

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Katharina Faust

**Etablierung von maschinellem Lernen und konfokaler Raman-  
Spektroskopie zur schnellen, markierungsfreien Identifizierung von  
Glioblastom-Stammzellen:  
Entwicklung einer Technologie für die translationale Anwendung und  
personalisierte Medizin**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Lennard Merlin Wurm  
2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulf D. Kahlert

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Julian Caspers

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

**Wurm, L. M. et al. Rapid, label-free classification of glioblastoma differentiation status combining confocal Raman spectroscopy and machine learning. *Analyst* 148, 6109–6119 (2023). (Wurm *u. a.*, 2023)**

## Zusammenfassung

Glioblastoma Multiforme (GBM) ist der häufigste und aggressivste primär maligne Hirntumor des Erwachsenen. Trotz bedeutender Fortschritte in der onkologischen Forschung und multimodaler Therapiepeiler gehört das GBM zu den tödlichsten Krebsarten.

Als wesentlicher Treiber der Tumormalignität zeichnen sich Glioblastomale Stammzellen (GSCs) aus, da sie Fähigkeiten zu Tumorentstehung, Selbsterneuerung, Invasivität, Adaptivität und Resistenzentwicklung zeigen. Ihre gezielte Identifikation kann daher als Schlüsselfaktor für eine effektivere Behandlung gesehen werden und den Erfolg GSC-adaptierter personalisierter Therapien erhöhen.

In der vorliegenden Dissertation wird ein innovatives präklinisches Diagnoseverfahren etabliert, die konfokale Raman-Spektroskopie, d.h. eine optische, markierungsfreie Technik zur schnellen molekularen Charakterisierung lebender Zellen, mit maschinellem Lernen kombiniert, um GSCs von differenzierten Glioblastomzellen (DGCs) zu unterscheiden. Dieses Verfahren kann hochauflösende intrazelluläre Spektren mit individuellen Zellsignaturen erzeugen und so die biochemischen Vorgänge der Zellen abbilden. Mithilfe serieller Datenverarbeitung und Training verschiedener Klassifikationsalgorithmen konnten wir in der vorliegenden Arbeit eine Methodik etablieren, die eine Unterscheidung der vorgestellten Phänotypen erlaubt. Hierbei konnten wir Veränderungen im Lipid-, Protein- und Nukleinsäureprofil aufdecken und mithilfe von künstlichen Neuronalen Netzen (NN) Eigenschaften identifizieren, die für Stammzeleigenschaften typisch sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass GSCs eine spezifische, erhöhte Anreicherung ungesättigter Lipide und veränderter mitochondrialer Parameter, sowie andere Proteinstrukturen aufweisen. Besonders Messungen des Lipidmetabolismus in lipidhaltigen Zellorganellen, die wir als Lipid Droplets (LD) diskutieren, konnten kombiniert mit NN eine Klassifikationsgenauigkeit von 91,7 % erreichen. Durch *Feature Selection* und Reduktion auf einige relevante Peaks konnten wir hierbei die Messzeit auf wenige Millisekunden beschleunigen.

Die Technologie bietet somit das Potential, anhand der vorgestellten Zellmerkmale diagnostische Marker zur Stammzellidentifikation zu etablieren und translational in den neurochirurgischen Alltag zu implementieren.

Langfristig bietet diese Technologie das Potential in der translationalen Anwendung die Prognose des GBM durch schnelle Stammzelldiagnostik zu verbessern und personalisierter Therapie den Weg zu ebnen, speziell LDs sollten hierbei genauere Berücksichtigung finden.

## Conclusion

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common and most aggressive primary malignant brain tumor in adults. Despite significant advances in oncological research and multimodal therapy approaches, GBMs remain among the deadliest types of cancer.

Glioblastoma stem cells (GSCs) are considered major drivers of tumor malignancy, as they exhibit capabilities for tumor initiation, self-renewal, invasiveness, adaptability, and resistance mechanisms. Their targeted identification can therefore be seen as a key factor for more effective treatment and can increase the success of GSC-adapted personalized therapies.

This dissertation presents an innovative preclinical diagnostic procedure that combines confocal Raman spectroscopy, an optical, label-free technique for the rapid molecular characterization of living cells, with machine learning to distinguish GSCs from differentiated glioblastoma cells (DGCs). This method can generate high-resolution intracellular spectra with individual cell signatures, thereby reflecting the cells' biochemical processes. Through serial data processing, as also comparison and training of different classification algorithms, we established a methodology that allows us to differentiate between the presented phenotypes. In doing so, we uncovered changes in the lipid, protein, and nucleic acid profiles and, with the help of artificial neural networks (NN), identified features characteristic of stem cell properties.

The results show that GSCs exhibit a specific, increased accumulation of unsaturated lipids, altered mitochondrial parameters, and other protein structures. In particular, measurements of lipid metabolism in lipid-containing cell organelles, discussed here as lipid droplets (LD), achieved a classification accuracy of 91,7 % when combined with neural networks. Through feature selection and the reduction to a few relevant peaks, we were able to reduce the measurement time to just a few milliseconds.

This technology thus offers the potential to establish diagnostic markers for stem cell identification based on the presented cellular characteristics and to implement them translationally into everyday neurosurgical practice.

In the long term, this technology holds the potential to improve the prognosis of GBM patients through enhanced stem cell diagnostics in translational applications and to pave the way for more personalized therapy, of which especially LDs should be considered as target for future applications.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>5-ALA</b>	5-Aminolävulinsäure
<b>ACAT1 / SOAT1</b>	Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase 1 (Sterol O-Acyltransferase 1)
<b>ACSL3</b>	Acyl-CoA-Synthetase Long-Chain Family Member 3
<b>ACSL4</b>	Acyl-CoA-Synthetase Long-Chain Family Member 4
<b>AdaBoost</b>	Adaptive Boosting (Klassifikationsalgorithmus)
<b>CAR-T</b>	Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
<b>CD133</b>	Zelloberflächenmarker für Stammzellen (Prominin-1)
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
<b>DGC</b>	Differentiated Glioblastoma Cell (Differenzierte Glioblastomzelle)
<b>DGAT1</b>	Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EGFR</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>FADS1/2</b>	Fatty Acid Desaturase 1/2
<b>FASN</b>	Fatty Acid Synthase
<b>G-CIMP</b>	Glioma-CpG Island Methylator Phenotype
<b>GBM</b>	Glioblastoma Multiforme
<b>GEMM</b>	Genetisch Engineerte Mausmodelle
<b>GFAP</b>	Glial Fibrillary Acidic Protein (Glial-fibrilläres saures Protein)
<b>GSC</b>	Glioblastoma Stem Cell (Glioblastom-Stammzelle)
<b>HILPDA</b>	Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated Protein
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
<b>IDH</b>	Isocitratdehydrogenase
<b>IL13Ra2</b>	Interleukin-13-Rezeptor-Alpha-2
<b>IMRT</b>	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
<b>KI</b>	Künstliche Intelligenz
<b>LAG3</b>	Lymphocyte Activation Gene 3
<b>LDA</b>	Lineare Diskriminanzanalyse
<b>LD</b>	Lipid Droplet
<b>MGMT</b>	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
<b>ML</b>	Maschinelles Lernen

<b>mTOR</b>	Mechanistic Target of Rapamycin
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>NF1</b>	Neurofibromin 1
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>NN</b>	Neuronale Netze
<b>PARP</b>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
<b>PD-1</b>	Programmed Cell Death Protein 1
<b>PDGFRA</b>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin Homolog
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SCD1</b>	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
<b>SREBP1</b>	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
<b>SRS</b>	Stimulated Raman Spectroscopy
<b>SVZ</b>	Subventrikulärzone
<b>TAG</b>	Triacylglycerine
<b>TAF</b>	Tumor-assoziierte Foam Cells
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>TERT</b>	Telomerase Reverse Transkriptase
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor Beta
<b>TMZ</b>	Temozolomid
<b>TME</b>	Tumormikroumgebung
<b>TTF</b>	Tumor Treating Fields
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Glioblastoma Multiforme .....	1
1.1.1 Einführung .....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	1
1.1.3 Pathogenese und Charakteristika .....	2
1.1.4 Epigenetik und Methylierung .....	3
1.2 Glioblastomale Stammzellen .....	4
1.2.1 Einführung .....	4
1.2.2 Pathogenese und Bedeutung für das Glioblastom .....	5
1.2.3 Molekularpathologie .....	5
1.2.4 Tumormikroumgebung .....	6
1.2.5 Immunevasion .....	7
1.2.6 Lipidmetabolismus.....	7
1.3 Diagnostik .....	9
1.3.1 Bildgebende Verfahren .....	9
1.3.2 Histologische und molekularpathologische Klassifizierung .....	9
1.3.3 Forschungsmodelle.....	10
1.4 Therapie.....	10
1.4.1 Standardtherapie .....	10
1.4.2 Innovative Therapien und personalisierte Medizin .....	12
1.5 Raman-Spektroskopie und Künstliche Intelligenz.....	14
1.5.1 Grundprinzip und Vorteile der Raman-Spektroskopie.....	14
1.5.2 Konfokale Raman-Spektroskopie .....	15
1.5.3 Datenverarbeitung und Auswertung .....	15
1.5.4 Maschinelles Lernen und Neuronale Netze.....	16
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	20
2 Wurm, L. M. et al. Rapid, label-free classification of glioblastoma differentiation status combining confocal Raman spectroscopy and machine learning. <i>Analyst</i> 148, 6109–6119 (2023). .....	22
3. Diskussion .....	23
3.1 Etablierung einer neuen Methodik.....	23
3.2 Zuordnung zu biologischen Strukturen.....	24
3.2.1 Nukleinsäuren.....	25
3.2.2 Proteine .....	26

3.2.3 Lipide .....	27
3.2.4 Mitochondrien .....	28
3.3 Maschinelles Lernen und Klassifikationsmerkmale .....	28
3.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse .....	29
3.5 Herausforderungen in der klinischen Routine .....	32
3.6 Perspektivische Anwendung in der personalisierten Medizin .....	33
3.7 Lipidmetabolismus als Zielstruktur .....	34
3.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	37
3.9 Perspektiven und zukünftige Anwendungen .....	37
4. Schlussfolgerungen.....	38
5. Literaturverzeichnis .....	40
5. Danksagung .....	54

# 1. Einleitung

## 1.1 Glioblastoma Multiforme

### 1.1.1 Einführung

Das Glioblastoma Multiforme (GBM) ist ein bösartiger primärer Hirntumor und gehört zur Gruppe der malignen Gliome. Es macht rund die Hälfte aller malignen Hirntumore aus (Kanderi, Munakomi und Gupta, 2025), die Inzidenz liegt bei 4 Fällen pro 100.000 Personen (Fabbro-Peray *u. a.*, 2019). Damit ist das GBM nicht nur der häufigste, sondern mit einem WHO-Grad IV auch der aggressivste primär maligne Hirntumor des Erwachsenen (Weller *u. a.*, 2022). Trotz moderner multimodaler Standardtherapien beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit nur 14-16 Monate, das mediane 5-Jahres-Überleben liegt dabei unter 10 % (Wang *u. a.*, 2022). Damit gehört das GBM zu den tödlichsten Krebsarten überhaupt.

### 1.1.2 Epidemiologie

Betroffen sind hauptsächlich Menschen über 45 Jahre, das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei 64 Jahren (Ah-Pine *u. a.*, 2023). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Grochans *u. a.*, 2022). Einzig gesicherter Risikofaktor ist eine vergangene hochdosierte Bestrahlung des Schädels (Rong, Li und Zhang, 2022a). Da bisher keine weiteren gesicherten externen Risikofaktoren exploriert werden konnten, scheinen in der Pathogenese der GBMs vermehrt intrinsische stochastische Mutationen eine Rolle zu spielen. Die Symptome betroffener Patienten sind meist unspezifisch und beinhalten Kopfschmerzen, Übelkeit, Krampfanfälle und neurologische Ausfälle wie Lähmung, Sprach- oder Sehstörungen (Ijzerman-Korevaar *u. a.*, 2018; Kretzschmar, 2018; McKinnon *u. a.*, 2021).

### 1.1.3 Pathogenese und Charakteristika

Bei der Entstehung des Glioblastoms kumulieren genetische Mutationen und Chromosomenaberrationen, die zu einer Dysregulation zentraler Zellprozesse führen (Berger *u. a.*, 2022). Zunächst ging man davon aus, dass GBM aus differenzierten Astrozyten entstehen würde. Neue Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass gliale Vorläuferzellen den Ursprung bilden (Kim, Park und Lee, 2021). Diesbezüglich wurde die WHO-Klassifikation zuletzt 2021 umfassend revidiert, um dem steigenden Wissen über die komplexe intra- und intertumorale Heterogenität des GBM Rechnung zu tragen (Reuss, 2023).

Bis 2021 unterteilte die WHO das GBM in zwei Untergruppen, das de-novo entstehende primäre GBM und das aus niedriggradigen Gliomen entstehende sekundäre GBM. Letzteres zeigt häufiger Isocitratdehydrogenase (IDH) 1/2-Mutationen (Berger *u. a.*, 2022). Mittlerweile wird das sekundäre GBM als eigene Entität, ein Astrozytom WHO-Grad IV abgegrenzt. Auch pädiatrische GBM werden heutzutage von adulten GBM unterschieden und ermöglichen so eine eindeutigere Diagnostik und Prognose (Stoyanov *u. a.*, 2022). Dabei zeichnet sich das primäre GBM durch zahlreiche Kernaberrationen mit unterschiedlichen genetischen Profilen aus. Die beschriebene ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität des GBM erschwert maßgeblich Diagnostik und Therapien (Nicholson und Fine, 2021). Dennoch konnten mittlerweile Treibermutationen identifiziert werden.

Charakteristisch für das GBM ist die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie p53- und RB, dies ist bei über 80 % aller GBM vorzufinden (Gousias, Theocharous und Simon, 2022). GBM kann hierdurch folglich die Zellzykluskontrolle und damit die Apoptose umgehen. Parallel dazu tragen Überaktivierungen der Wachstumsfaktor-Rezeptorwege wie RTK, sowie nachgeschaltet RAS/MAPK/ERK- und RTK/PI3K/AKT/mTOR-Abberationen in ebenfalls > 80 % der Fälle zu ungehemmter Proliferation, Invasion und Überleben des primären GBM bei (Khabibov *u. a.*, 2022). Häufig ist zudem eine Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) auf Chromosom 7, sowie Mutationen des platelet-derived growth factor Genes

(PDGFRA-Gen) zu finden. Korrespondierend findet man PTEN-Tumorsuppressorgen Deletionen auf Chromosom 10 (Galbraith und Snuderl, 2024). Auch zeigt das GBM Telomerase-Aktivierung infolge einer Promotor-Mutation im TERT-Gen und sorgt damit für eine seneszente Arretierung der Zellen (Galbraith und Snuderl, 2024).

Entsprechend genannter Abberationen können einige Untertypen des GBMs festgelegt werden: Der klassische Typ mit EGFR-Amplifikation und homozygoter CDKN2A/B Deletion, der proneurale Subtyp mit PDGFRA- IDH1-Mutation und globaler DNA-Hypermethylierung oder der mesenchymale Typ mit NF1-Verlust. Letzterer geht mit einer starken Infiltration tumor-assoziiertes Makrophagen einher (Jankowska *u. a.*, 2021).

#### 1.1.4 Epigenetik und Methylierung

Neben genannter DNA-Mutationen spielen epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle. Von entscheidender und v.a. prognostischer Relevanz sind DNA-Methylierungsmuster wie die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promotormethylierung (MGMT-Promotormethylierung), einer der ersten prädiktiven Marker des GBM. Das MGMT-Gen kodiert für ein DNA-Reparaturgen und kann so alkylierungsbedingte DNA-Schäden beheben. Eine Methylierung sorgt konsekutiv für eine Silenzierung entsprechenden Genes und erhöht den Erfolg von Standard-Chemotherapien mit Alkylanzien wie Temozolomid (TMZ). Dies erhöht das mediane Überleben auf ca. 22 Monate im Vergleich zu unmethylierten MGMT mit 13 Monaten medianen Überleben (Della Monica *u. a.*, 2022; Leske *u. a.*, 2023).

Weitere häufige Methylierung sind besonders bei IDH-mutierten sekundären Glioblastomen zu finden, bezeichnet als glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP). Die IDH1-Mutation produziert den Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat, dieser hemmt DNA- und Histon-Demethylasen mit folglich diffuser globaler Methylierung. Dieses Methylierungsmuster definiert einen molekularen Subtyp mit günstigerer Prognose und jüngerem Erkrankungsalter. Dies unterscheidet das sekundäre GBM somit epigenetisch von primären

Glioblastomen und bestätigt die 2021 etablierte Abgrenzung als Astrozytom (Chou *u. a.*, 2021; Wong *u. a.*, 2021).

Eine weitere Abgrenzung erfolgt zu pädiatrischen hochgradigen Gliomen, die Histon-Genmutationen wie H3-K27M aufweisen und die Methylierung an Lys27 von Histon H3 reduzieren (Leszczynska *u. a.*, 2021; Wu, Berglund und Etame, 2021). Dysregulationen von Histon-modifizierenden Enzymen werden allerdings auch selten bei adulten Glioblastomen beobachtet (McCornack *u. a.*, 2023).

Das GBM besitzt zusammenfassend eine hohe epigenetische Plastizität und umgeht so viele Therapiemechanismen (Silva, Stringer und Bardy, 2023). DNA-methylierungsbasierte Klassifikationen erreichen bereits eine hohe diagnostische Präzision, sodass epigenetische Landschaften in der Diagnostik und Therapie des GBM zunehmend relevant werden (Brandner, 2021).

## 1.2 Glioblastomale Stammzellen

### 1.2.1 Einführung

Die relevanteste Entdeckung der letzten Jahre in der Pathogenese des GBM ist sicherlich die Identifikation einer hierarchischen Organisation in der intratumoralen Heterogenität des GBM, an deren Spitze eine kleine Zellpopulation steht, die besonders für das aggressive Verhalten des GBM verantwortlich ist: Neurale Stammzellen, sogenannte Glioblastom-Stammzellen (engl. *Glioblastoma stem cells*, GSCs). Diese Krebszellen zeigen Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung, Differenzierungsfähigkeit, unbegrenzte Proliferation und Therapieresistenz (Chen *u. a.*, 2012; Mattei *u. a.*, 2021). Die Bedeutung in der Tumorentstehung bestätigte sich in Transplantationsstudien an Mäusen. Zellen mit dem exprimierten Stammzellmarker CD133 konnten im Gegensatz zu differenzierten CD133-negativen GBM Zellen (engl. *differentiated glioblastoma cells*, DGCs) als Xenograft ein Tumorwachstum initiieren (Tchoghandjian *u. a.*, 2010).

### 1.2.2 Pathogenese und Bedeutung für das Glioblastom

Von besonderer Bedeutung war darüber hinaus die Untersuchung vermeintlich gesunden Gehirngewebes von GBM-Patienten. Sequenzierungen zeigen im scheinbar gesunden Gewebe der cerebralen Subventrikulärzone (SVZ) abseits des eigentlichen Haupttumors korrelierende Treibermutationen identisch zum Glioblastom. Dies führte zu der Theorie, dass neurale Stammzellen der SVZ als Ursprungsort und Vorläuferzellen für das GBM existieren (Lee und Lee, 2018; Kwan *u. a.*, 2019). GSCs scheinen somit eine hohe Bedeutung in der frühen Tumorentstehung zu haben und das Gehirn diffuser zu infiltrieren als angenommen. Zunehmende Evidenz besteht, dass die meist sicheren Rezidive von dieser Zellpopulation verantwortet sind. So können nach scheinbar erfolgreicher Erstbehandlung eine geringe Anzahl überlebender GSC einen Rückfall bewirken und eine neue heterogene Tumormasse aufbauen (Rodriguez *u. a.*, 2022). Aufgrund der diffusen Infiltration wird damit eine neurochirurgische Entfernung ohne begleitende Therapien unmöglich. Die heterogenen Phänotypen der GSC erzeugen nicht nur variierende Empfindlichkeiten gegenüber Therapien (Loras *u. a.*, 2023), sie können durch ihre langsame Teilung Standardtherapien umgehen, die schnell teilende Zellen angreifen und bilden zudem erfolgreich Resistenzen (Ahmed, Auffinger und Lesniak, 2013; Eckerdt und Plataniias, 2023; Agosti *u. a.*, 2024a; Sherman *u. a.*, 2024).

### 1.2.3 Molekularpathologie

Bekannte Signalwege dieser Stammzellen sind Notch-, Wnt- oder Hedgehog-Signalwege. Notch 1-4 und entsprechende Liganden DLL1/3/4, Jagged1/2 vermitteln via Zell-Zell-Kontakte Signale, die eine hemmende Wirkung auf eine Differenzierung entfalten. So bleibt der teilungsfähige Zustand von GSC erhalten (Bazzoni und Bentivegna, 2019). Zusätzlich finden sich in GBM erhöhte  $\beta$ -Catenin Mengen.  $\beta$ -Catenin fungiert als zentraler Effektor im Wnt-Signalweg und wirkt im Zellkern aktivierend auf proliferationsfördernde Gene (Kahlert *u. a.*, 2012). In proneuralen und mesenchymalen GBM konnten Überexpressionen z.B. von TCF4 und SOX, sowie DKK1, FZD1 und LEF1 festgestellt werden, folglich mit aggressiverem Verlauf. Die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität fördert somit pleiotrope

Effekte wie Proliferation, Invasion über epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und Therapieresistenz (Kahlert *u. a.*, 2012).

