung & Ausblick

Die vorgestellten Arbeiten aber auch eine Vielzahl andere nationaler und internationaler Aktivitäten im Bereich Raman-basierter Analytik (siehe [2,3,38]) zeigen, dass große Potenzial der Raman-Spektroskopie und verschiedener Raman-Technologien wie z. B. SERS, TERS, CARS etc. als extrem leistungsstarke Methode zur Adressierung biomedizinischer Fragestellungen wie einer schnellen Pathogendiagnostik oder einer objektiven Zell- und Gewebediagnostik für eine verlässliche Diagnose von Krankheiten wie z. B. Krebs. Zukünftig müssen die verschiedenen Raman-Ansätze in faseroptischen Sonden überführt werden, um so endoskopische *In-vivo*-Untersuchungen durchführen zu können. Das große Leistungsvermögen Raman-basierter Analytik mittels optischer Sonden für *In-vivo*-Untersuchungen wird in den nächsten Jahren weiter erschlossen werden.

Danksagung

Der Europäischen Union über das Thüringer Kultusministerium, der Thüringer Aufbaubank dem Bundesministerium für Bildung und Forschung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie wird für die finanzielle Unterstützung unserer Forschungsaktivitäten gedankt.

Literatur

- [1] M. Schmitt, J. Popp, "Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century." *J. Raman Spectrosc.* 37, 20-28 (2006).
- [2] C. Krafft, B. Dietzek, J. Popp, "Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues." *Analyst*, 134, 1046-1057 (2009).
- [3] C. Krafft, B. Dietzek, M. Schmitt, J. Popp, "Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications." *J. Biomed. Opt.* 17, 040801/1-040801/15 (2012).
- [4] A. Downes, A. Elfick, "Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine." *Sensors*. 10, 1871-1889 (2010).
- [5] M. Harz, P. Rösch, J. Popp, "Vibrational Spectroscopy - A Powerful Tool for the Rapid Identification of Microbial Cells at the Single-Cell Level." *Cytometry A*, 75A, 104-113 (2009).
- [6] M. Harz, M. Kiehntopf, S. Stöckel, P. Rösch, E. Straube, T. Deufel, J. Popp, "Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy." *J. Biophoton.* 2, 70-80 (2009).
- [7] P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, H.-W. Motzkus, M. Lankers, S. Hofer, H. Thiele, J. Popp, "Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: Application to clean-room-relevant biological contaminations." *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1626-1637 (2005).
- [8] P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, J. Popp, "Raman spectroscopic identification of single yeast cells." *J. Raman Spectrosc.* 36, 377-379 (2005).
- [9] P. Rösch, M. Harz, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, J. Popp, "Identification of Single Eukaryotic Cells with Micro-Raman Spectroscopy." *Biopolymers*, 82, 312-316 (2006).
- [10] U. Schmid, P. Rösch, M. Krause, M. Harz, J. Popp, K. Baumann, "Gaussian mixture discriminant analysis for the single-cell differentiation of bacteria using micro-Raman spectroscopy." *Chemometr. Intell. Lab. 96*, 159-171 (2009).
- [11] S. Stöckel, W. Schumacher, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, "Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores." *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2895-2907 (2010).
- [12] S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, "Raman-spectroscopic detection of Anthrax endospores in hoax material." *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 5339 -5342 (2012).
- [13] M. Krause, B. Radt, P. Rösch, J. Popp, "The identification of single living bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy." *J. Raman Spectrosc.* 38, 369-372 (2007).
- [14] M. Krause, P. Rösch, B. Radt, J. Popp, "Localizing and identifying living bacteria in an abiotic environment by a combination of Raman and fluorescence microscopy." *Anal. Chem.* 80, 8568-8575 (2008).
- [15] S. Meisel, S. Stöckel, M. Elschner, P. Rösch, J. Popp, "Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility to Raman spectroscopy." *Analyst*, DOI: 10.1039/c1an15761b (2012).
- [16] K. Hering, D. Cialla, K. Ackermann, T. Dörfer, R. Möller, H. Schneidewind, R. Mattheis, W. Fritzsche, P. Rösch, J. Popp, "SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics." *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 113-124 (2008).
- [17] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends." *Anal Bioanal Chem.* 403, 27-54 (2012).
- [18] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, "Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy." *Chem. Phys. Lett.* 318, 131-136 (2000).