Der Hedgehog-Signalweg ist als embryonaler Pfad im adulten Gewebe stillgelegt. Im GBM ist dieser pathologisch reaktiviert und führt zur Aktivierung von GLI-Transkriptionsfaktoren (Nakada *u. a.*, 2011). So wird eine Stammzellpopulation erhalten.

#### 1.2.4 Tumormikroumgebung

Das aggressive Potential des GBM ergibt sich nicht zuletzt aus der komplexen Tumormikroumgebung (engl. *Tumoral microenvironment*, TME). GSC programmieren ihre Umgebung, u.a. Gefäßzellen, angeborene Immunzellen, Fibroblasten und extrazelluläre Matrix in eine tumorfördernde, d.h. wachstumsfreundliche, immununterdrückende Mikroumgebung um (Hernández *u. a.*, 2021; Sharma *u. a.*, 2023). Zentrale Bedeutung kommt hierbei der Hypoxie zu. Schnelles Tumorwachstum und unzureichende Perfusion fördert einen niedrigen O<sub>2</sub>-Partialdruck, erhöht den Selektionsdruck und konsekutiv die Adaption der Tumorzellen. So sichert der Transkriptionsfaktor hypoxia induced factor (HIF) - 1a über Genaktivierung von vascular endothelial growth factor (VEGF) und Gene für Glykolyse-Enzyme das Überleben der Tumorzellen. Durch Hypoxie werden Therapien abgewehrt, Strahlentherapien wirken in sauerstoffarmen Zellen schlechter und Efflux-Pumpen wie MDR1/ABCB1 erhöhen die Chemoresistenz (Womeldorff, Gillespie und Jensen, 2014; Sharma *u. a.*, 2023).

Als Reaktion der Hypoxie entwickelt das GBM via VEGF-modulierter Angiogenese eine chaotische Gefäßarchitektur mit minderer Perfusion und ständiger Neubildung. Hierbei können GSCs Endothelien in Perizyten umwandeln oder auch selbst zu Perizyten differenzieren. In der perivaskulären Nische dieser mikrovaskulären Proliferation werden GSCs mit Nährstoffen versorgt und über Notch die Stammzelligkeit erhalten (Cheng *u. a.*, 2013; Treps *u. a.*, 2017). Daher finden sich GSCs besonders in perivaskulären Nischen und hypoxischen Regionen und erhalten symbiotisch mit DGCs eine überlebensfördernde Tumorumgebung.

### 1.2.5 Immunevasion

Nach aktuellen Erkenntnissen ist das Gehirn nicht immunprivilegiert. Dennoch zeigen GBM eine ausgeprägte Immuneversion, indem sie Mikroglia und Makrophagen beispielsweise via Periostin in eine M2-Differenzierung manipulieren. Diese tumorassoziierten Zellen unterdrücken die weitere adaptive Immunantwort. Auch myeloide Suppressorzellen werden tumorbegünstigend angelockt. Immun-Checkpoints wie PD-L1 und immunmodulatorische Moleküle wie TGF- $\beta$ , Prostaglandine und IL-10 induzieren eine Rekrutierung regulatorischer T-Zellen. Zytotoxische T-Zellen werden durch Expressionsverlust von z.B. CD28 und Hochregulation von PD-1, CTLA-4 und LAG3 tolerogen, ggf. sogar durch FasL eliminiert. Diese Mechanismen tragen zur komplexen Pathologie des GBM und der sich begünstigen Heterogenität des Tumors bei (DiDomenico *u. a.*, 2018; Lee-Chang *u. a.*, 2019; Miyazaki *u. a.*, 2020; Pombo Antunes *u. a.*, 2020; Yeo *u. a.*, 2022).

### 1.2.6 Lipidmetabolismus

Als pathogenetisch relevanter Bestandteil der GBM-Progression ist ein aberrierter Lipidmetabolismus vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Von besonderem Interesse sind hierbei *Lipid Droplets* (LD). Hierbei handelt es sich um dynamische Zellorganellen, die in Tumorzellen vermehrt beobachtet werden und als Speicher für neutrale Lipide wie Triacylglycerine und Cholesterinester dienen. Die Organellen werden von einer einzelnen Phospholipidschicht umhüllt (Safi, Menéndez und Pol, 2024).

Sie entstehen, wenn überschüssige Fettsäuren zu Triacylglycerinen (TAG) oder Cholesterinestern verestert und als hydrophober Kern gelagert werden. Das GBM kann damit seinen Lipidhaushalt ausgleichen und das Überleben sichern (Jin *u. a.*, 2023). Rund 35 % des Trockengewichtes von GBM-Zellen sind Lipide (Wang *u. a.*, 2023). Entsprechende Fette entstehen durch de-novo Lipogenese und dienen als Energiequelle in nährstoffarmen Phasen, außerdem liefern sie Membranbausteine bei rapidem Tumorwachstum (Darwish *u. a.*, 2024a). GBM vermeidet zudem Schäden durch Lipotoxizität freier Fettsäuren oder oxidativen

Stress. Über DGAT1 werden zur Wahrung des Redoxgleichgewichtes vermehrt Fettsäuren in TAG umgewandelt und in LDs eingeschleust. Aufgrund dieser möglichen metabolischen Flexibilität werden LDs vermehrt mit Tumorprozessen wie Angiogenese, Inflammation, Apoptoseregulation und Hypoxie-Adaption in Verbindung gebracht, also Eigenschaften des GBM (Deng *u. a.*, 2024). Der deutlich erhöhte Lipidgehalt in GSCs mit LD-assoziiierter *Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated Protein* (HILPDA) Expression konnte bereits bewiesen werden. Essenziell für das Stammzellüberleben scheint zudem ein alternativer Lipidstoffwechsel mit hoher Biosynthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) zu sein.

GSC unterscheiden sich hierbei von DGCs besonders im Lipidstoffwechsel. So sind GSC insgesamt eher lipidärmer mit geringerer neutraler Lipidspeicherung, zeigen aber eine vermehrte Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren, z.B. über die Fettsäure-Desaturasen FADS1/2 (Eyme *u. a.*, 2023; Minami *u. a.*, 2023). Diese Lipidprofiländerung scheint essenziell für Stammzelleigenschaften zu sein, eine Blockade konnte die Viabilität von Stammzellen deutlich senken (Eyme *u. a.*, 2023). Im Gegensatz dazu haben DGCs mehr gesättigte Fettsäuren. Folglich haben beide Zellpopulationen unterschiedliche Lipiddependentien. GSC könnten durch ungesättigte Lipide eher auf Membranfluidität und Signaltransduktion setzen, zudem sind die GSCs meist in nährstoffreicheren perivaskulären Zonen. So verteilen sich die Aufgaben der Zellpopulationen des GBM: GSC treiben Initiation und Rezidive voran, DGCs harren unter Stressbedingungen aus und sorgen durch ihre Heterogenität für die Resistenz des Tumors. Die Lipidstoffwechseländerung in GSCs werden als entscheidender Pathomechanismus in der Strahlen- und Chemotherapieresistenz des GBM diskutiert. Nach Bestrahlung steigen mobile Lipidsignale an. So könnten Sequestrierung durch Strahlung freigesetzter Fettsäuren und die Peroxidation der Bestrahlung mit LDs gedämpft werden (Agosti *u. a.*, 2024b).

LDs werden durch hypoxische Mechanismen wie HIF-1a mit seinem Zielgen HILPDA begünstigt. HILPDA kodiert für ein Oberflächenprotein von LDs und hemmt u.a. die Lipolyse. Die Überexpression in hypoxischen Tumorarealen zeigt, dass dieses Gen ein zentraler Mediator in der LD-Akkumulation zu sein scheint.

Diese Induktion wird im GBM beobachtet, nicht aber in weniger malignen Gliomen und deutet so auf eine aggressivere hypoxieadaptierte Biologie des GBM hin. Die Wachstumssignalkaskade PI3K/Akt/mTOR reguliert den Transkriptionsfaktor SREBP1 und FASN hoch. Dies führt zu einer erhöhten de-novo Fettsäuresynthese. Die vermehrte Lipidakkumulation macht den Tumor metabol autark. Wechselnde Verfügbarkeit von Lipiden, Glukose und Aminosäuren können so überlebt werden. Additiv konvergieren die Treibermutationen des GBM auf eine LD-Akkumulation. Die LD-Menge korreliert hierbei mit der Aggressivität des Tumors. Auch ein Lipidaustausch mit der Mikroumgebung wie Makrophagen wird beschrieben. Insgesamt fördern GSCs mit LDs also ihre Umgebung, indem sie für ihre Nährstoffversorgung sorgen (Talbot *u. a.*, 2024a). LDs scheinen somit relevante Organellen für die Pathomechanismen der GSCs darzustellen.

## 1.3 Diagnostik

### 1.3.1 Bildgebende Verfahren

Goldstandard der primären GBM-Diagnostik ist die Magnetresonanztomographie (MRT), diese gibt bildmorphologische Informationen über Lage, Ausdehnung und Tumoreigenschaften. In den Standardsequenzen T1 mit Kontrastmittel, T2, FLAIR und DWI zeigt das GBM charakteristische Veränderungen wie ringförmiges Kontrastmittel-Enhancement, Nekrosen oder Umgebungsödeme an (Guggenberger und Urbach, 2018). Weitere Techniken wie Perfusions-MRT und MR-Spektroskopie ergänzen die Diagnostik um Informationen bezüglich des Tumormetabolismus (Hoelter und Hattingen, 2019). Diese bildmorphologische Diagnostik ist allerdings eingeschränkt und kann z.B. Pseudoprogessionen nicht von echtem Tumorprogress unterscheiden (Zikou *u. a.*, 2018).

### 1.3.2 Histologische und molekularpathologische Klassifizierung

Eine endgültige Diagnosesicherung und Klassifizierung erfolgt durch eine Gewebebiopsie mit anschließender histologischer und molekularpathologischer

Analyse. Die aktuelle überarbeitete WHO-Klassifikation integriert hierbei neben histomorphologischen Merkmalen wie Mikronekrosen, Pseudopalisaden oder mikrovaskuläre Proliferationen auch immunhistoschemische Marker wie GFAP, IDH1-R132H und genetische Profile wie den IDH-Mutationsstatus oder MGMT-Status (Rieger *et al.*, 2024). Zum Zeitpunkt der Diagnose ist es allerdings meist schwierig, das konkrete Ausmaß der Tumordinfiltration festzustellen (Renovanz *u. a.*, 2022).

### 1.3.3 Forschungsmodelle

Aufgrund der Komplexität des Glioblastoms werden experimentelle Modelle etabliert. Hierbei greift man vermehrt auf primär patientenabgeleitete Zellkulturen zurück (da Hora *u. a.*, 2019). Sogenannte Neurosphären unter serumfreien Bedingungen ermöglichen GSC Anreicherung und imitieren die 3D-Architektur des Tumors *in-vitro*, z.B. via Hypoxiegradienten. Weitere Möglichkeiten bieten syngeneische Mausmodelle, Xenograft-Mausmodelle, genetisch engierte Mausmodelle (GEMMs) und *ex-vivo* Modelle wie Organoiden (Haddad *u. a.*, 2021; Vitale *u. a.*, 2024). Neurosphären patientenabgeleiteter Zellkulturen haben sich hierbei etabliert.

## 1.4 Therapie

### 1.4.1 Standardtherapie

#### 1.4.1.1 Neurochirurgische Resektion

Die Standardtherapie des GBM besteht aus maximaler chirurgischer Resektion mit adjuvanter Strahlen- sowie Chemotherapie (Rončević *u. a.*, 2023a). Der maximalen Entfernung des gesamten sichtbaren Tumors (sog. Gross total resection, GTR) bei Erhaltung eloquenter gesunder Gehirnareale kommt eine besondere Bedeutung zu, da so die längste Überlebenszeit erreicht wird (Youngblood, Stupp und Sonabend, 2021). Zu den neurochirurgischen Fortschritten gehören Neuronavigations-Systeme, intraoperative MRT,

Wachoperationen und die Fluoreszenz-gestützte Resektion mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) (Gerritsen *u. a.*, 2022). Unter 5-ALA fluoresziert infiltrierte Gewebe und ermöglicht so eine signifikant bessere Resektion (Bonosi *u. a.*, 2023).

#### 1.4.1.2 Adjuvante Strahlentherapie

Nach der Operation erfolgt eine äußerliche adjuvante Bestrahlung via intensitätsmodulierter Radiotherapie (IMRT) oder dreidimensional-konformale Radiotherapie nach Stupp-Protokoll mit 60 Gy in Fraktionen zu 2 Gy über 6 Wochen, meist kombiniert mit Chemotherapie (Rieger *u. a.*, 2024b). Weitere Alternativen wie Protonentherapie, Schwerionentherapie, Boron-Neutron-Capture-Therapy, intraoperative Radiotherapien, stereotaktische Radiochirurgie oder interstitielle Brachytherapie werden zurzeit untersucht, bisher ohne klaren Überlebensvorteil. Strahlentherapie zeigt einen Überlebensvorteil von 10 auf 27 % im 2-Jahresüberleben, Nebenwirkungen inkludieren Haarausfall, Hautreaktionen und kognitive Einschränkungen. Die neuwertigen Methoden versuchen nicht nur einen Überlebensvorteil zu erzielen, sondern diese Nebenwirkungen zu reduzieren und damit die Lebensqualität der Patienten zu verbessern (Obrador *u. a.*, 2024).

#### 1.4.1.3 Chemotherapie

Die Chemotherapie wird seit Mitte der 2000er auf dem Alkylanz Temozolomid (TMZ) gestützt, ein orales Zytostatikum, das permeabel die Blut-Hirn-Schranke passieren und durch Methylierung von DNA-Basen Tumorschaden verursachen kann. Die Gabe erfolgt postoperativ für sechs Wochen simultan zur Strahlentherapie, sowie aus anschließend sechs weiteren Zyklen zu je fünf Tagen mit 150-200 mg/ml alle 28 Tage. So erhöhte sich das mediane Überleben von 12 auf 15 Monate, ein Lebenszeitgewinn von 3 Monaten. Strahlen- und Chemotherapie wirken hierbei synergistisch (Stupp *u. a.*, 2005; Strobel *u. a.*, 2019; Jezierzański *u. a.*, 2024).

Bei dem unvermeidlichen Tumorrezidiv wird erneut reseziert und ggf. erneut bestrahlt. Die Zweitlinientherapie erfolgt individuell, meist werden ergänzend das

PCV-Schema mit dem Nitrosoharnstoff Lomustin oder monoklonale Antikörper wie Bevacizumab gegen VEGF angewendet. Bisher besteht gegenüber TMZ kein signifikanter Überlebensvorteil, sodass das trimodale Stupp-Schema weiterhin seit 2005 Bestand hat und keine wesentliche Prognosebesserung erzielt werden konnte (Stupp *et al.*, 2005; McBain *et al.*, 2021).

#### 1.4.2 Innovative Therapien und personalisierte Medizin

Als aktuell vielversprechendste vierte Modalität in der GBM-Therapie etablieren sich zurzeit Tumor-Treating Fields (TTF). Hierbei werden Elektroden an die Kopfhaut angebracht und mit 200 kHz wechselnde niedrigfrequente Felder ausgelöst. Diese stören die Zellstrukturpolarisation, den Spindelapparat und hemmen somit schnell wachsende Zellen. Es konnte ein Überlebensvorteil von 5 Monaten mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 13 % etabliert werden. Daher wird diese Methodik als einziger experimenteller Ansatz bereits in der aktuellen Erstlinientherapie erwogen. Voraussetzung sind Einschränkungen wie Rasur des Kopfes, Tolerierung des elektrodenartigen Arrays und Handhabung des ca. 3 kg schweren Gerätes (Ballo *u. a.*, 2023).

Erprobt werden zudem weitere experimentelle Ansätze wie Immuntherapien. Ergebnisse von Checkpoint-Inhibitoren zeigen nur begrenzte Wirksamkeit. CAR-T-Zellen, d.h. patienteneigene T-Lymphozyten mit chimären Antigenrezeptoren spezifisch für Tumorzellen, zielen auf EGFRvIII oder IL13Ra2 im GBM ab, aktuell noch mit begrenztem Erfolg. Ergänzende Ansätze wie intrathekale Applikation, Dual-Target Modelle oder CAR-TEAM sind noch in den Anfangsphasen, können die Tumore aber zumindest temporär schrumpfen (Maggs *u. a.*, 2021). Weitere Entwicklungen sind u.a. Vakzine wie dendritische Zellvakzine und peptidbasierte Neoantigen-Impfstoffe. Während Letztere aufgrund des adaptiven und heterogenen Mutationsprofils des GBM bisher keine Wirkung zeigten, konnten dendritische Zellvakzine wie DCVax-L trotz methodischer Schwächen erstmalig einen Überlebensvorteil auf median 19.3 Monate verglichen zur Kontrollgruppe mit 16.5 Monaten zeigen. Bei Rezidivpatienten lag der Überlebensvorteil bei 13.2 Monaten verglichen zu 7.8 Monaten (Olivier und Migliorini, 2023). Weitere Entwicklungen basieren auf onkolytischen Viren, bispezifischen T-Zell-Engagern,

Makrophagen-polarisierende Therapien und Zytokin-Therapien (Rong, Li und Zhang, 2022b; Deng, Debus und König, 2023). Targeted-Therapies mit EGFR-Inhibitoren wie Tyrosinkinsase-Inhibitoren zeigen bisher ebenfalls keine Wirkung (Aldaz und Arozarena, 2021). Auch die bereits erwähnten VEGF-Antikörper zeigen keinen signifikanten Überlebensvorteil (Scherer *u. a.*, 2023). Targeted IDH-Inhibitoren wirken zumindest bei niedriggradigen Gliomen, nicht jedoch beim hochgradigen sekundären GBM (Seidel und Nicolay, 2024). Dies zeigt die Bedeutung der heterogenen Adaptionfähigkeit des GBM im WHO-Stadium IV. Weitere Ansätze wie eine synthetische Lethalität mit PARP-Hemmern scheinen aktuell ebenfalls nicht erfolgreich (Sim, Galanis und Khasraw, 2022).

Schlussfolgernd zeigt sich, dass sich trotz dieser zahlreichen Therapieversuche die Prognose des GBM aufgrund der beschriebenen vielseitigen Pathomechanismen bisher nicht zu bessern scheint.

## 1.5 Raman-Spektroskopie und Künstliche Intelligenz

### 1.5.1 Grundprinzip und Vorteile der Raman-Spektroskopie

Angesichts der Aggressivität des Glioblastoms, der Bedeutung der GSC und dem Bedarf an personalisierter Medizin bei heterogener Entität besteht ein großes Interesse an innovativen, nicht-invasiven Methoden für Diagnostik, die zuverlässige Informationen über den Tumor liefern.

Eine vielversprechende Technologie in diesem Kontext ist die Raman-Spektroskopie. Dabei handelt es sich um ein optisches, markierungsfreies Verfahren, das einen molekularen Fingerabdruck von Proben liefert. Hierbei wird ein monochromatisches Licht auf ein Gewebe gerichtet, wobei ein Großteil als Rayleigh-Streuung elastisch gestreut wird. Ein kleiner Teil tauscht jedoch Energie mit Molekülschwingungen im Gewebe aus und wird mit veränderter Wellenlänge inelastisch gestreut. Auf diesem nach C.V. Raman benannten Effekt beruht die Raman-Spektroskopie. Differenzen dieser Photonenenergie entsprechen Schwingungsenergien molekularer Bindungen und können entsprechend als Raman-Spektrum aufgezeichnet und interpretiert werden. Jedes Molekül besitzt hierbei ein charakteristisches Schwingungsspektrum, sodass das gesamte Spektrum erlaubt, einen „molekularen Fingerabdruck“ des Gewebes zu erstellen. Dieser enthält somit Informationen bezüglich der molekularbiologischen bzw. chemischen Zusammensetzung der Probe. Im Kontext von malignen Tumoren sind solche Erkenntnisse relevant, denn es können Rückschlüsse auf beliebig veränderte Stoffwechselprodukte gezogen werden (Korinth, 2021).

Vergleicht man diese schwingungsspektroskopische Methodik mit der herkömmlichen histologischen Färbung oder immunologischen Markern, so ist Raman-Spektroskopie markierungsfrei durchführbar, d.h. es müssen keine externen Stoffe eingebracht werden (Kögler, 2018). Verglichen zur absorptionsbasierten Infrarotspektroskopie erfordert Raman-Spektroskopie keine transmissiven Proben und kann somit in wässrigen Proben, Glaträger-Systemen oder *in vivo* eingesetzt werden (Baker *u. a.*, 2018).

### 1.5.2 Konfokale Raman-Spektroskopie

Genauere Erkenntnisse lassen sich mit der konfokalen Raman-Spektroskopie durchführen, hierbei wird die genannte Technologie mit einem Lichtmikroskop gekoppelt. Durch Fokussierung des Laserstrahls auf einen Punkt sowie eine Lochblende werden nur Signale aus dem Fokus erfasst. Dies erlaubt eine dreidimensionale Abbildung chemischer Eigenschaften mit räumlicher Auflösung. Somit können einzelne Zellen und subzelluläre Strukturen analysiert und visualisiert werden. Dies ist entscheidend, um zelluläre Heterogenität zu untersuchen (Ehrensberger, 2024). Positiv hervorzuheben ist darüber hinaus, dass diese Technologie nicht-destruktiv angewendet werden kann und Zellen lebend gemessen werden können (Yuan *u. a.*, 2018; Elumalai, Managó und De Luca, 2020).

Der Aufbau des konfokalen Raman-spektroskopischen Setups besteht entsprechend aus einem monochromatischem Laser verschiedener Wellenlänge, typischerweise 532 oder 785 nm Exzitation für biologische Proben mit jeweils unterschiedlicher Eindringtiefe in das Gewebe (Brozek-Pluska *u. a.*, 2019). Ergänzt wird dies durch ein Objektiv, z.B. 63x immersiv, sowie ein Lochblenden-System, einen Rayleigh-Filter zur Filterung elastischer Streuung und ein hochauflösendes Spektrometer. Der Detektor ist ein gekühlter CCD-Detektor.

### 1.5.3 Datenverarbeitung und Auswertung

Raman-spektroskopische Rohdaten in Form von Spektren oder Hyperspektren durchlaufen mittlerweile einen mehrstufigen Verarbeitungsprozess. Zu der Vorverarbeitung zählen das Zuschneiden auf relevante spektrale Schwingungsbereiche der Spektren und das Herausrechnen von kosmischer Strahlung. Kosmische Strahlung erzeugt einzelne Spikes im Spektrum, die als Ausreißer identifiziert und herausgerechnet werden können. Anschließend wird eine Korrektur des Untergrundsignals (Baseline) durchgeführt, um Autofluoreszenz zu entfernen. Etabliert ist dafür z.B. die Rubberband-Baseline-Korrektur. Anschließend werden die Spektren, z.B. durch Vektornormalisierung,

normalisiert, um Unterschiede in absoluten Intensitäten auszugleichen. Glättung durch sog. Noise-Filter wie der Savitzky-Golay Filter und das Berechnen von Ableitungen können ebenfalls Überlagerungen herausrechnen und das Signal verbessern (Ryabchikov, Guo und Bocklitz, 2020).

Aufgrund der Menge an Datenpunkten einzelner Ramanspektren erfolgt eine Reduktion dieser hochdimensionalen Daten mittels Dimensionsreduktion. Etablierte Techniken sind die Hauptkomponentenanalyse (engl. PCA) und die lineare Diskriminanzanalyse (LDA). Die PCA reduziert die Dimension auf die wesentlichen Variationsmuster und erhält damit die relevantesten Informationen, dies ist z.B. für die weitere Verarbeitung mit Machine Learning (ML) relevant. Im Gegensatz dazu trennt LDA die Daten in eine Dimension, welche die beschrifteten Daten entsprechend der Klassifikation am besten trennt (Reddy *u. a.*, 2020).

#### 1.5.4 Maschinelles Lernen und Neuronale Netze

Die Interpretation der meist multidimensionalen und komplexen Spektren ist trotz der fortgeschrittenen Datenanalyse nicht trivial, besonders bei heterogenen Zellpopulationen. Daher kommt zunehmend ML zum Einsatz. Diese Schlüsseltechnologie beinhaltet Algorithmen, die Muster in großen Datenmengen erkennen und für Klassifikations- und Vorhersageaufgaben nutzen können (Li *u. a.*, 2018).

ML ist ein Teilbereich der Künstlichen Intelligenz (KI). KI ist ein Konzept, das Systeme oder Maschinen beschreibt, intelligent bei Problemlösungen zu wirken. Als erstes Konzept etablierte sich im Jahr 1950 der nach A. Turing benannte Turing-Test. Hier entschied ein Anwender in einem Chat, ob er in der Konversation zwischen Menschen und Maschinen unterscheiden könne. Die Prägung des Begriffes fand erstmalig 1956 auf der Dartmouth-Konferenz statt, seitdem existieren die ersten KI-Modelle. Der Aufschwung von ML erfolgte allerdings erst ab den 2000er-Jahren. ML ist eine Unterform, bei der Algorithmen Entscheidungen oder Vorhersagen treffen, ohne direkt darauf programmiert

worden zu sein. Sie lernen also selbstständig ohne explizite Programmierung (Buxmann und Schmidt, 2019; Hahn, 2019).

Man unterscheidet dabei verschiedene Ziele, z.B. die Zuordnung zu einer Gruppe, namentlich Klassifikation, von der Zuordnung eines Wertes, der Regression.

Im maschinellen Lernen kann man hierbei *Reinforcement Learning*, unüberwachtes Lernen und überwachtes Lernen unterscheiden. *Reinforcement Learning* versucht einen Agenten durch Interaktion bei sequenziellen Entscheidungen mittels Belohnung oder Bestrafung kumulativ anzupassen (Kokar und Reveliotis, 1993; Haas, 2022). Unüberwachtes Lernen versucht Muster in Daten durch sog. *Clustering*-Algorithmen zu finden. So gruppiert z.B. der k-means Algorithmus Spektren nach Ähnlichkeit der Dimension in k *Clustern*, hierbei kann k nach Kriterien der Silhouetten-Koeffizienten gewählt werden. Große Differenzen der Silhouetten erlauben meist natürlichere Zuordnungen (Shutaywi und Kachouie, 2021). Dies erlaubt die Entdeckung verschiedener Subkompartimente in Zellen, ohne diese vorher klassifiziert zu haben. Grundlage hierfür ist, dass die Subpopulationen entsprechende Unterschiede entlang der Dimensionen aufweisen, die größer als Störfaktoren sind (Plaue, 2021).

Im Gegensatz dazu arbeitet überwachtes Lernen mit beschrifteten Daten, z.B. indem man dem Algorithmus Spektren mit Zuordnung zu Subpopulation von Tumoren gibt. Liegen solche Daten vor, ermöglicht dies ML-Modelle zu trainieren, die neue Spektren korrekt dieser Subpopulation zuordnen. Für die Anwendung von überwachtem ML gibt eine Vielzahl von Algorithmen unterschiedlicher Komplexität. Einfache Klassifikatoren wie k-Nearest-Neighbor ordnen hierbei unbekannte Spektren der Klasse k des nächst ähnlichen Trainingsspektrums zu und sind somit mit wenig Komplexität verbunden. Algorithmen wie Random-Forest werden verwendet, indem Ensembles vieler Entscheidungsbäume mit entsprechenden Entscheidungspfaden genutzt werden, dies erhöht die Komplexität und damit die Klassifikation komplexerer Datensätze. Die sukzessive Aufteilung anhand einzelner Attribute macht diesen Algorithmus leicht interpretierbar. Auch gibt es diverse Abwandlungen wie *AdaBoost*, bei dem viele kleine Bäume generiert werden. Support Vector Machines finden durch optimale

Trennhyperebenen in einem Merkmalsraum robuste Ergebnisse und können damit noch komplexere Daten klassifizieren. Hierbei bestimmen nur ausgewählte Randpunkte mit dem größtmöglichen Abstand der Klassen, die sog. Support Vektoren, die Lage der Hyperebene. Mittels entsprechender Kernel-Funktionen können lineare Trennungen für nicht-lineare Probleme gefunden werden (Statnikov, Wang und Aliferis, 2008; Hejazi *u. a.*, 2020; Bansal, Goyal und Choudhary, 2022; Lyu *u. a.*, 2023).

In jüngerer Zeit etablieren sich vermehrt künstliche Neuronale Netze (NN), die in der Lage sind, Merkmale automatisch zu lernen und potenziell genauere Klassifikationen zu erreichen. Diese sind dem cerebralen Kortex des Menschen nachempfunden und bestehen somit aus verschiedenen Knotenpunkten, den Neuronen, die in verschiedenen Schichten von Eingabe bis Ausgabeschicht angeordnet und beliebig miteinander verbunden sind. Ein einzelnes Neuron besteht hierbei aus einer Aktivierungsfunktion und einer Bias-Variable, die Verbindungen zu anderen Neuronen werden gewichtet. Diese klassische Architektur wird als Multilayer-Perceptron-Modell bezeichnet. In der späteren Interaktion mit dem Anwender kommen hierbei nur die Eingabe und Ausgabeschicht zum Vorschein. Bei komplexeren NN und entsprechend mehr zwischengeschalteten Schichten, den sog. Hidden-Layers, spricht man von Deep Learning (Tetzner *u. a.*, 2021; Ahmed *u. a.*, 2023). NN haben sich heutzutage zu den vielversprechendsten Algorithmen für komplexe Probleme entwickelt.

Wichtig bei komplexen Algorithmen und Daten ist die Vermeidung von Überanpassung (*Overfitting*), d.h. dem Lernen aus Rauschen. Um die Modelle dennoch sicher zu validieren, werden zu Beginn Test- und Trainingsdatensatz separiert. Modelle werden dann typischerweise mit Techniken der n-fachen Kreuzvalidierung (n-fach *Cross Validation*) trainiert und die Parameter der Algorithmen optimiert. Dies kann zusätzlich mit Hyperparametern der Algorithmen erfolgen, z.B. der Architektur des NN. Man teilt hierbei den Datensatz in n-Trainingsmengen auf, wovon eine jeweils als Testmenge fungiert und justiert entsprechende Hyper- bzw. Parameter so, dass die Generalisation maximiert wird. Leistungsbewertungen erfolgen über Metriken wie Genauigkeit, Präzision, Recall oder Gewichtungen hieraus wie dem F1-Score. Die

abschließende externe Validierung für die Bewertung der trainierten Algorithmen erfolgt dann anhand der vorgehaltenen Testdaten, so kann späteres *Overfitting* weitestgehend berücksichtigt werden (Lopez *u. a.*, 2023).

Diese verschiedenen Algorithmen bieten also die Möglichkeit, automatisiert und anwenderunabhängig aus verschiedenen komplexen Datenstrukturen sichere Entscheidungsmerkmale zu identifizieren und aus heterogenen Datenmengen Vorhersagen zu treffen.

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

Das GBM bleibt trotz zahlreicher Therapiemodalitäten eine der aggressivsten Tumorentitäten mit schlechter Prognose. Zahlreiche innovative Ansätze fokussieren sich dabei aufgrund der Heterogenität und Adaptivität des Tumors auf viele patientenspezifische, personalisierte Pathomechanismen. GSCs spielen in der Pathogenität des Tumors eine entscheidende Rolle und unterhalten zahlreiche dieser Pathomechanismen und heterogene Adaptivität. Aktuell kann diese Zellpopulation nur durch aufwendige Markierung der Stammzellmarker identifiziert werden.

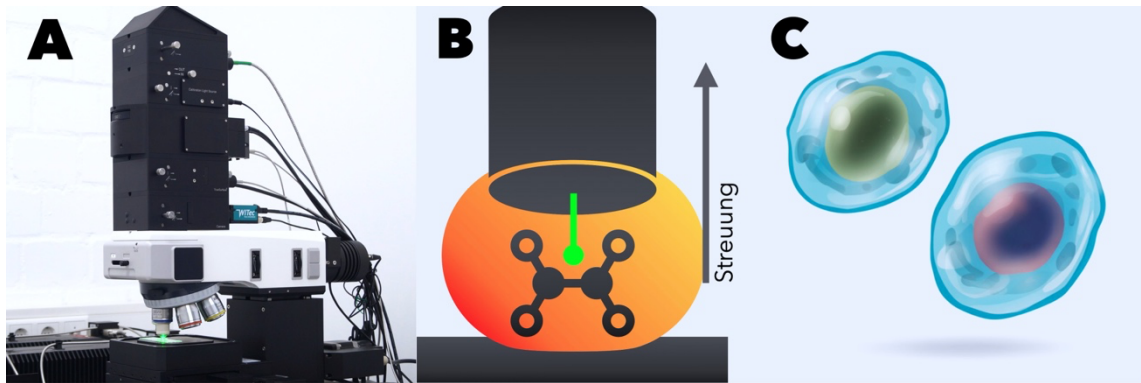
Aufgrund des Bedarfes an schnellerer, patientennaher Diagnostik und personalisierter Therapie besteht Nachfrage neuer translationaler Methodik.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neue präklinische Methodik mit translationalem Potential zu etablieren, die das Potential konfokaler Raman-Spektroskopie mit Maschinellen Lernen, d.h. Algorithmen des Segmentes der Künstlichen Intelligenz, kombiniert, um eine schnelle, färbefreie Klassifikation von GSCs *in vitro* zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit etabliert hierfür Protokolle zur Messung und Verarbeitung von Spektren und vergleicht diverse heterogene Algorithmen hinsichtlich ihres Klassifikationsergebnis. Letztendlich sollen daraus Rückschlüsse auf die biochemischen und molekularpathologischen Mechanismen der GSC gezogen werden können und die Technologie die Differenzierung von GSC und DGCs ermöglichen (s. Abbildung 1).

Bei erfolgreichem klinischem Einsatz ließe sich diese Methodik translational und automatisiert nutzen, um GSC zu identifizieren und GSC-adaptierte intra- sowie perioperative Entscheidungen zu treffen.

Für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und experimentellen Methoden lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Studiennummer: 5841R, Registrierungs-ID: 201703210, „Untersuchung von krebsverursachenden Genen in Hirntumoren“).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der vorliegenden Arbeit.** (A) Darstellung einer präklinischen Instrumentierung eines konfokalen Raman Spektroskops. Dies ermöglicht die markierungsfreie Messung von Zellpopulationen. (B) Schematische Darstellung des immersiven Objektivs mit Instrumentierung eines monochromatischen hochenergetischen Lichtstrahles mit gekoppeltem Messsystem. Anhand der gemessenen inelastischen Streuung sollen Aussagen über molekulare Schwingungen getroffen werden. (C) Dies ermöglicht die Unterscheidung von Zellen durch Messpunkte in verschiedenen Zellkompartimenten, hier abgebildet durch eine schematische Abbildung zweier Zellen mit differenzierbaren Zellkompartimenten.

2 Wurm, L. M. et al. Rapid, label-free classification of glioblastoma differentiation status combining confocal Raman spectroscopy and machine learning. *Analyst* 148, 6109–6119 (2023).

Cite this: *Analyst*, 2023, **148**, 6109

## Rapid, label-free classification of glioblastoma differentiation status combining confocal Raman spectroscopy and machine learning

Lennard M. Wurm,<sup>a,b</sup> Björn Fischer,<sup>c,d</sup> Volker Neuschmelting,<sup>b</sup> David Reinecke,<sup>b</sup> Igor Fischer,<sup>a</sup> Roland S. Croner,<sup>e</sup> Roland Goldbrunner,<sup>b</sup> Michael C. Hacker,<sup>c</sup> Jakub Dybaś<sup>b,†</sup> and Ulf D. Kahlert<sup>b,\*†</sup>

Label-free identification of tumor cells using spectroscopic assays has emerged as a technological innovation with a proven ability for rapid implementation in clinical care. Machine learning facilitates the optimization of processing and interpretation of extensive data, such as various spectroscopy data obtained from surgical samples. The here-described preclinical work investigates the potential of machine learning algorithms combining confocal Raman spectroscopy to distinguish non-differentiated glioblastoma cells and their respective isogenic differentiated phenotype by means of confocal ultra-rapid measurements. For this purpose, we measured and correlated modalities of 1146 intracellular single-point measurements and sustainably clustered cell components to predict tumor stem cell existence. By further narrowing a few selected peaks, we found indicative evidence that using our computational imaging technology is a powerful approach to detect tumor stem cells *in vitro* with an accuracy of 91.7% in distinct cell compartments, mainly because of greater lipid content and putative different protein structures. We also demonstrate that the presented technology can overcome intra- and intertumoral cellular heterogeneity of our disease models, verifying the elevated physiological relevance of our applied disease modeling technology despite intracellular noise limitations for future translational evaluation.

Received 30th July 2023,  
Accepted 23rd October 2023  
DOI: 10.1039/d3an01303k  
rsc.li/analyst

### A Introduction

Surgical resection of the tumor is the most commonly applied treatment for malignant cancers and represents the therapy option leading to the best clinical outcome for most types of cancers when compared to non-surgical intervention plans.<sup>1</sup> Moreover, recent predictions reveal a severe increase in demand for surgical treatments in future oncological care due to various socio-economic reasons.<sup>2</sup> Technological innovations in surgical oncology, such as robotic-facilitated minimal inva-

sive surgery or navigation-guided neurosurgery to improve resection outcomes while reducing intervention-associated morbidity and mortality, are of current clinical interest. Our preclinical basic science study strives to provide a tool for such innovations using state-of-the-art instrumental, computational, and disease-modeling technologies.

Cancer-associated deaths are one of the leading global health problems affecting all levels of society, gender, and ethnicity.<sup>3</sup> Over the last decades, research has revealed that the occurrence, progression, and regrowth of malignant cancers and their metastatic offspring are promoted by tumor cells with stem cell properties, so-called cancer stem cells (CSC).<sup>4,5</sup> Ample published evidence exists, that targeting CSCs will help to improve the clinical care of cancer patients.<sup>6,7</sup> However, the clinical translation of anti-CSC directed therapies or diagnostics is lagging, primarily due to hurdles regarding specificity, side effects, and effectivity of relevant preclinical discoveries in human application.<sup>8,9</sup> In our project, we chose glioblastoma (GBM), the most frequently occurring and aggressive type of primary brain tumor in adults, as our biological model for an unmet clinical need. Current routine clinical treatment of GBM patients is still challenging and features surgical resection of tumor mass as diagnosed by anatomical or metabolic

<sup>a</sup>Department of Neurosurgery, University Hospital Düsseldorf and Medical Faculty Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany

<sup>b</sup>Department of Neurosurgery, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

<sup>c</sup>Institute of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

<sup>d</sup>FISCHER GmbH, Raman Spectroscopic Services, 40667 Meerbusch, Germany

<sup>e</sup>Clinic of General- Visceral-, Vascular and Transplantation Surgery, Department of Molecular and Experimental Surgery, University Hospital Magdeburg and Medical Faculty Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany.

E-mail: Ulf.Kahlert@med.ovgu.de

<sup>f</sup>Jagiellonian Center for Experimental Therapeutics, Jagiellonian University, Krakow, Poland

†These authors contributed equally.



imaging, followed by an adjuvant combination of classical DNA alkylating chemotherapy and multi-cyclic radiation therapy.<sup>10</sup> The more accurate and complete the surgical resection is performed – as diagnosed with current clinical imaging and morphological procedures – the better the overall survival time of the patient.

As a consequence of exogenous stress, such as limitations in oxygen or nutrient supply in response to the massive cell growth of GBM parenchyma, a population of GBM stem cells (GSCs) undergoes mesenchymal *trans*-differentiation, which results in augmented invasive potential of the cells to escape the rate-limiting microenvironment, leading to the fatal infiltrative growth pattern of the disease as also GSCs eluding from neurosurgical resection in the sub- and periventricular zone.<sup>11,12</sup> Imaging technologies that can detect invaded GSC residing in brain tissue on a cellular level would provide the basis for improved therapeutic strategies. One approach that has shown promising potential to allow such detection is using label-free spectroscopic methods such as Raman spectroscopy. Raman spectroscopy has been established as a rapid, label-free alternative to the more common but time-consuming neuropathological examination of neurosurgical specimen.<sup>13–15</sup> Monochromatic light is directed onto a sample, resulting in inelastic scattering that provides information about the molecular binding structure of biological samples. A Raman spectroscopy fingerprint can ultimately identify a biological phenotype.<sup>16</sup> It can potentially be used as a highly repetitive method for intraoperative decision-making and neurosurgical guidance with high accuracy compared to other, likewise rapid approaches.<sup>17–22</sup> Due to the large amount of information within each spectrum, further processing methods of the spectra are applied, including multivariate statistics and machine learning.<sup>23–25</sup> These approaches enabled the correlation of spectroscopic characteristics to diverse diagnostic and biological features as well as to cell populations, illustrated in Fig. 1.<sup>25–29</sup> Recent work indicates that processing of large spectroscopic data by machine learning algorithms to generate user-friendly interpretations of the signals supports the dissemination potentiation of imaging in life science and clinical use. Ascending numbers of studies successfully follow this approach using either small specimen counts but also

proving its ability on data retrieved from whole tissue sections.<sup>30–32</sup>

Here we evaluate a machine learning-assisted classification approach to identify GSCs using a collection of recently described *in vitro* models, that resemble various different neuropathological relevant, genetic markers of primary tumors.<sup>33</sup> Especially heterogenous GSCs remain underestimated in clinical diagnostic routines due to missing evidence and methodology. Our study is intended to further establish Raman technique for consideration of cancer cell heterogeneity and usage in neurosurgical decision-making.