- [19] U. Neugebauer, P. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, V. Deckert, "On the Way to Nanometer-Sized Information of the Bacterial Surface by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy." *ChemPhysChem* 7, 1428-1430 (2006).
- [20] D. Cialla, T. Deckert-Gaudig, C. Budich, M. Laue, R. Möller, D. Naumann, V. Deckert, J. Popp, "Raman to the limit: tip-enhanced Raman spectroscopic investigations of a single tobacco mosaic virus," *J. Raman Spectrosc.* 40, 240-243 (2009).
- [21] U. Neugebauer, J. H. Clement, T. Bocklitz, C. Krafft, J. Popp, "Identification and differentiation of single cells from peripheral blood by Raman spectroscopic imaging." *J. Biophoton.* 3, 579-587 (2010).
- [22] U. Neugebauer, T. Bocklitz, J. H. Clement, C. Krafft, J. Popp, "Towards detection and identification of circulating tumor cells using Raman spectroscopy." *Analyst*, 135, 3178–3182 (2010).
- [23] S. Dochow, C. Krafft, U. Neugebauer, T. Bocklitz, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert, J. Popp, "Tumor cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments." *Lab Chip*, 11, 1484-1494 (2011).
- [24] T. Bocklitz, M. Putsche, C. Stüber, J. Käs, A. Niendorf, P. Rösch, J. Popp, "A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis." *J. Raman Spectrosc.* 40, 1759-1765 (2009).
- [25] N. Bergner, C. Krafft, K. D. Geiger, M. Kirsch, G. Schackert, J. Popp, "Unsupervised unmixing of Raman microspectroscopic images for morphochemical analysis of non-dried brain tumor specimens." *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 719-725 (2011).
- [26] M. Hedegaard, C. Krafft, H. J. Ditzel, L. E. Johansen, S. Hassing, J. Popp, "Discriminating Isogenic Cancer Cells and Identifying Altered Unsaturated Fatty Acid Content as Associated with Metastasis Status, Using K-Means Clustering and Partial Least Squares-Discriminant Analysis of Raman Maps." *Anal. Chem.* 82, 2797–2802 (2010).
- [27] C. Krafft, M. Alipour Diderhoshan, P. Recknagel, M. Miljkovic, M. Bauer, J. Popp, "Crisp and soft multivariate methods visualize individual cell nuclei in Raman images of liver tissue sections." *Vib. Spectrosc.* 55, 90–100 (2011).
- [28] C. Bielecki, T. W. Bocklitz, M. Schmitt, C. Krafft, C. Marquardt, A. Gharbi, T. Knösel, A. Stallmach, J. Popp, "Classification of inflammatory bowel diseases by means of Raman spectroscopic imaging of epithelium cells." *J. Biomed. Opt.* 17, 076030-1 - 076030-8 (2012).
- [29] C. Evans, X. Xie, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine." *Annu. Rev. Anal. Chem.*, Annual Reviews, 1, 883-909 (2008).
- [30] C. Krafft, A. A. Ramoji, C. Bielecki, N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, P. Rösch, M. Schmitt, B. Dietzek, I. Petersen, A. Stallmach, J. Popp, "A comparative Raman and CARS imaging study of colon tissue." *J. Biophoton.* 2, 303-312 (2009).
- [31] T. Meyer, N. Bergner, C. Bielecki, C. Krafft, D. Akimov, B. F. M. Romeike, R. Reichart, R. Kalff, B. Dietzek, J. Popp, "Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis." *J. Biomed. Opt.* 16, 021113/1-021113/10 (2011).
- [32] N. Vogler, T. Meyer, D. Akimov, I. Latka, C. Krafft, N. Bendsoe, K. Svanberg, B. Dietzek, J. Popp, "Multimodal imaging to study the morphochemistry of basal cell carcinoma." *J. Biophoton.* 3, 728736 (2010).
- [33] N. Vogler, A. Medyukhina, I. Latka, S. Kemper, M. Böhm, B. Dietzek, J. Popp, "Towards multimodal nonlinear optical tomography - experimental methodology." *Laser Phys. Lett.* 8, 617-624 (2011).
- [34] T. Meyer, O. Guntinas-Lichius, F. von Eggeling, G. Ernst, D. Akimov, M. Schmitt, B. Dietzek, J. Popp, "Multimodal nonlinear microscopic investigations on head and neck squamous cell carcinoma: toward intraoperative imaging." *HEAD & NECK— DOI 10.1002/hed.23139* (2012).

- [35] A. Medyukhina, N. Vogler, I. Latka, S. Kemper, M. Böhm, B. Dietzek, J. Popp, "Automated classification of healthy and keloidal collagen patterns based on processing of SHG images of human skin." J. Biophoton. 4, 627-636 (2011).
- [36] A. Medyukhina, T. Meyer, M. Schmitt, B. F. M. Romeike, B. Dietzek, J. Popp, "Towards automated segmentation of cells and cell nuclei in nonlinear optical microscopy." J. Biophoton. DOI 10.1002/jbio.201200096 (2012).
- [37] T. Meyer, N. Bergner, A. Medyukhina, B. Dietzek, C. Krafft, B. F. M. Romeike, R. Reichart, R. Kalf, J. Popp, "Interpreting CARS images of tissue within the C–H-stretching region." J. Biophoton. DOI 10.1002/jbio.201200104 (2012).
- [38] C. Krafft, S. Dochow, I. Latka, B. Dietzek, J. Popp, "Diagnosis and screening of cancer tissues by fiber-optic probe Raman spectroscopy." Biomedical Spectroscopy and Imaging 1, 39–55 (2012).
- [39] C. Matthäus, G. Bergner, C. Krafft, B. Dietzek, B. F. M. Romeike, B. R. Brehm, J. Popp, "Characterization of atherosclerotic plaque-depositions by infrared, Raman and CARS microscopy." Proc. SPIE 8087, 80871D (2011).