## B Materials and methods

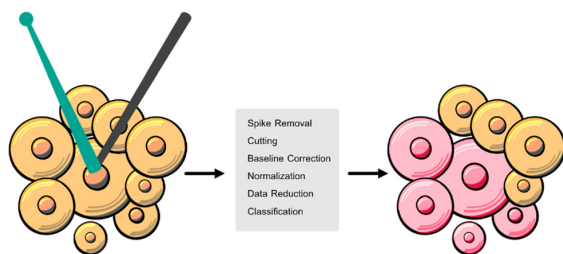
### 1 Cell lines and culture conditions

GSC cell lines HSR-GBM1 (provided by A. Vescovi, Univ. Milan-Bicocca, Italy), JHH520 (provided by J. Riggins, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, USA) BTSC-407, BTSC-233, (provided by MS Carro, University of Freiburg, Germany) and NCH644 (provided by C.-H. Mende, University of Heidelberg, Germany), recapitulating tumor genetic GBM characteristics of humans *in vitro*,<sup>33</sup> are propagated as neurospheres in DMEM w/o pyruvate (Gibco), 30% Ham's F12 Nutrient Mix (Gibco), 2% B27 supplement (Gibco), 20 ng ml<sup>-1</sup> human bFGF (Peprotech), 20 ng ml<sup>-1</sup> human EGF (Peprotech), 5 µg ml<sup>-1</sup> Heparin (Sigma), and 1× Antibiotic-Antimycotic (Gibco). All cells are maintained in cultures at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. GSCs differentiation is achieved by incubation with 50 ng ml<sup>-1</sup> recombinant BMP4 (Gibco, #PHC9534) for 48 h in neurosphere medium. The proof of the functionality of this treatment to reduce stemness of the cells, such as reduced abundance of neural stem cell marker or reduced clonogenicity, *i.e.*, have been reported very recently by our group in a dedicated study to investigate biological mechanisms associated with this assay.<sup>34</sup>

### 2 Confocal Raman microscopy and light microscopy

Raman and light microscopic studies were performed using an alpha 300R confocal Raman microscope (WITec, Ulm, Germany) equipped with a Zeiss W Plan Apochromat 63×/1.0 dipping objective. A single-mode laser with a wavelength of 532 nm was applied for excitation. The Raman microscope was configured with a WITec UHTS 300 spectrometer and an Andor iDus Deep Depletion CCD camera cooled to –60 °C. By using a reflection grating with 600 lines per mm, an average spectral resolution of 3.8 cm per pixel was achieved.

For sample preparation, cells were washed twice with phosphate buffer to remove fluorescence from the pH indicator. Subsequently, 80 µL of the cell solution stored on ice was pipetted onto a calcium fluoride substrate (Korth Kristalle, CaF<sub>2</sub> Raman grade optically polished)<sup>35</sup> and the microscope objective was dipped into the drop. Three single-point measurements were performed on each cell at randomized positions. Using a laser power of 20 mW, the exposure time per spectrum was set to 20 s (10 × 2 s accumulated).



**Fig. 1** Graphical sketch of the machine learning experimental design applied in this study: application of confocal Raman spectroscopy and machine learning performs rapid, label-free classification of different subgroups in cell populations after appropriate processing.



## Analyst

Raman reference images of the cross-section of the cells were acquired with 20 mW laser power. Areas of  $20 \times 20 \mu\text{m}$  were scanned with a spatial resolution of 500 nm. The exposure time per spectrum was set to 1.0 s. The collection of Raman spectra and compilation of Raman images were conducted using WITec FIVE software (version 5.3.10.102, WITec, Ulm, Germany).

### 3 Raw data

In this study, we collected a total of 1146 spectra from 186 GSC and 196 DGC cells. The dataset was balanced, comprising 558 spectra from GSC cells and 589 spectra from DGC cells. Machine learning models were developed using these spectra as input data to classify each spectrum into one of two classes, namely GSC or DGC. Additionally, for subgroup analysis, such as for different cell lines and biological clusters, spectra were similarly classified as GSC or DGC within their respective subgroups. For instance, the binary classification task for cluster 1 (nuclei) involved 600 spectra, with 287 from GSCs and 313 from DGCs. The exact distribution can be seen in Table 1.

### 4 Preprocessing

For further processing, data was exported and formatted including metadata using R (4.0.4) and thus reducing manual input faults on big data. Spectral preprocessing and Machine Learning algorithms were applied using Python (3.8.8) including scikit-learn (1.0.1)<sup>36</sup> and Orange Data Mining/Quasar (3.30.2).<sup>37</sup>

Data was cut onto fingerprint region from 400–1800  $\text{cm}^{-1}$ . Spectra which contained strong fluorescence or cosmic spikes were excluded during measurements or afterward, if applicable. Baseline correction was performed using Rubber band<sup>38</sup> to remove background fluorescence. In addition, Vector Normalization was applied. After preprocessing, 1146 single-point measurements remained, which were measured on six different days.

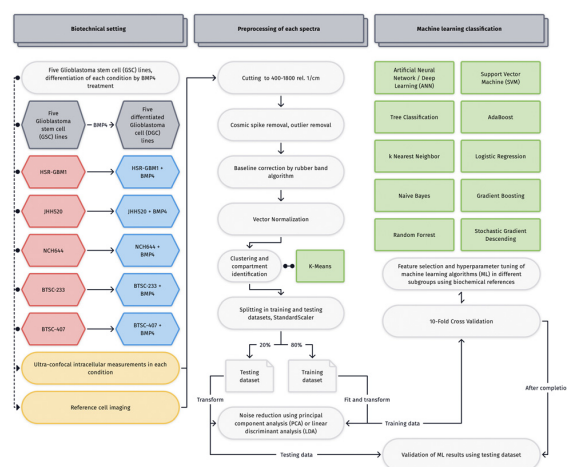
To reconstruct origins of the contributing peaks in the figures, a negative second derivative was calculated by Savitzky–Golay filter (window = 9, polynomial order = 3) which counteracts the derivative-induced noise enhancement.

### 5 Machine learning

An overview of our machine learning pipeline is shown in Fig. 2. For classification, the data set was randomly split into

**Table 1** Measurement data under each condition is presented to provide context on the distribution and number of individual measurements

Condition	Total samples (instances)	GSC count	DGC count
Cluster 1	600	287	313
Cluster 2	67	31	36
Cluster 3	406	201	205
Cluster 4	73	38	35
HSR-GBM1	229	113	116
JHH520	222	108	114
NCH644	265	128	137
BTSC-233	235	101	134
BTSC-407	195	107	88



**Fig. 2** Flowchart and pipeline of our biotechnology setup, from preprocessing to machine learning.

80% training set and 20% testing set by scikit-learn train-test-split algorithm. Data were scaled using scikit-learn standard scaler and data reduction was performed using linear discriminant analysis (LDA) or principal component analysis (PCA). PCA and LDA each were fitted onto the training data set and all data sets were transformed according to the component eigenvectors. Parameters of machine learning algorithms and PCA component count were optimized on the PCA transformed training set by 10-fold cross-validation. As a result, 30 principal components were selected. The target value for Machine Learning algorithms was the highest accuracy, which is known as all true positive and negative classifications per number of instances. We have outlined the definitions of Precision and Recall. Precision indicates the ratio of true positives to all instances classified as positive. Recall denotes the ratio of true positives to all positive instances in the data. We computed an averaged Recall value across all conditions (average over classes), which returns values weighted over GSC and DGC conditions and then averages weights based on the condition sizes.

Results were gained by machine learning algorithms predicting the PCA-transformed testing set. Machine Learning algorithms included Artificial Neural Network (ANN), Support Vector Machine (SVM), Tree Classification, Random Forest, AdaBoost, Gradient Boosting, k Nearest Neighbor, Stochastic Gradient Descenting, Naive Bayes, and Logistic Regression.

The ANN was set up as an MLPClassifier using the scikit-learn library and the ReLU activation function. The quantity of hidden layers fluctuated for each classification task, and for overall classification purposes, there were two layers containing 100 and 50 neurons each. In addition to fine-tuning the neural network architecture, we meticulously optimized the hyperparameters of the other algorithms through cross-validation using a grid search approach. In the case of SVM, we primarily leveraged the radial kernel (RBF) while experiment-



ing with different combinations of  $C$ , epsilon, and gamma pairs within the range of  $C$  values between 0.1 and 10. Concerning the tree classifications, including tree classification, RandomForest, Gradient Boosting, and AdaBoost, we adhered closely to the default parameters. However, for the forest-based algorithms, we maintained a consistently high number of trees/estimators exceeding 1000, while significantly varying the tree depth (excluding AdaBoost of course) and the number of attributes considered at each split. Additionally, we adjusted the learning rate for Gradient Boosting. Nevertheless, modifying these parameters had little effect on the outcomes. Ridge Regularization (L2) and  $C$ -values ranging from 0.001 to 1000 were employed for Logistic Regression. Stochastic Gradient Descending is considered to be a form of model training rather than a machine learning algorithm. In our study, we employed the SGDClassifier from scikit-learn, which can be interpreted as a linear SVM and Perceptron classifier with SGD training. Furthermore, Elastic Net Regularization was utilized here.

Clustering of cells was performed using k-means (initialized with KMeans++, 300 maximum iterations, and 10 re-runs) with respect to the silhouette plot as also biological assignment and thus a grouping of  $k = 4$ .

## C Results

### 1 Overview of spectral tumor characteristics

We cultured five GCS populations, HSR-GBM1, JHH520, BTSC-407, NCH644, BTSC-233, treated each as a condition with BMP4, following three single-point measurements within each cell. Pearson correlation reveals a maximum correlation of 0.25 between storage time of cells and spectral peak intensity. As a general overview, Fig. 3a represents preprocessed means and standard deviations of 1146 single-point GSC (red) and treated differentiated Glioblastoma cells (DGC, blue) measurements. Differences between both conditions are emphasized in Fig. 3b as a difference spectra. GSC signals were separated from DGC intensities. Accordingly, the most distinct peaks of GSCs are located between 1435–1439 and 1650–1658  $\text{cm}^{-1}$ . Under DGC conditions, the strongest signals

were observed at locations around 1001–1005, 1227–1236 and 1669  $\text{cm}^{-1}$ . To further distinguish contributions of each peak, the negative second derivative of each modality was calculated by a Savitzky–Golay filter as represented in Fig. 3c. Clear differences are highlighted at wavenumbers 825, 1002, 1126, 1207, 1250, 1304, 1445, 1550, 1657, and 1745  $\text{cm}^{-1}$ .

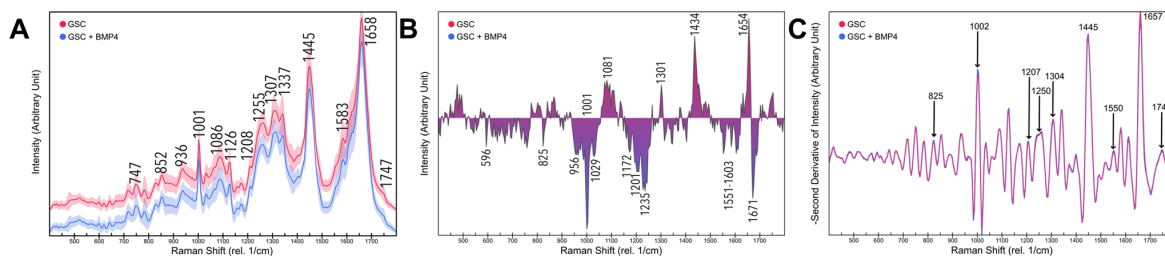
### 2 Description of cell line heterogeneity

To account for the heterogeneity of the tumor and correspondingly the molecular genetic profile of the cell lines, we further outline cell line differences. The mean spectra of each cell line are shown in Fig. 4a, peak contributions are elaborated in a negative second derivative calculated by Savitzky–Golay filter in Fig. 4b. The difference traces of GCS signals separated from DGC intensities are shown in Fig. 4c. The generation of these spectra is grounded on the allocation of the measurement points as illustrated in Table 1 before.

### 3 Stratification of biological clusters associated with cellular organelles

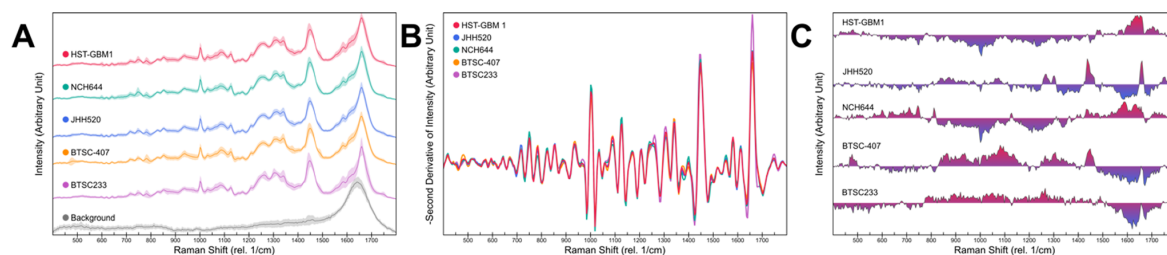
To allocate individual measurements inside the cell, K-means clustering ( $k = 4$ ) assigns all single-point measurements and shows peak contribution in Fig. 5a and b of each cluster. The distribution of measurements among the clusters is composed as listed hereafter: 600 counts in cluster 1, 67 counts in cluster 2, 406 counts in cluster 3, and 73 counts in cluster 4. Each cluster could be associated with specific fingerprints of putative cell compartments. To verify clusters are preserving most measurement information, the corresponding principal component analysis (PCA) is depicted in Fig. 5c with color-coding of clusters illustrating the first three components that explain 60% of the total variation.

Distribution of peaks in cluster 1 correlate to the cell nucleus: the range of 600–800  $\text{cm}^{-1}$  can be associated with the ring stretching vibrations of DNA/RNA.<sup>39</sup> The wave numbers 783  $\text{cm}^{-1}$  and 825  $\text{cm}^{-1}$  are typical peaks derived from nucleic acids, their pyrimidine rings, and asymmetrical PO2 double bonds.<sup>40</sup> Peak 1087  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to symmetric stretching of phosphate.<sup>40</sup> 1583  $\text{cm}^{-1}$  represents the C=C stretching of purine.<sup>39</sup> The findings indicate that the spectra are derived

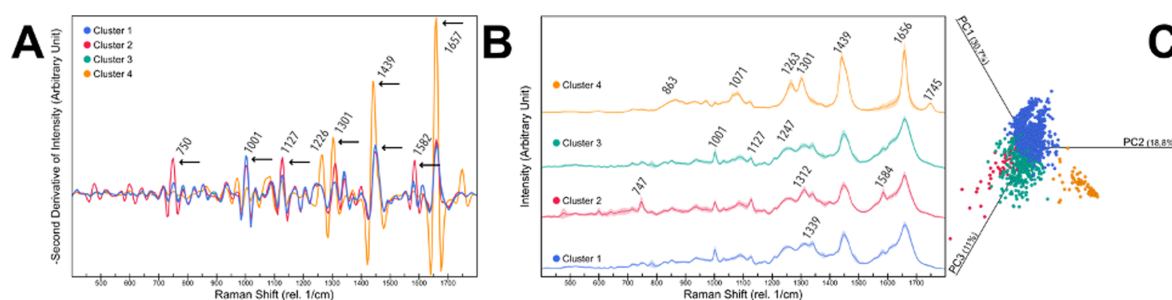


**Fig. 3** (a) Mean Raman spectra of Glioblastoma stem cells (red) and differentiated Glioblastoma cells (blue) and their standard deviation in 1146 measurements. (b) The difference traces calculated by subtraction of Raman spectra of distinguished Glioblastoma cells (negative) from Glioblastoma stem cells (positive) (c) Negative Savitzky–Golay filtered second derivative of Glioblastoma stem cells (red) and differentiated Glioblastoma cells (blue).





**Fig. 4** (a) Mean values and standard deviation of Raman spectroscopic measurements of HST-GBM1, NCH644, JHH520, BTSC-407, and BTSC233 including background (arbitrary units). (b) Negative Savitzky–Golay filtered the second derivative of each cell line. (c) The difference traces calculated by subtraction of Raman spectra of distinguished Glioblastoma cells (negative) from Glioblastoma stem cells (positive) within each cell line.



**Fig. 5** (a) Negative Savitzky–Golay filtered the second derivative of 4 cell clusters by k-Means. Labeled areas elucidate important differences among the clusters with outstanding amounts of nucleic acids in cluster 2 and lipid contents in cluster 4. (b) Mean spectra of clusters 1–4 and their standard deviation. (c) Principal component analysis of all measurements imaging principal components 1–3 with a total variation of 60%. Colorization uncovers the main distribution of variation along these clusters.

from an area with a high DNA/RNA concentration, as expected in the cell nucleus.

Cluster 2 is characterized by the presence of intense Raman peaks at the following positions: 747, 1127, 1312, and 1584  $\text{cm}^{-1}$ . These bands can be attributed to cytochrome *c*,<sup>41</sup> suggesting that cluster 2 can be identified as rich in mitochondria.

Clusters 3 seems related to cluster 1, while cluster 3 has higher fatty acid and lipid peaks which can be assigned to C–N bonds in membrane phospholipids.<sup>42</sup> Presumably, cluster 3 contains a higher membrane content. In addition to portions of the cell membrane, the distribution pattern of cluster 3 shows water content and correlation with proteins of cytoplasmic origin.<sup>43</sup>

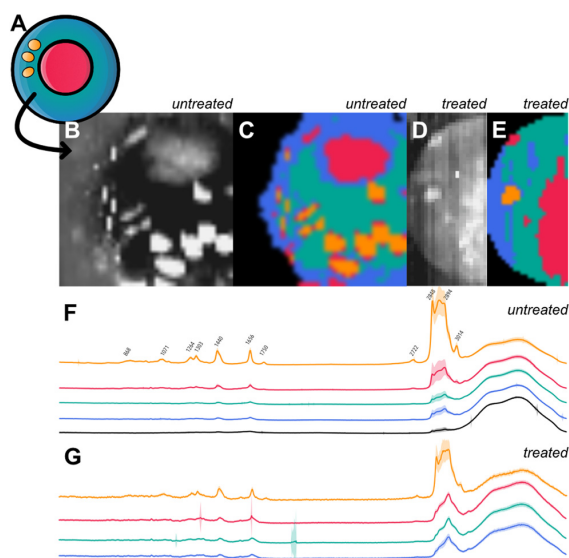
Cluster 4 has increased values at 863, 1071, 1263, 1301, 1439, 1656, and 1745  $\text{cm}^{-1}$ . Peaks in the area of 1000–1200  $\text{cm}^{-1}$  and bands around 1301  $\text{cm}^{-1}$  and 1439  $\text{cm}^{-1}$  are known to originate from fatty acids.<sup>43</sup> Bands at 1263, 1301, 1439, and 1656  $\text{cm}^{-1}$  are distinctive of diverse contents attributed to lipids.<sup>39</sup> The peak at the wavenumber 1745  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to C=O stretching found in the ester group of lipids and phospholipids.<sup>44</sup> It is likely that cluster 4 is measured within a fatty cell component with high lipid concentrations like lipid droplets or lipid vesicles. We further guided our findings through reference cell imaging as shown in Fig. 6. As reference, a sketch of cell compartments is shown in Fig. 6a

with assignment of cluster 1 to the nucleus, cluster 2 to mitochondria, cluster 3 to the cytoplasm with different densities of biological mass and membrane involvement and cluster 4 to a lipid-rich cell organelle, like lipid vesicles or lipid droplets. The color-coded integral of the Raman intensity (400–3700  $\text{cm}^{-1}$ ) with a Raman spectroscopic resolution of 500 nm across a 20  $\mu\text{m}^2$  area illustrates measurements of a BTSC-233 GSC cell (Fig. 6b). K-means clustering ( $k = 5$  including background) illustrates comparable subgroups to the clustering of single-point measurements (Fig. 6c). Fig. 6d and e shows a treated HSR-GBM1 DGC counterpart and its Raman intensity (400–3700  $\text{cm}^{-1}$ ) and comparable clustering by k-means. The mean spectra of each cluster in treated and untreated conditions are shown in Fig. 6f (untreated) and Fig. 6g (treated) serving as references for our previous endeavoured cell organelle classification.

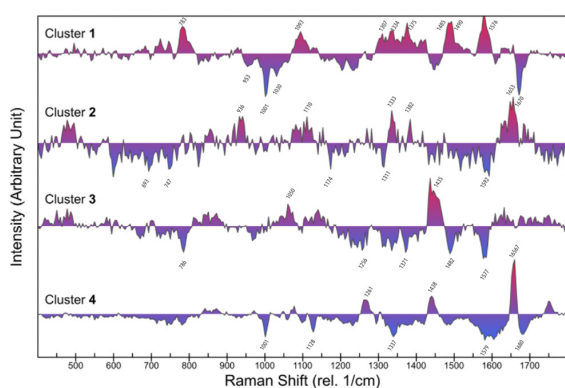
#### 4 Description of GSC characteristics in identified cellular organelles

Spectral differences between both treatment conditions of each cluster may offer potential insights into chemical and metabolic changes within the respective compartments and thus, phenotypic differences. Fig. 7 shows the difference traces between clusters. As our study focuses on these differences, a list of promising peaks is listed hereafter:





**Fig. 6** (a) Cell sketch highlights the estimated correlation between cell compartment clustering and spectroscopic content. It illustrates the attribution of clusters 1 being nucleus, cluster 2 assigned as mitochondria-rich, cluster 3 containing cytoplasm plus membrane content and cluster 4 as lipid droplets. (b) Raman brightness-coded hyper-spectral image of a single BTSC-233 Glioblastoma stem cell (resolution 500 nm across  $20 \mu\text{m}^2$  area,  $400\text{--}3700 \text{cm}^{-1}$ ) illustrates cell organelles. (c) K-Means clustering ( $k = 5$  including background) shows cluster distribution as described for the single-point measurements. (d) Raman brightness-coded hyper-spectral image of a single HSR-GBM1 BMP4 treated cell (resolution 250 nm across  $15 \mu\text{m}^2$  area,  $400\text{--}3700 \text{cm}^{-1}$ ) (e) K-means clustering of HSR-GBM1 cell (f) mean spectra and standard deviation of Raman GSC BTSC-233 image clustering (arbitrary units,  $400\text{--}3700 \text{cm}^{-1}$ ) (g) mean spectra and standard deviation of Raman DGC HSR-GBM1 image clustering (arbitrary units,  $400\text{--}3700 \text{cm}^{-1}$ ).



**Fig. 7** The difference traces calculated by subtraction of Raman spectra of distinguished Glioblastoma cells (negative) from Glioblastoma stem cells (positive) in k-Means ( $k = 4$ ) clustered cell compartments.

Primary areas of GSCs in cluster 1 can be described in the areas with the most prominent peaks at 783, 1093, 1307, 1334, 1375, 1485, 1490 and  $1576 \text{cm}^{-1}$ . DGCs are characterized most

distinguishably by dominant signals at  $953, 1001, 1030 \text{cm}^{-1}$  and  $1670 \text{cm}^{-1}$ .

The main differences in cluster 2 predominant in GSCs are around  $936, 1110, 1333, 1382$  and  $1653 \text{cm}^{-1}$ , DGCs show highest peaks at  $693, 747, 1174, 1311$  and  $1592 \text{cm}^{-1}$ .

In cluster 3, the main areas of the GSC fraction are  $1050$  and  $1435 \text{cm}^{-1}$ . The main areas of the DGC fraction are leading at  $786, 1256, 1371, 1482$  and  $1577 \text{cm}^{-1}$ .

Cluster 4 contains GSC leading areas around  $1261, 1438$  and especially  $1657 \text{cm}^{-1}$  has a high intensity. DGC dominating areas can be observed at  $1001, 1128, 1337, 1579$  and  $1680 \text{cm}^{-1}$ .

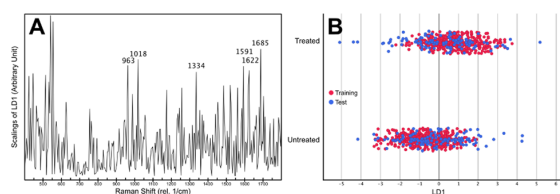
### 5 Machine learning classification identifies the most characteristic peaks for discriminating tumor stem cells, which can be used as stand-alone markers for stratification

To derive a prediction from the results in an application-driven manner, automatic preprocessing steps, LDA, PCA, and machine learning algorithms were applied, and parameters of all algorithms were optimized to achieve highest accuracy. LDA achieves a discrimination accuracy of 54%. Absolute scaling values of SciKits LDA show each peaks relevance for stem cell feature discrimination, highlighting the highest peaks at  $1685, 1018, 963, 1591, 1622, 1334$  and  $1655 \text{cm}^{-1}$  to have a potential effect for discrimination as seen in Fig. 8a.

Machine learning algorithms perform superior according to Table 2. An overall accuracy of 60.3% can be achieved by k Nearest-Neighbors algorithm (Table 2a). Best predictions within each cell component are 57.3% in cluster 1/nucleus by k Nearest-Neighbors, 72.7% in cluster 2/mitochondria by AdaBoost and Tree Classification, 63.1% in cluster 3/cytoplasm by Naive Bayes and 91.7% in cluster 4/lipid droplets by Stochastic Gradient Descending (Table 2b).

In cell lines, the best predictions are 73% in HSR-GBM1 by Naive Bayes, 63.9% in JHH520 by k Nearest-Neighbors, 67.4% in NCH644 by Random Forest, 71.9% in BTSC-407 by Random Forest and 63.2% in BTSC-233 by Gradient Boosting (Table 2c).

As we are aiming to use the algorithms in surgical practice on larger areas of tissue, the time of acquisition of data that might be defining of GSC residence must be as short as possible. Time can be saved significantly by narrowing the focus of data acquisition to a few selected peaks instead of the entire



**Fig. 8** (a) Scikit-learn scalings from Linear Discriminant Analysis highlighting the origin of its classification. (b) Differentiated Glioblastoma cells (treated by BMP4) and Glioblastoma stem cells (untreated cell culture) and their subdivision by Linear Discriminant Analysis (LD1). The training dataset (red) is preferably separated compared to the testing dataset (blue).



Open Access Article. Published on 06 November 2023. Downloaded on 3/9/2025 8:21:28 PM.  
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.



**Table 2** Glioblastoma stem cell (GSC) classification performance of ten state-of-the-art machine learning algorithms measured by a random 20% test dataset

Algorithms	Accuracy (%) <sup>a</sup>	Precision (%)	Recall (%)	Accuracy of cluster 1 (%) <sup>b</sup>	Accuracy of cluster 2 (%)	Accuracy of cluster 3 (%)	Accuracy of cluster 4 (%)	Accuracy of HSR-GBM1 (%) <sup>c</sup>	Accuracy of JHH520 (%)	Accuracy of NCH644 (%)	Accuracy of BTSC-407 (%)	Accuracy of BTSC-233 (%)
Artificial Neural Network	54.9	55.7	54.9	51	63.6	58.5	66.7	62.2	58.3	51.2	59.4	65.8
Support Vector Machine	51.6	50.3	51.6	55.2	63.6	56.9	66.7	56.8	52.8	58.1	62.5	57.9
Stochastic Gradient Descent	47.8	51.4	47.8	47.9	63.6	53.8	91.7	62.2	55.6	55.8	59.4	52.6
k Nearest Neighbour	60.3	62.9	60.3	57.3	63.6	58.5	33.3	59.5	63.9	58.1	71.9	52.6
Logistic Regression	47.8	51.2	47.8	45.8	54.5	52.3	83.3	59.5	55.6	55.8	56.2	52.6
Gradient Boosting	50.5	52.9	50.5	47.9	18.2	60	50	54.1	36.1	58.1	62.5	63.2
AdaBoost	56	59.1	56	49	72.7	56.9	41.7	48.6	41.7	48.8	65.6	60.5
Random Forest	53.3	56.8	53.3	50	54.5	52.3	58.3	45.9	52.8	67.4	71.9	55.3
Tree	54.9	57.2	54.9	50	72.7	41.5	58.3	59.5	63.9	53.5	34.4	52.6
Naive Bayes	48.4	49.7	48.4	52.6	63.6	63.1	75	73	55.6	62.8	62.5	42.1

<sup>a</sup> Accuracy (main target), precision, and recall of GSC prediction. <sup>b</sup> GSC classification, accuracy of each cluster/cell compartment. <sup>c</sup> GSC classification, accuracy of each cell line.

spectrum acquisition. Considering the described results on putative biological stratification and scaling of the algorithms, we performed a feature selection of distinct peaks from our previous analysis and biological review for the most promising cell compartments. Selecting the top five LDA scaling values, as seen in Fig. 7a, achieves 65.3% accuracy by ANN (Precision 0.681, Recall 0.653) in cluster 2. Narrowing the number of peaks in lipid organelles while still using PCA achieves likewise results of 91.7% by ANN. Selection of up to 10 out of all leading lipid-rich peaks results in a maximum accuracy of 69.4% by SVM (Precision 0.708, Recall 0.694), selection of single peaks achieves an accuracy of up to 63% for 1001 cm<sup>-1</sup>. Interestingly 1001 cm<sup>-1</sup> (associated with tryptophan) scores 80% (Precision 0.81; Recall 0.80) by Tree classification in cluster 2 (cytochrome c-rich compartment).

## D Discussion

Over the last two decades, establishing methods for specific identification of tumor stem cells based on putative biomarkers has been the center of various research projects worldwide. Yet, none of the discoveries has entered clinical routine, mostly due to inefficient repeatability of preclinical results in human settings, and conflicting evidence on the utility of the proposed biomarker to unequivocally stratify stem cells from non-cancer stem cells.<sup>20,45–47</sup> Our project associates to this long endeavour but with new innovation that makes us believe our approach has the utility to enter clinical application in the future, due to its (a) computational based fundament minimizing human operator introduced bios/errors in data interpretation meanwhile elevating the recognition of hitherto never described biomarker discovery and (b) – building up on previous successes of others proving the potential of the rapidity of result generation using Raman spectroscopy<sup>13,14,21,48,49</sup> – the theoretical realistic implementation in fast pace intraoperative setting.

We hypothesize these statements based on the fact that very recently, machine learning- and deep learning-supported Raman spectroscopy diagnostics has innovated a wide range of sectors in biology and medicine, such as food quality control<sup>50,51</sup> or pathogen analytics<sup>52</sup> incl. the establishment of a rapid SARS-CoV2 diagnostics that circumvents the long waiting times for the results when using amplification-based PCR tests, meanwhile maintaining high specificity and sensitivity of the test.<sup>53</sup> Regarding cancer, machine learning-assisted Raman spectroscopy diagnostics was recently shown to allow the stratification of tumors that are resistant to immune therapy,<sup>54</sup> raising hopes to improve the economic effectivity of these revolutionary but certainly very cost-intensive cancer therapies. Moreover, machine learning Raman spectroscopy can also classify neural differentiation stages of human induced pluripotent stem cells<sup>55</sup> or neural stem cells.<sup>25</sup>

Based on our experimental setup, we focus our discussion on the clustered cell organelles as well as a few novel selected peaks that we found of most relevance and interest due to the

amplitude of differences between GSC and DSC and the previous work of others that associate those signals with biological processes.

In general, GSCs have prevailing areas indicating mainly a greater lipid concentration and different protein structure of amide I and III: 1304  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to the CH<sub>2</sub> deformation of lipids, 1435–1439  $\text{cm}^{-1}$  is attributed to lipids CH<sub>2</sub> scissoring, CH<sub>2</sub> bending mode, and CH<sub>2</sub> deformation. 1447  $\text{cm}^{-1}$  is a common peak of lipids, fatty acids, phospholipids, and methylene groupings such as CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>. 1650–1658  $\text{cm}^{-1}$  is typical for the  $\nu(\text{C}=\text{C})$  stretch of lipids and fatty acids. It is also assigned to  $\alpha$ -helix structure and amide I. 1550  $\text{cm}^{-1}$  can be further described by tryptophan and NADH.<sup>42</sup> Significantly higher peaks of DGCs at 407 and 411  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to saccharide.<sup>55,56</sup>

Savitzky–Golay filtered negative second-derivative confirms noticeable differences by finding an increase of 1207  $\text{cm}^{-1}$  and 1250  $\text{cm}^{-1}$  in DGCs, which complies with the ring breathing mode of hydroxyproline, tryptophan, phenylalanine, adenosine and tyrosine, as also guanine, cytosine and amide III. 1745  $\text{cm}^{-1}$  is increased in GSCs and assigned to the C=O stretch of lipid esters, triglycerides, and phospholipids.<sup>42</sup>

Regarding machine learning classification, main scaling values of LDA can be correlated to protein (963, 1591  $\text{cm}^{-1}$ ), especially amide I (1655, 1685  $\text{cm}^{-1}$ ), ribose (1018  $\text{cm}^{-1}$ ), nucleic acids (1655  $\text{cm}^{-1}$ ) and lipids (1655  $\text{cm}^{-1}$ ), which follows our findings. Besides confocal measurements, our machine learning algorithms faced the challenge of heterogeneous cell lines. Considering this limitation, a general prediction of 60.3% across all organelles is the result of overfitting. This is underlined by the inability of the most promising algorithms like SVM and ANN, which are particularly vulnerable to overfitting despite parameter optimization.

To accentuate the impact and challenge towards the biological limitation in GBM, we would like to discuss our cell line response: regarding tumor heterogeneity, we found that the described cell line transcriptomes of our previous studies and the spectral profiles share affinities, as well as a strong correlation with the cell line response to BMP4 as published earlier by our laboratory.<sup>34</sup> Exemplary, the more responsive 407p can be more accurately classified with 71.9% compared to JHH520 with 63.9%.

As in compliance with our measurement setup, we overcome limitation of confocal measurements by automatic cell organelle classification. This further allows a detailed description of differences in GSCs and DGCs in each compartment: it has been described that cluster 1 has its origin in the nucleus while cluster 3 showed similarities and was described to have a cytoplasmic origin due to the water distribution and absence of characteristic peaks, as also partly membrane origin. GSCs seem to have higher content of nucleic acids in cluster 1, because of higher areas at 784, 1483–1491 and 1575–1579  $\text{cm}^{-1}$ . On the other hand, DGCs have higher nucleic acid content in cluster 3 in similar areas at 784, 1371, 1487, 1575–1583  $\text{cm}^{-1}$ . GSCs also have higher amounts of lipids in cluster 1 around 1375  $\text{cm}^{-1}$ , and CH<sub>2</sub> groups around 1431–1447  $\text{cm}^{-1}$  in cluster 3. DGCs are leading in phenylalanine in cluster 1 at 1001–1005

and in cluster 3 at 1583  $\text{cm}^{-1}$ . They also show higher amide I bands at 1665–1573  $\text{cm}^{-1}$  in cluster 1. Thus, we confirmed the former findings by identifying higher lipid quantity in GSCs and showed larger amide I bands in DGCs cytoplasm.<sup>39</sup> Additionally, the shift of nucleic acids from cluster 1 to cluster 3 during differentiation could be a potential conduct of GSCs. The propagation of nucleic acids in cluster 3, an estimated membrane content like rough endoplasmic reticulum, could be debated as increased transcription because of higher RNA content near the ribosomes. Because nucleic acids were identified as a main target for stem cell identification in previous findings, further research is needed to reveal deeper insights into the changes in nucleic acids in stem cells.<sup>57</sup> We find main intensities in GSCs at 1439  $\text{cm}^{-1}$  and 1650–1662  $\text{cm}^{-1}$  in the liposomal cluster 4. These areas are described as lipids, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>,  $\nu(\text{C}=\text{C})$  *cis* of phospholipids, triglycerides, cholesterol band, ceramide backbone, and C=C groups of unsaturated fatty acids. The quotient of the peak intensities at 1656  $\text{cm}^{-1}$ /1444  $\text{cm}^{-1}$  is often used as an approximation of the unsaturation degree in fatty acids. In this cluster, GSCs have a 3.31% higher amount of unsaturated lipids.<sup>43,58</sup>

After clustering, we extracted great results of 91.7% in lipid organelles, which we discussed as lipid droplets. This matches the reports published about lipid droplets in stem cells being differently configured than their differentiated progeny.<sup>45,59–61</sup> One inference for the obtained favourable performance against the limited quantity of measurements may be the very intense Raman signal of the lipid bands, as well as the biological valence of these organelles. Regarding clinical usage, an intracellular measurement inside a lipid organelle would lead to a confident hit above 90%. Building on this potential, we strongly recommend that this structure be verified and subjected to more rigorous analysis in follow-up work. Expanding on these foundations, additional follow-up work could elaborate on our features to improve classification success. This could be achieved through examining feature importances from random forest and XgBoost, the coefficient values from linear SVC or employing penalised logistic regression (such as LASSO or elastic net penalty) to reduce the number of necessary features for modelling purposes.

Importantly, our data also suggests the realization of GSC detection of selected stand-alone markers as described in results, which could give a huge opportunity for intraoperative application. We speculate that the selection of 4–5 peaks out of over 1400 peaks in general or with focus on enhanced cytochrome signals and lipid bands will give a significant reduction of time for recording compared to total spectra recording allowing the rapid scanning of various cm of length, feasible to be conducted in an intraoperative setting.

From a surgical standpoint of view, our study has limitations, when it comes to speculating on the clinical potential of our results *per se*. Firstly, although our applied disease model systems have recently been shown to present a solid basis for repeatable research and recapitulate core molecular parameters of patient tumors,<sup>33</sup> facts which we find a fundamental basis to argue any potential translational relevance of



our *in vitro* data, the entire data was generated in pure experimental conditions. Confirmatory studies on fresh tumor material, whether upon short-term *in vitro* processing or direct tumor resection specimens, are needed to verify our hypothesis. Since we envision to use hand held Raman devices,<sup>62</sup> we do not think *ex vivo* applications such as simulated with imaging on xenograft *in vivo* models of cancers are relevant to benchmark our assay for its applicability. Secondly, the Raman microscope applied is a high-end instrument purchased primarily to perform highly sensitive spatially resolved analyses in materials science. It requires verification if our Raman signals can be detected equally with a putatively transferable system in the operation room.

## E. Conclusions

We successfully evaluated the preclinical usability of confocal Raman spectroscopic and machine learning-guided approach to classifying tumor stem cells from non-tumor stem cells *in vitro*. Tailoring machine learning-based identification of differences of tumor stem cells Raman spectra in clusters and to a few selected peaks, we introduce new standalone diagnostic opportunities. Our results suggest these results are based on biological alterations of lipids and proteins in GCSs and mainly in lipid-rich organelles. However, confirmatory studies on fresh tumor resection specimens or *in-man* applications using an instrumental setup that can be implemented in operation room processes are needed to make conclusive statements regarding our data's clinical relevance. As a starting point, our work highlights machine learning and deep learning network computation combined with Raman spectroscopy having the potential to innovate surgical oncology and guide neurosurgical decision-making towards better treatment options and patient outcome.

## Author contributions

Conceptualization, L.W., M.H., B.F. and U.K.; methodology, L.W. and B.F.; software, L.W. and B.F.; validation, L.W., D.R., I.F., V.N., R.C., M.H., B.F., J.D. and U.K.; formal analysis, L.W. and I.F.; investigation, L.W., I.F., V.N., R.G., R.C., M.H., B.F. and U.K.; resources, L.W., B.F. and U.K.; data curation, L.W. and B.F.; writing—original draft preparation, L.W.; writing—review and editing, D.R., I.F., V.N., R.G., R.C., M.H., B.F., J.D. and U.K.; visualization, L.W.; supervision, M.H., B.F., J.D. and U.K.; project administration, L.W., B.F. and U.K.; funding acquisition, M.H., B.F. and U.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Conflicts of interest

B.F. is the managing director of FISCHER GmbH. The company performed the Raman measurements. The other authors declare no competing interests.

## Acknowledgements

We thank Michael Hewera and Ann-Christin Nickel for their laboratory support.

## References

- 1 K. D. Miller, L. Nogueira, A. B. Mariotto, J. H. Rowland, K. R. Yabroff, C. M. Alfano, A. Jemal, J. L. Kramer and R. L. Siegel, *CA-Cancer J. Clin.*, 2019, **69**, 363–385.
- 2 S. K. Perera, S. Jacob, B. E. Wilson, J. Ferlay, F. Bray, R. Sullivan and M. Barton, *Lancet Oncol.*, 2021, **22**, 182–189.
- 3 R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs and A. Jemal, *CA-Cancer J. Clin.*, 2021, **71**, 7–33.
- 4 G. Tabatabai and M. Weller, *Cell Tissue Res.*, 2011, **343**, 459–465.
- 5 S. J. Sundar, J. K. Hsieh, S. Manjila, J. D. Lathia and A. Sloan, *Neurosurg. focus*, 2014, **37**(6), E6.
- 6 S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner and J. N. Rich, *Nature*, 2006, **444**, 756–760.
- 7 A. L. V. Alves, I. N. F. Gomes, A. C. Carloni, M. N. Rosa, L. S. Da Silva, A. F. Evangelista, R. M. Reis and V. A. O. Silva, *Stem Cell Res. Ther.*, 2021, **12**(1), 206.
- 8 N. Takebe, L. Miele, P. J. Harris, W. Jeong, H. Bando, M. Kahn, S. X. Yang and S. P. Ivy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2015, **12**, 445–464.
- 9 K. Biserova, A. Jakovlevs, R. Uljanovs and I. Strumfa, *Cells*, 2021, **10**, 621.
- 10 R. Stupp, W. P. Mason, M. J. Van Den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi and U. Bogdahn, *N. Engl. J. Med.*, 2005, **352**, 987–996.
- 11 U. Kahlert, G. Nikkhah and J. Maciaczyk, *Cancer Lett.*, 2013, **331**, 131–138.
- 12 J. D. Lathia, S. C. Mack, E. E. Mulkearns-Hubert, C. L. Valentim and J. N. Rich, *Genes Dev.*, 2015, **29**, 1203–1217.
- 13 B. Broadbent, J. Tseng, R. Kast, T. Noh, M. Brusatori, S. N. Kalkanis and G. W. Auner, *J. Neuro-Oncol.*, 2016, **130**, 1–9.
- 14 T. Hollon, S. Lewis, C. W. Freudiger, X. S. Xie and D. A. Orringer, *Neurosurg. focus*, 2016, **40**(3), E9.
- 15 F.-K. Lu, D. Calligaris, O. I. Olubiyi, I. Norton, W. Yang, S. Santagata, X. S. Xie, A. J. Golby and N. Y. R. Agar, *Cancer Res.*, 2016, **76**, 3451–3462.
- 16 H. J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, P. L. Martin-Hirsch, M. J. Walsh, M. R. McAinsh, N. Stone and F. L. Martin, *Nat. Protoc.*, 2016, **11**, 664–687.
- 17 C. Aksoy and F. Severcan, *Spectroscopy*, 2012, **27**, 167–184.
- 18 H. Karabeber, R. Huang, P. Iacono, J. M. Samii, K. Pitter, E. C. Holland and M. F. Kircher, *ACS Nano*, 2014, **8**, 9755–9766.



- 19 J. Desroches, M. Jermyn, M. Pinto, F. Picot, M.-A. Tremblay, S. Obaid, E. Marple, K. Urmey, D. Trudel and G. Soulez, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 1–10.
- 20 S. Schipmann, M. Schwake, E. Suero Molina and W. Stummer, *J. Neurol. Surg. Part A*, 2019, **80**(6), 475–487.
- 21 D. DePaoli, É. Lemoine, K. Ember, M. Parent, M. Prud'homme, L. Cantin, K. Petrecca, F. Leblond and D. C. Côté, *J. Biomed. Opt.*, 2020, **25**, 050901.
- 22 D. Reinecke, N. Von Spreckelsen, C. Mawrin, A. Ion-Margineanu, G. Fürtjes, S. T. Jünger, F. Khalid, C. W. Freudiger, M. Timmer, M. I. Ruge, R. Goldbrunner and V. Neuschmelting, *Acta Neuropathol. Commun.*, 2022, **10**, 109.
- 23 R. Gautam, S. Vanga, F. Ariese and S. Umapathy, *EPJ Tech. Instrum.*, 2015, **2**, 1–38.
- 24 L. J. Livermore, M. Isabelle, I. M. Bell, C. Scott, J. Walsby-Tickle, J. Gannon, P. Plaha, C. Vallance and O. Ansoorge, *Neuro-Oncol. Adv.*, 2019, **1**, vdz008.
- 25 J. Geng, W. Zhang, C. Chen, H. Zhang, A. Zhou and Y. Huang, *Anal. Chem.*, 2021, **93**, 10453–10461.
- 26 S. N. Kalkanis, R. E. Kast, M. L. Rosenblum, T. Mikkelsen, S. M. Yurjevic, K. M. Nelson, A. Raghunathan, L. M. Poisson and G. W. Auner, *J. Neuro-Oncol.*, 2014, **116**, 477–485.
- 27 S. Kumar, A. Visvanathan, A. Arivazhagan, V. Santhosh, K. Somasundaram and S. Umapathy, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 12067–12074.
- 28 D. Garnier, O. Renoult, M.-C. Alves-Guerra, F. Paris and C. Pecqueur, *Front. Oncol.*, 2019, **9**, 118.
- 29 Y. Zhou, C.-H. Liu, B. Wu, X. Yu, G. Cheng, K. Zhu, K. Wang, C. Zhang, M. Zhao and R. Zong, *J. Biomed. Opt.*, 2019, **24**, 095001.
- 30 N. Feuerer, D. A. Carvajal Berrio, F. Billing, S. Segan, M. Weiss, U. Rothbauer, J. Marzi and K. Schenke-Layland, *Biomedicines*, 2022, **10**, 989.
- 31 V. Revin, L. Balykova, S. Pinyaev, I. Syusin, O. Radaeva, N. Revina, Y. Kostina, E. Kozlov, V. Inchina, I. Nikitin, A. Salikov and I. Fedorov, *Biomedicines*, 2022, **10**, 553.
- 32 I. P. Santos, E. M. Barroso, T. C. Bakker Schut, P. J. Caspers, C. G. F. Van Lanschot, D.-H. Choi, M. F. Van Der Kamp, R. W. H. Smits, R. Van Doorn, R. M. Verdijk, V. Noordhoek Hegt, J. H. Von Der Thüsen, C. H. M. Van Deurzen, L. B. Koppert, G. J. L. H. Van Leenders, P. C. Ewing-Graham, H. C. Van Doorn, C. M. F. Dirven, M. B. Busstra, J. Hardillo, A. Sewnaik, I. Ten Hove, H. Mast, D. A. Monserez, C. Meeuwis, T. Nijsten, E. B. Wolvius, R. J. Baatenburg De Jong, G. J. Puppels and S. Koljenović, *Analyst*, 2017, **142**, 3025–3047.
- 33 A. Nickel, D. Picard, N. Qin, M. Wolter, K. Kaulich, M. Hewera, D. Pauck, V. Marquardt, G. Torga and S. Muhammad, *Biomed. Pharmacother.*, 2021, **144**, 112278.
- 34 K. Koch, R. Hartmann, A. K. Suwala, D. H. Rios, M. A. Kamp, M. Sabel, H.-J. Steiger, D. Willbold, A. Sharma, U. D. Kahlert and J. Maciaczyk, *Cancers*, 2021, **13**, 6001.
- 35 L. T. Kerr, H. J. Byrne and B. M. Hennelly, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 5041–5052.
- 36 F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss and V. Dubourg, *J. Mach. Learn. Res.*, 2011, **12**, 2825–2830.
- 37 J. Demšar, T. Curk, A. Erjavec, Č. Gorup, T. Hočevar, M. Milutinović, M. Možina, M. Polajnar, M. Toplak and A. Starič, *J. Mach. Learn. Res.*, 2013, **14**, 2349–2353.
- 38 S. Wartewig, *IR and Raman spectroscopy: fundamental processing*, John Wiley & Sons, 2006.
- 39 J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenaabeele and L. Moens, *J. Raman Spectrosc.*, 2007, **38**, 1133–1147.
- 40 Y. Chen, J. Dai, X. Zhou, Y. Liu, W. Zhang and G. Peng, *PLoS One*, 2014, **9**, e93906.
- 41 M. Okada, N. I. Smith, A. F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka and K. Fujita, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 28–32.
- 42 Z. Movasaghi, S. Rehman and I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2007, **42**, 493–541.
- 43 C. Krafft, I. Schie, T. Meyer, M. Schmitt and J. Popp, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 1819–1849.
- 44 C. Matthäus, T. Chernenko, C. Stiebing, L. Quintero, M. Miljković, L. Milane, A. Kale, M. Amiji, S. Lorkowski, V. Torchilin, J. Popp and M. Diem, *Confocal Raman Microscopy*, Springer International Publishing, 2018, pp. 273–305, DOI: [10.1007/978-3-319-75380-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75380-5_13).
- 45 I. Notingher, I. Bisson, J. M. Polak and L. L. Hench, *Vib. Spectrosc.*, 2004, **35**, 199–203.
- 46 A. Downes, R. Mouras, P. Bagnaninchi and A. Elfick, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, **42**, 1864–1870.
- 47 O. Uckermann, R. Galli, M. Anger, C. Herold-Mende, E. Koch, G. Schackert, G. Steiner and M. Kirsch, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014, **90**, 710–717.
- 48 R. Galli, O. Uckermann, T. Sehm, E. Leipnitz, C. Hartmann, F. Sahm, E. Koch, G. Schackert, G. Steiner and M. Kirsch, *J. Biophotonics*, 2019, **12**, e201800465.
- 49 T. C. Hollon, B. Pandian, A. R. Adapa, E. Urias, A. V. Save, S. S. S. Khalsa, D. G. Eichberg, R. S. D'Amico, Z. U. Farooq, S. Lewis, P. D. Petridis, T. Marie, A. H. Shah, H. J. L. Garton, C. O. Maher, J. A. Heth, E. L. McKean, S. E. Sullivan, S. L. Hervey-Jumper, P. G. Patil, B. G. Thompson, O. Sagher, G. M. McKhann, R. J. Komotar, M. E. Ivan, M. Snuderl, M. L. Otten, T. D. Johnson, M. B. Sisti, J. N. Bruce, K. M. Muraszko, J. Trautman, C. W. Freudiger, P. Canoll, H. Lee, S. Camelo-Piragua and D. A. Orringer, *Nat. Med.*, 2020, **26**, 52–58.
- 50 S. Yan, S. Wang, J. Qiu, M. Li, D. Li, D. Xu, D. Li and Q. Liu, *Talanta*, 2021, **226**, 122195.
- 51 S. Hu, H. Li, C. Chen, C. Chen, D. Zhao, B. Dong, X. Lv, K. Zhang and Y. Xie, *Sci. Rep.*, 2022, **12**, 3456.
- 52 S. Yu, X. Li, W. Lu, H. Li, Y. V. Fu and F. Liu, *Anal. Chem.*, 2021, **93**, 11089–11098.
- 53 D. Paria, K. S. Kwok, P. Raj, P. Zheng, D. H. Gracias and I. Barman, *Nano Lett.*, 2022, **22**(9), 3620–3627.
- 54 S. K. Paidi, J. Rodriguez Troncoso, P. Raj, P. Monterroso Diaz, J. D. Ivers, D. E. Lee, N. L. Avaritt, A. J. Gies, C. M. Quick, S. D. Byrum, A. J. Tackett, N. Rajaram and I. Barman, *Cancer Res.*, 2021, **81**, 5745–5755.



- 55 C.-C. Hsu, J. Xu, B. Brinkhof, H. Wang, Z. Cui, W. E. Huang and H. Ye, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2020, **117**, 18412–18423.
- 56 I. R. M. Ramos, A. Malkin and F. M. Lyng, *BioMed Res. Int.*, 2015, **2015**, 561242.
- 57 A. Ghita, F. C. Pascut, M. Mather, V. Sottile and I. Notingher, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 3155–3162.
- 58 A. Kaczor, K. M. Marzec, K. Majzner, K. Kochan, M. Z. Pacia and M. Baranska, in *Confocal Raman Microscopy*, Springer, 2018, pp. 307–346.
- 59 F. Geng, X. Cheng, X. Wu, J. Y. Yoo, C. Cheng, J. Y. Guo, X. Mo, P. Ru, B. Hurwitz, S.-H. Kim, J. Otero, V. Puduvalli, E. Lefai, J. Ma, I. Nakano, C. Horbinski, B. Kaur, A. Chakravarti and D. Guo, *Clin. Cancer Res.*, 2016, **22**, 5337–5348.
- 60 L. Tirinato, F. Pagliari, T. Limongi, M. Marini, A. Falqui, J. Seco, P. Candeloro, C. Liberale and E. Di Fabrizio, *Stem Cells Int.*, 2017, **2017**, 1656053.
- 61 S. Shakya, A. D. Gromovsky, J. S. Hale, A. M. Knudsen, B. Prager, L. C. Wallace, L. O. F. Penalva, H. A. Brown, B. W. Kristensen, J. N. Rich, J. D. Lathia, J. M. Brown and C. G. Hubert, *Acta Neuropathol. Commun.*, 2021, **9**(1), 101.
- 62 M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, J. Desroches, J. Pichette, K. Saint-Arnaud, L. Bernstein, M.-C. Guiot, K. Petrecca and F. Leblond, *Sci. Transl. Med.*, 2015, **7**, 274ra219.



## 3. Diskussion

### 3.1 Etablierung einer neuen Methodik

GBM war der erste vollständig genomisch kartierte Tumor des Cancer Genome Atlas Projects der TCGA (Koo *u. a.*, 2020; Nguyen *u. a.*, 2021), dennoch konnten bisher keine bedeutsam prognoseverbessernden Therapien etabliert werden. Es besteht eine Lücke bei der Übertragung von präklinischen Erkenntnissen zur Entwicklung personalisierter Therapien. Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Technologie mittels konfokaler Raman-Spektroskopie und maschinellem Lernen zu etablieren, um diese Lücke zu schließen. Es sollten GSC schnell und ohne zusätzliche Markierung präklinisch klassifiziert werden können, um deren Diagnostik zukünftig intraoperativ anwendbar zu machen und Erkenntnisse *in vivo* zu übertragen. Dabei konnten wir zeigen, dass diese kombinierten Methoden in der Lage sind, GSC und DGC anhand von Messungen an beliebigen Zellarealen automatisiert zu unterscheiden. Trotz der Limitierung durch intra- und intertumorale Heterogenität der Messpunkte weisen die Resultate auf ein vielversprechendes Potenzial dieser Methodik hin. Dies ist besonders für eine spätere translationale Anwendung von großer Relevanz.

Um die Heterogenität des GBM möglichst realitätsnah abzubilden, kamen fünf verschiedene Zelllinien zum Einsatz, die in Neurosphären-Kulturbedingungen gezüchtet wurden. Diese Zellmodelle bilden das GBM präklinisch realitätsnah ab (Ciechomska *u. a.*, 2023). Pädiatrische Zelllinien blieben für die Untersuchung unberücksichtigt, dies erhöht die Relevanz der vorliegenden Arbeit entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation. Zur Sicherstellung der Zellviabilität und -vitalität im Hinblick auf Mess- und Transportzeiten wurden spektrale Intensität und visuelle lichtmikroskopische Kriterien geprüft, wobei apoptotische Zellen sich durch eine verringerte Intensität, einen gesteigerten Wasserhaushalt und erhöhtes Hintergrundrauschen auszeichneten. So konnten wir feststellen, dass die Zellen bis zu 6 Messungen mit jeweils 10 Sekunden Messzeit tolerierten, bevor erste Veränderungen eintraten.

Der in der Methodik dieser Arbeit etablierte Standard inklusive der etablierten Vorverarbeitungs-Algorithmen mit Rauschreduktion erhöht die Reproduzierbarkeit in zukünftigen Studien und ebnet damit die translationale Forschung.

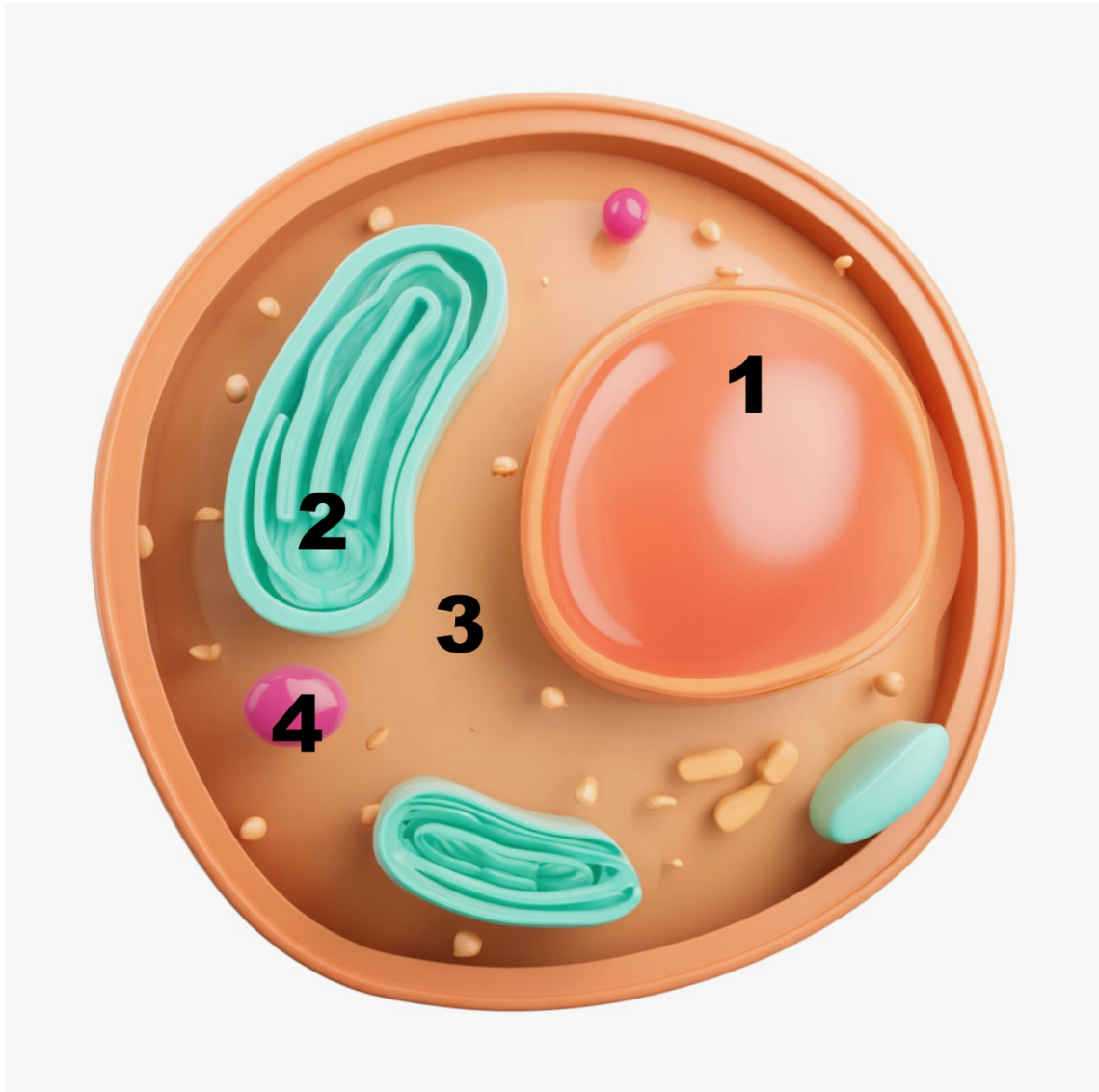
Im Rahmen der Experimente wurden verschiedene Laser-Wellenlängen im infraroten und grünen Spektralbereich eingesetzt. Es wurden Referenz-Hyperspektren der Zellen aufgenommen, um diese mit *Clustering* sowie biologischer Referenz Zellkomponenten zuzuordnen. Pro Zelle wurden drei konfokale Messpunkte gewählt, um zu untersuchen, ob auf diese Weise an beliebigen Stellen in der Zelle schnell und zuverlässig relevante Stoffwechselwege eine Differenzierung zwischen GSC und DGC erlauben. Dies ermöglicht die Diagnostik auf intrazellulärem Niveau.

Die Messqualität wurde durch ausschließliche Verwendung grünen Laserlichtes, ein immersives Objektiv mit 63 x Vergrößerung und ein streuarmes Calcium Fluorid (CaF<sub>2</sub>) Substrat erhöht. Darüber hinaus wurde die Leistungsfähigkeit verschiedener ML-Algorithmen mit jeweils unterschiedlicher Komplexität untersucht, um entsprechende Algorithmen für translationale Anwendung zu evaluieren.

### 3.2 Zuordnung zu biologischen Strukturen

Die etablierte Technologie kann unterschiedliche molekulare Fingerabdrücke der GSCs und DGCs abbilden. Durch Referenzen können hieraus Rückschlüsse auf biochemische Zusammensetzung der Zellen geschlossen werden. Ein wesentliches Merkmal dieser Arbeit ist die Auswertung der Daten in Bezug auf spezifische Zellkompartimente. Anhand der spektralen Ähnlichkeiten wurden die 1146 Einzelmessungen mittels unüberwachter Clusteranalyse in vier Gruppen unterteilt, die eindeutig verschiedenen subzellulären Bereichen entsprechen (s. Abbildung 2): Cluster 1 mit DNA-/RNA-assoziierten Banden bei 783 cm<sup>-1</sup> und 825 cm<sup>-1</sup> mutmaßlich als Zellkern, Cluster 2 mit Cytochrom C Banden bei 747, 1312, 1584 cm<sup>-1</sup> als Mitochondrien, Cluster 3 mit Ähnlichkeit zu Cluster 1 - aber mit

vermehrten Wasser- und Membrananteilen als Cytoplasma diskutiert - und Cluster 4 mit ausgeprägten Lipidbanden bei 1301, 1445, 1745  $\text{cm}^{-1}$  als lipidreiches Organell wie LD.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der mittels *Clustering* Algorithmen klassifizierten Zellorganellen.** Cluster 1 als Zellkern, Cluster 2 als Mitochondrien, Cluster 3 als Zytoplasma und Cluster 4 als Lipidorganellen wie Lipid Droplets.

### 3.2.1 Nukleinsäuren

Nukleinsäure ist Bestandteil von DNA und RNA. Nukleinsäure-spezifische Raman Peaks liegen typischerweise im niedrigen Wellenzahlbereich (Benevides, Overman und Thomas Jr, 2005). Beide Zelltypen zeigen keine signifikanten

Unterschiede in DNA-spezifischen Banden. Diese würden eine Veränderung der zellulären Proliferation oder eines aktiveren Transkriptionsstatus andeuten können. Unterschiede wurden subtil in der Chromatinorganisation und RNA-Synthese festgestellt. Auch fanden wir, dass Cluster 1, mutmaßlich der Zellkern, in GSCs höhere Nukleinsäure-Signale aufwies, wohingegen in differenzierten Zellen dieses Nukleinsäureanteile vermehrt in Cluster 3, also dem Cytoplasma, detektiert wurden – ein möglicher Hinweis auf verstärkte RNA-Synthese bei Differenzierung. Dies könnte so interpretiert werden, dass GSCs mehr ribosomale RNA für anstehende Differenzierung bereitstellen könnten, während DGC vermehrt mRNA für differenzierungsspezifische Proteine exprimieren.

### 3.2.2 Proteine

Phenylalanin ist eine aromatische Aminosäure in Proteinen und findet sich bei  $1001\text{-}1005\text{ cm}^{-1}$  (Hernández *u. a.*, 2013). Dieser Peak dient oft als Gesamtproteinmarker. DGCs zeigen diesen Peak besonders ausgeprägt, was auf einen höheren Proteingehalt hindeuten könnte.

Das Amid-I-Band bei  $1650\text{-}1665\text{ cm}^{-1}$  wird durch C=O-Streckschwingungen im Peptidrückgrat verursacht, so u.a. durch  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturen auf  $1655\text{ cm}^{-1}$ . DGCs weisen ein erhöhtes Signal auf, dies deutet auf eine veränderte Proteinsekundärstruktur hin. Das Amid-III-Band bei  $1230\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  ist bedingt durch N-H / C-N Schwingungen und ebenfalls in DGCs verstärkt. Weitere proteinbezogene Banden sind z.B.  $1550\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$  (Amid II oder Tryptophan-Schwingungen) und  $1600\text{ cm}^{-1}$  (vibrierende aromatische Seitenketten wie Tyrosin/Phenylalanin) und deuten auf strukturelle Unterschiede für eine mögliche Unterscheidung der Phänotypen hin (Barkur *u. a.*, 2015).

Insgesamt zeigen DGC im Vergleich zu GSC tendenziell intensivere Proteinpeaks. Diese Ergebnisse korrelieren mit der aktuellen Studienlage, hierbei fanden sich stärkere Raman-Signale für Phenylalanin ( $1003\text{ cm}^{-1}$ ) und Amid I ( $1665\text{-}1673\text{ cm}^{-1}$ ) in differenzierten Zellen, während GSC in diesen Bereichen schwächere Intensitäten aufwiesen (Barkur *u. a.*, 2015). Dies konnte beispielsweise als vermehrte Expressierung strukturgebender Proteine wie Glial-

Fibrilläres Saures Protein (GFAP) und Enzymaktivität diskutiert werden (van Bodegraven *u. a.*, 2019). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass DGC metabolisch stark in Proteinproduktion und -umsatz involviert sind, während GSCs ein anderes Biomolekül-Profil zugunsten von Lipiden aufweisen.

### 3.2.3 Lipide

Lipid-induzierte Raman-Peaks treten vor allem in zwei Bereichen auf: In dem in der Arbeit vorgestellten Fingerabdruck-Bereich unter  $1800\text{ cm}^{-1}$  und im C-H-Streckbereich um  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ . Entsprechender C-H-Streckbereich korrelierte in den vorliegenden Messungen mit dem vorgestellten Fingerabdruckbereich. Im Fingerabdruckbereich sind  $1300\text{ cm}^{-1}$  und  $1440\text{ cm}^{-1}$  wichtige Marker.  $1300\text{ cm}^{-1}$  resultiert aus  $\text{CH}_2$ -Verformungen (Twist/Wag) in Fettsäuren und z.T. C-N-Schwingungen aus Membran-Phospholipiden mit dem  $\text{CH}_2$ -Biege-Modus in aliphatischen Ketten wie von Fettsäuren in Triglyceriden oder Membranlipiden. Außerdem zeigte  $1745\text{ cm}^{-1}$  als Resultat von C=O Streckschwingungen von Ester-Bindungen ein eindeutiges Lipidsignal und kann mit gespeicherten Neutralfetten korreliert werden, z.B. Triglyzeride oder Cholesterinester. GSCs zeigten intensivere Banden bei  $1440\text{ cm}^{-1}$  und  $1655\text{ cm}^{-1}$ , dies repräsentiert cis-C=C-Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren. Das Verhältnis von  $1440\text{ cm}^{-1}$  zu  $1655\text{ cm}^{-1}$  kann als Maß für den Grad ungesättigter Fettsäuren herangezogen werden, denn ein erhöhtes Verhältnis deutet auf vermehrte Doppelbindungen hin. Tatsächlich haben GSCs einen etwa 3,3 % erhöhten Anteil ungesättigter Lipide. Dies deckt sich mit den aktuellen Beobachtungen und zeigt eine erhöhte lipogene Dichte dieser Fettsäuren in LDs bei GSC. GSCs zeigen tatsächlich eine Umprogrammierung im Lipidmetabolismus mit erhöhter Membranfluidität und veränderter Signaltransduktion. Lipid-Peaks in dieser Technologie liefern damit nicht nur diagnostische Marker, sondern auch Hinweise auf tumorbiologische Prozesse wie de-novo Lipogenese. Diese Unterschiede könnten zukünftig genutzt werden, um lipidbasierte Ansätze zu etablieren. Eine Aufrechterhaltung des Ungesättigungsgrades kann somit die Zellen überlebensfähig halten. Es wurde bereits in weiteren Studien bestätigt, dass gezielte Therapien das Überleben von GSCs reduzieren (Guidoni *u. a.*, 2014; Kenig *u. a.*, 2015; Li *u. a.*, 2017;

Abramczyk und Imiela, 2018; Kumar *u. a.*, 2020; Grande *u. a.*, 2022; O'Neill *u. a.*, 2022).

### 3.2.4 Mitochondrien

Auffällige Banden bei 747, 112, 1312 und 1584  $\text{cm}^{-1}$  lassen sich Cytochrom C zuordnen. Dies ist ein Häm-Protein der mitochondrialen Atmungskette. Die markanten Signale resultieren besonders aus Ring-Deformation und C=C im Porphyrin. Peaks um 1127  $\text{cm}^{-1}$  und 1583  $\text{cm}^{-1}$  können als NAD(P)H-Signale den Redox-Zustand der Zelle widerspiegeln. Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass DGCs vermehrt auf eine Warburg-Metabolik mit aerober Glykolyse setzen und GSCs auf oxidative Phosphorylierung. GSCs produzieren weniger Laktat, halten höhere ATP-Level aufrecht und haben somit eine effizientere mitochondriale Energiegewinnung (Vlashi *u. a.*, 2011). Zudem weisen GSC höhere mitochondriale Reservekapazitäten auf. Die tendenziell intensiveren mitochondrialen Cytochrom-Peaks in GSCs könnten dies bestätigen. So erzielten wir auch in den Mitochondrien eine hohe Klassifikationsgenauigkeit (KITAGAWA *u. a.*, 1975; Shelnutt *u. a.*, 1981; Hu *u. a.*, 1993; Berezhna, Wohlrab und Champion, 2003; Li *u. a.*, 2017; Spehalski *u. a.*, 2019).

Die vorliegende Arbeit zeigt damit Unterschiede in der metabolischen Adaptivität von GSCs. Das alleinige *Targeting* der Glykolyse, das in vielen Therapieansätzen genutzt wurde, könnte GSCs verschonen. Die hier etablierte Technologie könnte helfen, metabolisch unterschiedliche Zellareale wie GSC-Nester anhand hoher Lipid- und Cytochrom-Peaks zu erkennen und Therapieentscheidungen zu optimieren.

## 3.3 Maschinelles Lernen und Klassifikationsmerkmale

Darüber hinaus wurden verschiedene Algorithmen für die automatisierte Klassifikation evaluiert und hinsichtlich Parameter und Hyperparameter trainiert. Die vorgestellten Algorithmen zeigen unterschiedliche Komplexität. Verwendet wurden hierbei *Naive Bayes*, *Logistische Regression*, *k-Nearest-Neighbors*, *Tree*

*Classifier, Random Forest, Ada Boost, Gradient Boosting, Stochastic Gradient Descent, Support Vector Machine* und NN. Durch das *Clustering* mittels k-means ließen sich Messungen der beiden Subpopulationen einzelnen Zellkompartimenten zuordnen. Über LDA und *Feature-Importances* konnten einige Peaks wie 1001, 1304, 1435, 1650 und 1745  $\text{cm}^{-1}$  als besonders relevant zur Diskriminierung von GSCs und DGCs herausgearbeitet werden. Durch Reduktion der Messung auf diese Peaks kann die Messgeschwindigkeit maßgeblich reduziert werden. Diese Peak-fokussierten Messprotokolle können im klinischen Alltag zukünftig in der repetitiven Anwendung wertvolle Zeit sparen und die Methodik klinisch leicht anwendbar machen. Biologisch entsprechen die beschriebenen Hauptunterschiede den beschriebenen Lipidkonzentrationen und Proteinstrukturen.

### 3.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Erstmals wurde demonstriert, dass die konfokale Raman-Spektroskopie kombiniert mit maschinellem Lernen in der Lage ist, GSCs und DGCs zu unterscheiden. Die vorliegende Technologie ermöglicht durch Reduktion des spektral ausgewerteten Bereiches präklinisch Messungen im Millisekunden- und Nanometerbereich an lebenden Zellen. Besonders hervorzuheben ist der lineare Stochastic-Gradient-Descend-Klassifikator auf Basis eines Multilayer-Perceptron-NN, das in LD sehr gute Ergebnisse lieferte. Dass ein solcher komplexer Algorithmus die besten Klassifikationen erzielt, deutet auf die Komplexität der zugrunde liegenden Daten und die Vielzahl tumoraler Störfaktoren hin, die eine robuste Analyse mit basalen Algorithmen herausfordernd gestalten.

Ein wesentlicher Vorteil der konfokalen Raman-Spektroskopie besteht in der nicht-invasiven, nicht-destruktiven und bearbeitungsfreien Erfassung detaillierter chemischer Profile auf kleinster zellulärer Ebene. Konventionelle Ansätze beruhen oft auf dem Nachweis von Zelloberflächenmarkern oder Transkriptionsfaktoren (z.B. CD133, Nestin) mittels Immunhistochemie oder Flow-Zytometrie, was zeitaufwändige Färbeprotokolle erfordert und durch

Antikörperspezifität limitiert ist. Da Präparationsschritte wie bei der histologischen Aufarbeitung entfallen, kann das Verfahren direkt am lebenden Material angewandt werden. Neben den morphologischen Kriterien herkömmlicher mikroskopischer Methoden liefert die vorgestellte Technologie eine hohe molekulare Spezifität (Krishna und Colak, 2023; Sigle *u. a.*, 2023).

Die histologische Aufarbeitung, die in der aktuellen WHO-Klassifikation berücksichtigt sind, werden durch einen erfahrenen Pathologen durchgeführt, der beispielsweise Zellmorphologie, Mitose-Aktivität, Nekrosen und Gefäßproliferationen erkennt. Aufgrund der zeitaufwändigen Präparation durch Fixierung, Schneiden, Färbung und dem spezialisierten Personal dauert ein intraoperativer Schnellschnitt mindestens 20 Minuten, ein endgültiger Befund oft mehrere Tage. Zudem ist die Beurteilung subjektiv und erfahrungsgebunden. Raman-Spektroskopie bietet einen kontrastierenden Ansatz, denn ohne den Aufbereitungsprozess und durch KI-Auswertung werden Ergebnisse schneller und objektiv erhoben. Proben bleiben aufgrund der geringen Probendestruktion durch die Raman-Spektroskopie für die histologische Zuführung weiterhin erhalten.

Im Kontrast zu Immunhistochemie und Genanalysen detektiert Raman-Spektroskopie das gesamte biochemische Profil und liefert gleichzeitig vielfältige Informationen, die sonst separate Tests erfordern. So können auch unbekannte Muster routinemäßig erkannt werden, da man nicht auf vorab definierte Marker beschränkt ist. So konnte eine Studie mittels Raman-Spektroskopie 19 neue Biomarker des Glioblastoms identifizieren, die zuvor nicht in der Literatur beschrieben wurden (Riva *u. a.*, 2021). Raman kann darüber hinaus via Proxy-Indikatoren durch Stoffwechselabberationen auf Mutationen zurückschließen.

Insbesondere beim GBM, welches sich durch eine intratumorale Heterogenität auszeichnet, zeigt sich der Nutzen einer konfokalen Auflösung. So können gezielt sehr kleine Areale auf aggressive Zellnischen hin untersucht werden, beispielsweise in perivaskulären Zonen, da dort häufig GSCs vorhanden sind. Die Kopplung an ML-Algorithmen ermöglicht hierbei eine schnelle und objektive Auswertung großer Datenmengen. Es ließe sich prüfen, ob sich das

biochemische Profil des GBM unter laufender Therapie adaptiert, wie es sich verändert und ob Immunzellantworten wirksam sind. Es geht damit auf die größten Hürden der aktuellen genannten Therapieentwicklungen ein (Eisenbarth und Wang, 2023).

Aufgrund der vorgestellten Vorteile wird Raman-Spektroskopie mit maschinellem Lernen zunehmend als diagnostisches Werkzeug in der Medizin genutzt und hat sich als Spitzentechnologie gegen andere iterative Diagnostiken positioniert (Hanna *u. a.*, 2022; S. Zhang *u. a.*, 2023). Intraoperativ könnte Raman-Spektroskopie beispielsweise mit faseroptischen Sonden zur Echtzeit-Charakterisierung von Gewebe eingesetzt werden oder *Bedside* schnelle Diagnostik ermöglichen (Cordero *u. a.*, 2018). Handgehaltene Raman-Geräte zeigen bei der Bestimmung von Tumorrändern bereits verbesserte Sensitivität und Spezifität für die Identifikation verbleibender GBM-Zellen. Zudem verdichtet sich die Evidenz, dass diese Technik ebenfalls dem aktuellen Goldstandard der 5-ALA Färbung überlegen ist. Im Vergleich mit der etablierten 5-ALA Fluoreszenzmarkierung zeigt es eine Sensitivität von 69 % gegenüber 46 %. Beide Methoden lassen sich allerdings synergistisch kombinieren und erreichen so eine 10 % erhöhte Präzision (Herta *u. a.*, 2022).

Aktuelle Studien mittels Raman-Spektroskopie in der Neurochirurgie können Gliomgewebe von normalem Gehirngewebe mit einer Genauigkeit von ca. 96 % Sensitivität und 99 % Spezifität unter optimalen Bedingungen und mit ca. 82 % Genauigkeit bei unfixierten Biopsien unterscheiden, dies entspricht gängigen klinischen Tests (Livermore *u. a.*, 2020; L. Zhang *u. a.*, 2023). Es können bereits nur drei GBM Zellen auf einem Volumen von 0.01 mm<sup>2</sup> erkannt werden (Zhu *u. a.*, 2024). Mit der Technologie kann Gliomgewebe bereits Subtypen und Tumorgrad zugeordnet werden, z.B. gelingt eine Unterscheidung des IDH-Mutationsstatus mit 91 % Sensitivität und 95 % Spezifität (Livermore *u. a.*, 2019). Aufgrund der *in vivo* Nutzbarkeit im Vergleich zu den etablierten aufwendigen Methoden deuten diese Ergebnisse auf die zukünftige *in vivo* Diagnostik mittels dieser Technologie hin. Große klinische Validierungen unter standardisierten Bedingungen in der klinischen Praxis stehen allerdings noch aus.

### 3.5 Herausforderungen in der klinischen Routine

Trotz des vielversprechenden Potentials existieren jedoch weiterhin bedeutsame Hürden für eine breite klinische Anwendung. Insbesondere die Standardisierung und Validierung von Messungen und ML-Modellen ist essenziell, um verlässliche generalisierbare Resultate zu erzielen. Diese ist aktuell noch nicht einheitlich. Im Rahmen von Projekten wie z.B. Raman4Clinics werden jedoch zunehmend Vergleichsstudien durchgeführt, um Referenzdatensätze und standardisierte Messprotokolle zu etablieren. Anschließend wäre die Validierung an größeren Patientenkollektiven notwendig, da kleine Stichprobenumfänge das Risiko des *Overfittings* inkludieren und Leistungsfähigkeit von ML-Modellen so überschätzt wird (Varghese, 2020; Blake *u. a.*, 2022; Cameron *u. a.*, 2022).

Für eine künftige in-vivo Anwendung der Technologie muss berücksichtigt werden, dass Signale wie Fibrosen oder Blut das Ursprungssignal überlagern könnten. Dies erfordert wiederum zusätzliche Schritte der Datenaufbereitung und -analyse (Kouri *u. a.*, 2022). Auch die Rechenleistung für vorgestellte Algorithmen könnte Kliniken an technische und finanzielle Grenzen bringen.

Weitere Hürden der konfokalen Raman-Spektroskopie sind die lange Beleuchtungszeit bei vielen Messpunkten wie Hyperspektren. Daher konzentrierte sich die vorliegende Arbeit neben der Nutzung solcher Referenzen auf Einzelpunktmessungen. Diese könnten im klinischen Alltag die Anwendungszeit reduzieren. Auch die beschriebene Reduktion des spektralen Bereiches auf wenige relevante Peaks kann die Anwendungszeit deutlich reduzieren. Andere Strategien wären z.B. parallele Detektionen und stimulierte Ramanspektroskopie (SRS) (Schie, Stiebing und Popp, 2021).

Damit ML-Modelle im klinischen Alltag akzeptiert werden, müssen neben einer hohen Klassifikationsergebnissen die Daten auch transparent und interpretierbar sein. Idealerweise zeigen Algorithmen, welche spektralen Merkmale ihre Entscheidung beeinflusst haben, wie z.B. Peaks die auf Stammzeleigenschaften hindeuten. Daraus resultierende Erkenntnisse wie veränderter Lipidstoffwechsel

in GSCs fördert zudem das biologische Verständnis und können wiederum zu neuen Ansätzen für Diagnostik und Therapie führen. Limitiert werden Kliniken dabei aktuell durch das noch kostspielige und sperrige Equipment. Zukünftige Entwicklungen zielen daher auf eine Miniaturisierung und Robustheit der Systeme ab, beispielsweise durch handliche Sonden. Daneben erfordert die Anwendung einer solchen komplexen Technologie bisher einen Experten. Da wenig Kliniker diese Bedingung erfüllen, ist der Einsatz bisher limitiert. Hier kann wiederum die Integration von KI durch interpretierbare Entscheidungshilfen und entsprechender Schulungsbedarf Abhilfe schaffen.

Perspektivisch eröffnet diese Technologie neue Wege für personalisierte Therapieansätze wie GBM Agile (Alexander *u. a.*, 2018), das mithilfe bayesianischer adaptiver Studienarme Therapien fortlaufend in die klinische Diagnostik integriert. *Liquid Biopsies* sowie NGS-Paneluntersuchungen könnten dieses Standardrepertoire der Diagnostik ergänzen. Die konfokale Raman-Spektroskopie fügt sich somit in ein immer umfassenderes Bild der maßgeschneiderten Glioblastom-Behandlung ein, indem es dazu beitragen kann, das Therapieergebnis GSCs-fokussiert zu verbessern.

### 3.6 Perspektivische Anwendung in der personalisierten Medizin

Im Sinne der personalisierten Medizin bietet die vorliegende Methode die Möglichkeit, im Rahmen einer Neudiagnose zu erkennen, ob und in welchem Umfang GSCs vorhanden sind. Darauf aufbauend könnten gezielte oder aggressivere Therapieschemata initiiert werden, es können ggf. sogar bereits neue Therapieansätze genutzt werden. Langfristig könnten anhand des spektroskopischen Fingerprints personalisierte Therapien korreliert und angewendet werden, sowie laufend an die adaptiven Veränderungen des GBM angepasst werden (Hollon *u. a.*, 2023).

Auch zielt aktuelle Forschung darauf ab, GSCs Vorläufer vor Entstehung eines GBM in der SVZ zu identifizieren und so prä-maligne Läsionen in

Stammzellreservoirs frühzeitig zu entdecken und zu eliminieren (Matarredona und Pastor, 2019).

In der Biopsiegewinnung, die beim GBM stereotaktisch erfolgt, könnte eine Echtzeit-Analyse mittels der vorgestellten Technologie die Nadelplatzierung präzisieren und Sampling-Fehler bedingt durch die Tumorheterogenität reduzieren. Da in der MRT viele Entitäten wie Narbengewebe oder Ödeme ähnliche Morphologien zeigen, steigert Raman-gestützte Diagnostik bereits aktuell die Spezifität auf über 90 % (Rončević *u. a.*, 2023b).

Intraoperativ kann das Verfahren durch Profiling des Resektionsrandes bessere Gewebegrenzen ermöglichen, besonders in makroskopisch scheinbar gesunden Bereichen. Flüssigbiopsien wie Serum oder Exosome könnten mit dieser Technologie nach Biomarkern untersucht werden, um Anzeichen einer minimalen residualen Erkrankung nach der Operation frühzeitig zu erkennen (Del Bene *u. a.*, 2022; Vrazhnov *u. a.*, 2023). Langfristig könnte das GBM so im Rahmen einer personalisierten Medizin eher als chronische Erkrankung anstatt als hochaggressiver Tumor mit infauster Prognose betrachtet werden.

### 3.7 Lipidmetabolismus als Zielstruktur

Wie bereits beschrieben durchlebt das GBM Phasen wechselnder Verfügbarkeit von Nährstoffen. Die pathogenen Mechanismen des GBM konvergieren auf eine Akkumulation von LD in GSCs, die dadurch Wachstumsvorteile in den hypoxischen Tumorregionen gewinnen. So fördert dies die Mikroumgebung mit LD beladenen perinekrotischen Zellen, in denen Stresssignale wie HIF-1a aktiv sind, während randständige Zellen aktiv proliferieren und Nährstoffe verbrauchen (Talbot *u. a.*, 2024b). Durch diese Stoffwechselheterogenität entsteht eine komplementäre, bidirektionale Zellpopulation, in der LD-reiche GSCs Hypoxie überleben und durch Angiogenese die Nährstoffversorgung wiederherstellen. Mit Tumor-assoziierten Mikroglia (TAM), speziell den lipid-geladenen Makrophagen bzw. tumor-assoziierten *foam cells* (TAFs) findet ebenfalls ein Lipidaustausch statt. TAF fungieren hierbei als hoch-protumerale Immunzellen, die Myelin-Lipide

recyclen und an die Tumorzellen über z.B. LXR/ABCA1-Wege transferieren. TAF entstehen dabei aus den GSCs stammenden LD-Lipiden. Zusätzlich fördern LDs die Synthese von Signalmolekülen wie Eicosanoiden, wobei LDs auch als Speicher der Arachidonsäure dienen können.

LDs werden als therapeutische Achillesferse diskutiert, da sie LDs als metabolische Flucht für die Lipidperoxidation nutzen (Taib *u. a.*, 2019). Somit könnten die in dieser Arbeit erarbeiteten Biomarker für das Monitoring zukünftiger lipidadaptierter Therapien genutzt werden.

Wie in Tabelle 1 beschrieben, existieren aktuell zahlreiche präklinische Phase 1 Studien, die bereits erfolgreiche Ergebnisse zeigen. DGAT1-Inhibition zeigt einen disruptierten Lipidhaushalt mit konsekutiver ROS-Überproduktion und mitochondrialen Schäden, welche in Apoptose und Wachstumshemmung münden. Ferroptose wird durch Lipidperoxidation an ungesättigten Fettsäuren ausgelöst, GSCs können diese in LDs speichern und der Ferroptose entgehen. ACSL4 begünstigt den PUFA-Einbau in Phospholipide als pro-Ferroptose, ACSL3/SCD1 begünstigen MUFA-Synthese und TAG-Speicherung als anti-Ferroptose. Somit zeigt auch eine zielgerichtete ACSL Inhibition erste Erfolge. Auch die Mikroumgebung des GBM kann so adressiert werden, durch Inhibition von DGAT1 und ACSL konnten die TAF signifikant beeinträchtigt werden. LDs scheinen somit für zukünftige Therapien eine Schlüsselrolle zu spielen. Die hier vorgestellte Technologie kann sich als präklinisches Instrument für deren Diagnostik etablieren (Kou, Geng und Guo, 2022).

**Tabelle 1: Lipid Droplet (LD) anvisierende präklinische Studien mit Potential für die klinische Anwendung.** Es existieren zahlreiche Angriffspunkte mit präklinischer Evidenz für die zukünftige Adressierung des Lipidmetabolismus des Glioblastoms.

<b>Angriffspunkt</b>	<b>Präklinische Evidenz</b>
DGAT1 (TAG-Synthese)	ROS-Anstieg, GBM-Tumorwachstum in Mausmodellen gehemmt (Darwish <i>u. a.</i> , 2024b)
SOAT1 / ACAT1 (Cholesterinveresterung)	Reduzierte Speicherung von Cholesterinestern in LDs, steigende Lipidtoxizität und Proliferationshemmung in GBM Zellen (Darwish <i>u. a.</i> , 2024c)
SREBP1, FASN (Lipidneubildung)	Verringerter Nachschub von Fettsäuren, synergistischer Effekt um für konventionelle Therapien zu sensibilisieren (Darwish <i>u. a.</i> , 2024c)
Fettsäureoxidation	Reduzierte Viabilität in GBM-Modellen (Darwish <i>u. a.</i> , 2024c)
FADS1/2 (Desaturasen in GSCs)	Unterbindet PUFA-Synthese in GSCs, gezielte Stammzellreduktion (Shakya <i>u. a.</i> , 2021)
TAM-Schaumzellen	Reduzierte LD-Formation in TAMs, reduziert konsekutiv die Tumorprogression (Governata <i>u. a.</i> , 2024)

### 3.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Trotz überzeugender Ergebnisse weist die vorliegende Arbeit einige Limitationen auf. Erstens basieren die durchgeführten Analysen auf einer nur begrenzten Anzahl patientenabgeleiteter Zelllinien. Obwohl fünf Zelllinien verwendet wurden, ist eine Generalisierbarkeit aufgrund der Tumorheterogenität eingeschränkt. Zudem wurden ausschließlich präklinische *in-vitro* Messungen durchgeführt, sodass eine Validierung an Gewebeproben sowie *in-vivo* noch ausstehend ist. Zuletzt könnte durch das begrenzte Datenset und die genannten Limitierungen das ML-Modell *Overfitting* unterliegen, d.h. es kann eine Überanpassung an die Trainingsbedingungen vorliegen. Eine erweiterte Kreuzvalidierung mit externen Testkohorten oder die genannte *in-vivo* Anwendung könnte diese Limitierung in zukünftigen Arbeiten adressieren. Da auch keine klinischen Outcome-Daten korreliert wurden, bleibt der prognostische Wert der identifizierten Daten bisher noch hypothesenbildend. Er bietet allerdings eine Grundlage für die weitere translationale Anwendung.

### 3.9 Perspektiven und zukünftige Anwendungen

Aufbauend auf den hier gewonnenen Erkenntnissen eröffnet sich Potential für zukünftige Anwendungen und Forschung: Die konfokale Raman-Spektroskopie sollte *in-vivo* mittels faseroptischer Sonden oder eingebettet in Mikroskopsysteme intraoperativ oder *bed-side* evaluiert werden und die ML-gestützten Modelle durch NN mit größeren Datensätzen sukzessive verbessert werden. Zudem können durch die Kombination der spektroskopischen Messungen mit molekularpathologischen Profilen wie dem IDH- und MGMT-Status vielversprechende multimodale Diagnostiksysteme entwickelt werden. Langfristig könnte diese Technologie so in personalisierte Therapieentscheidungen integriert werden. GBM-Patienten profitieren so von einer schnelleren und personalisierten Diagnostik und ggf. einer individuellen gezielteren Behandlung.

## 4. Schlussfolgerungen

Aktuell sind wir von dem Ziel der erfolgreichen Heilung des GBM noch weit entfernt. Personalisierte Diagnostik und Therapien mit translationalem Potential sind noch in den Anfängen. Zwar werden mittlerweile routinemäßig molekulare Profile des GBM bestimmt, doch therapeutisch konnte keine der über hundert personalisierten therapeutischen Ansätze einen signifikanten Überlebensvorteil feststellen. Dabei stützt sich personalisierte Medizin nicht nur auf den genetischen und molekularen Tumoreigenschaften, die bei einer heterogenen Entität wie dem GBM notwendig scheinen, sondern aufgrund der Adaptivität des GBM auch auf die Optimierung von Dosis und Zeitpunkt für den einzelnen Patienten. Die vorgestellte Technologie bietet das Potential durch hohe Messgeschwindigkeit, niedrige Invasivität und konfokale biochemische Genauigkeit die translationale Diagnostik und entsprechende Therapien zu beschleunigen und anwendbar zu machen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Kombination von konfokaler Raman-Spektroskopie und ML eine präzise, markierungsfreie Identifizierung von GSCs in vitro präklinisch auf intrazellulärer Ebene möglich ist. Es wurde gezeigt, dass GSC und DGC sich v.a. durch veränderte Proteinstrukturen und Lipidmetabolismus auszeichnen, wobei der Lipidmetabolismus zukünftig genutzt werden könnte, um GSC schnell zu identifizieren. Die hohe Klassifikations-Genauigkeit von 91,7 % zeigt die Bedeutung der als Lipid Droplets diskutierten Zellorganellen für die Pathogenese der Stammzellen, diese sollten in zukünftigen therapeutischen Ansätzen berücksichtigt werden.

Die konfokale Raman-Spektroskopie bietet als zellschonende und räumlich hochauflösende Methode einen klaren Vorteil gegenüber herkömmlichen diagnostischen Verfahren. Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die intrazelluläre Heterogenität des GBM bis auf subzelluläre Strukturen erfasst werden kann. Die zusätzliche Einbindung von ML beschleunigt die Auswertung, Robustheit und Automatisierung selbst komplexer Spektraldaten.

Durch Reduktion der Spektren auf einige ausgewählte Peaks, die ebenfalls primär veränderten Protein- und Lipidmetabolismus zuzuordnen sind, kann die Messzeit im zukünftigen klinischen Setting signifikant beschleunigt werden.

Für den klinischen Alltag zeigt diese Technologie ein signifikantes Potential, wie etwa im Rahmen intraoperativer Anwendung oder integriert in personalisierte Therapieansätze. Durch schnelle und präzise Identifizierung resistenter Tumorstammzellen können chirurgische Resektionen gezielter durchgeführt und onkologische Behandlungen mit neuen Therapieansätzen spezifischer ausgerichtet werden. Somit könnte diese Technologie maßgeblich zur Prognoseverbesserung und Lebensqualität der GBM-Patienten beitragen. Trotz all dieser Vorteile sind für eine klinische Etablierung größere Patientenkollektive, sowie Standardisierung, Miniaturisierung der Messgeräte und Integration in bestehende klinische Abläufe notwendig.

Angesichts der schnellen Weiterentwicklung und Resultate dieser Technologie ist davon auszugehen, dass sie eine entscheidende Rolle in Richtung einer translationalen, multimodalen und vor allem personalisierten Therapie spielen wird.

## 5. Literaturverzeichnis

Abramczyk, H. und Imiela, A. (2018) „The biochemical, nanomechanical and chemometric signatures of brain cancer“, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, S. 8–19. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.037>.

Agosti, E. u. a. (2024a) „Role of glioma stem cells in promoting tumor chemo- and radioresistance: A systematic review of potential targeted treatments“, *World Journal of Stem Cells*, 16(5), S. 604–614. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v16.i5.604>.

Agosti, E. u. a. (2024b) „Role of glioma stem cells in promoting tumor chemo- and radioresistance: A systematic review of potential targeted treatments“, *World Journal of Stem Cells*, 16(5), S. 604–614. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v16.i5.604>.

Ahmed, A.U., Auffinger, B. und Lesniak, M.S. (2013) „Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies“, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 13(5), S. 545–555. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1586/ern.13.42>.

Ahmed, S.F. u. a. (2023) „Deep learning modelling techniques: current progress, applications, advantages, and challenges“, *Artificial Intelligence Review*, 56(11), S. 13521–13617. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s10462-023-10466-8>.

Ah-Pine, F. u. a. (2023) „On the origin and development of glioblastoma: multifaceted role of perivascular mesenchymal stromal cells“, *Acta Neuropathologica Communications*, 11, S. 104. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01605-x>.

Aldaz, P. und Arozarena, I. (2021) „Tyrosine Kinase Inhibitors in Adult Glioblastoma: An (Un)Closed Chapter?“, *Cancers*, 13(22), S. 5799. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers13225799>.

Alexander, B.M. u. a. (2018) „Adaptive Global Innovative Learning Environment for Glioblastoma: GBM AGILE“, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(4), S. 737–743. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0764>.

Baker, M.J. u. a. (2018) „Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: state of play and future challenges“, *Analyst*, 143(8), S. 1735–1757. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1039/C7AN01871A>.

Ballo, M. u. a. (2023) „TUMOUR TREATING FIELDS (TTFIELDS) THERAPY IN NEWLY DIAGNOSED GLIOBLASTOMA: A META-ANALYSIS AND SYSTEMATIC REVIEW OF REAL-WORLD SURVIVAL DATA“, *Neuro-Oncology*, 25(Supplement\_3), S. iii16. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad147.067>.

- Bansal, M., Goyal, A. und Choudhary, A. (2022) „A comparative analysis of K-Nearest Neighbor, Genetic, Support Vector Machine, Decision Tree, and Long Short Term Memory algorithms in machine learning“, *Decision Analytics Journal*, 3, S. 100071. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.dajour.2022.100071>.
- Barkur, S. u. a. (2015) „Probing differentiation in cancer cell lines by single-cell micro-Raman spectroscopy“, *Journal of Biomedical Optics*, 20(8), S. 085001. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.8.085001>.
- Bazzoni, R. und Bentivegna, A. (2019) „Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis“, *Cancers*, 11(3), S. 292. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers11030292>.
- Benevides, J.M., Overman, S.A. und Thomas Jr, G.J. (2005) „Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes“, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(4), S. 279–299. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/jrs.1324>.
- Berezhna, S., Wohlrab, H. und Champion, P.M. (2003) „Resonance Raman Investigations of Cytochrome c Conformational Change upon Interaction with the Membranes of Intact and Ca<sup>2+</sup>-Exposed Mitochondria“, *Biochemistry*, 42(20), S. 6149–6158. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1021/bi027387y>.
- Berger, T.R. u. a. (2022) „World Health Organization 2021 Classification of Central Nervous System Tumors and Implications for Therapy for Adult-Type Gliomas: A Review“, *JAMA Oncology*, 8(10), S. 1493–1501. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.2844>.
- Blake, N. u. a. (2022) „Machine Learning of Raman Spectroscopy Data for Classifying Cancers: A Review of the Recent Literature“, *Diagnostics*, 12(6), S. 1491. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061491>.
- van Bodegraven, E.J. u. a. (2019) „Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma“, *Glia*, 67(8), S. 1417–1433. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/glia.23594>.
- Bonosi, L. u. a. (2023) „Maximal Safe Resection in Glioblastoma Surgery: A Systematic Review of Advanced Intraoperative Image-Guided Techniques“, *Brain Sciences*, 13(2), S. 216. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/brainsci13020216>.
- Brandner, S. (2021) „Molecular Diagnostics of Adult Gliomas in Neuropathological Practice“, *Acta Medica Academica*, 50(1), S. 29–46. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.324>.
- Brozek-Pluska, B. u. a. (2019) „Label-free diagnostics and cancer surgery Raman spectra guidance for the human colon at different excitation wavelengths“, *RSC Advances*, 9(69), S. 40445–40454. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1039/C9RA06831G>.
- Buxmann, P. und Schmidt, H. (2019) „Grundlagen der Künstlichen Intelligenz und des Maschinellen Lernens“, in P. Buxmann und H. Schmidt (Hrsg.)

*Künstliche Intelligenz: Mit Algorithmen zum wirtschaftlichen Erfolg*. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 3–19. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-57568-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-57568-0_1).

Cameron, J.M. *u. a.* (2022) „Clinical Spectroscopy: Lost in Translation?“, *Applied Spectroscopy*, 76(4), S. 393–415. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1177/00037028211021846>.

Chen, J. *u. a.* (2012) „A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy“, *Nature*, 488(7412), S. 522–526. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nature11287>.

Cheng, L. *u. a.* (2013) „Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth“, *Cell*, 153(1), S. 139–152. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.021>.

Chou, F.-J. *u. a.* (2021) „D-2-Hydroxyglutarate in Glioma Biology“, *Cells*, 10(9), S. 2345. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cells10092345>.

Ciechomska, I.A. *u. a.* (2023) „Exploring Novel Therapeutic Opportunities for Glioblastoma Using Patient-Derived Cell Cultures“, *Cancers*, 15(5), S. 1562. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers15051562>.

Cordero, E. *u. a.* (2018) „[i]n-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications“, *Journal of Biomedical Optics*, 23(7), S. 071210. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.071210>.

Darwish, A. *u. a.* (2024a) „Emerging Lipid Targets in Glioblastoma“, *Cancers*, 16(2), S. 397. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers16020397>.

Darwish, A. *u. a.* (2024b) „Emerging Lipid Targets in Glioblastoma“, *Cancers*, 16(2), S. 397. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers16020397>.

Darwish, A. *u. a.* (2024c) „Emerging Lipid Targets in Glioblastoma“, *Cancers*, 16(2), S. 397. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers16020397>.

Del Bene, M. *u. a.* (2022) „Extracellular vesicles: The key for precision medicine in glioblastoma“, *Neuro-Oncology*, 24(2), S. 184–196. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab229>.

Della Monica, R. *u. a.* (2022) „MGMT and Whole-Genome DNA Methylation Impacts on Diagnosis, Prognosis and Therapy of Glioblastoma Multiforme“, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), S. 7148. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms23137148>.

Deng, B. *u. a.* (2024) „The role of DGAT1 and DGAT2 in regulating tumor cell growth and their potential clinical implications“, *Journal of Translational Medicine*, 22(1), S. 290. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05084-z>.

Deng, M.Y., Debus, J. und König, L. (2023) „Verlängerung des Gesamtüberlebens durch die Impfung von autologen tumorlysatbeladenen

dendritischen Zellen (DCVax-L) bei Patienten mit neu diagnostiziertem und rezidivierendem Glioblastom“, *Strahlentherapie und Onkologie*, 199(3), S. 327–329. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00066-023-02049-x>.

DiDomenico, J. u. a. (2018) „The immune checkpoint protein PD-L1 induces and maintains regulatory T cells in glioblastoma“, *Onc Immunology*, 7(7), S. e1448329. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1448329>.

Eckerdt, F. und Plataniias, L.C. (2023) „Emerging Role of Glioma Stem Cells in Mechanisms of Therapy Resistance“, *Cancers*, 15(13), S. 3458. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers15133458>.

Ehrensberger, C. (2024) „Spektroskopie: Vom Spektrum zur Karte“, *Nachrichten aus der Chemie*, 72(7–8), S. 42–44. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/nadc.20244140288>.

Eisenbarth, D. und Wang, Y.A. (2023) „Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution“, *Oncogene*, 42(27), S. 2155–2165. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02738-y>.

Elumalai, S., Managó, S. und De Luca, A.C. (2020) „Raman Microscopy: Progress in Research on Cancer Cell Sensing“, *Sensors*, 20(19), S. 5525. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/s20195525>.

Eyme, K.M. u. a. (2023) „Targeting de novo lipid synthesis induces lipotoxicity and impairs DNA damage repair in glioblastoma mouse models“, *Science Translational Medicine*, 15(679), S. eabq6288. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq6288>.

Fabbro-Peray, P. u. a. (2019) „Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy–temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study“, *Journal of Neuro-Oncology*, 142(1), S. 91–101. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03065-z>.

Galbraith, K. und Snuderl, M. (2024) „Molecular Pathology of Gliomas“, *Clinics in Laboratory Medicine*, 44(2), S. 149–159. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2023.08.009>.

Gerritsen, J.K.W. u. a. (2022) „Safe surgery for glioblastoma: Recent advances and modern challenges“, *Neuro-Oncology Practice*, 9(5), S. 364–379. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/nop/npac019>.

Gousias, K., Theocharous, T. und Simon, M. (2022) „Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma“, *Biomedicines*, 10(3), S. 564. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030564>.

Governa, V. u. a. (2024) „Protumoral lipid droplet-loaded macrophages are enriched in human glioblastoma and can be therapeutically targeted“, *Science Translational Medicine*, 16(771), S. eadk1168. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adk1168>.

- Grande, S. u. a. (2022) „Glioblastoma Stem-Like Cells (GSCs) with Mesenchymal Signature: Lipid Profiles of Mobile Lipids Obtained with MRS before and after Radio/Chemical Treatments“, *Biomolecules*, 12(8), S. 1051. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biom12081051>.
- Grochans, S. u. a. (2022) „Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review“, *Cancers*, 14(10), S. 2412. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>.
- Guggenberger, K. und Urbach, H. (2018) „Bildgebung und Progressionsdiagnostik maligner Gliome“, *TumorDiagnostik & Therapie*, 39(10), S. 648–652. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/a-0589-1857>.
- Guidoni, L. u. a. (2014) „<sup>1</sup>H NMR detects different metabolic profiles in glioblastoma stem-like cells“, *NMR in Biomedicine*, 27(2), S. 129–145. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/nbm.3044>.
- Haas, J. (2022) „Reinforcement learning: A brief guide for philosophers of mind“, *Philosophy Compass*, 17(9), S. e12865. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/phc3.12865>.
- Haddad, A.F. u. a. (2021) „Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies“, *Neuro-Oncology Advances*, 3(1), S. vdab100. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab100>.
- Hahn, P. (2019) „Künstliche Intelligenz und Maschinelles Lernen“, *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plastische Chirurgie*, 51(01), S. 62–67. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/a-0826-4789>.
- Hanna, K. u. a. (2022) „Raman spectroscopy: current applications in breast cancer diagnosis, challenges and future prospects“, *British Journal of Cancer*, 126(8), S. 1125–1139. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01659-5>.
- Hejazi, D. u. a. (2020) „Development of use-specific high-performance cybernanomaterial optical detectors by effective choice of machine learning algorithms“, *Machine Learning: Science and Technology*, 1(2), S. 025007. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1088/2632-2153/ab8967>.
- Hernández, A. u. a. (2021) „Glioblastoma: Relationship between Metabolism and Immunosuppressive Microenvironment“, *Cells*, 10(12), S. 3529. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cells10123529>.
- Hernández, B. u. a. (2013) „Characteristic Raman lines of phenylalanine analyzed by a multiconformational approach“, *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(6), S. 827–833. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/jrs.4290>.
- Herta, J. u. a. (2022) „Optimizing maximum resection of glioblastoma: Raman spectroscopy versus 5-aminolevulinic acid“, *Journal of Neurosurgery*, 139(2), S. 334–343. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3171/2022.11.JNS22693>.

Hoelter, M. und Hattingen, E. (2019) „How I do it – MRT-Diagnostik Hirntumor“, *Radiologie up2date*, 19(03), S. 224–227. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/a-0866-4752>.

Hollon, T.C. u. a. (2023) „102 AI-Based Molecular Classification of Diffuse Gliomas using Rapid, Label-Free Optical Imaging“, *Neurosurgery*, 69(Supplement\_1), S. 22. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1227/neu.0000000000002375\\_102](https://doi.org/10.1227/neu.0000000000002375_102).

da Hora, C.C. u. a. (2019) „Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals“, *Cells*, 8(10), S. 1177. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cells8101177>.

Hu, S. u. a. (1993) „Complete assignment of cytochrome c resonance Raman spectra via enzymic reconstitution with isotopically labeled hemes“, *Journal of the American Chemical Society*, 115(26), S. 12446–12458. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>.

Ijzerman-Korevaar, M. u. a. (2018) „Prevalence of symptoms in glioma patients throughout the disease trajectory: a systematic review“, *Journal of Neuro-Oncology*, 140(3), S. 485–496. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03015-9>.

Jankowska, S. u. a. (2021) „Molecular classification of glioblastoma based on immunohistochemical expression of EGFR, PDGFRA, NF1, IDH1, p53 and PTEN proteins“, *Polish Journal of Pathology*, 72(1), S. 1–10. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5114/pjp.2021.106439>.

Jezierzański, M. u. a. (2024) „Temozolomide (TMZ) in the Treatment of Glioblastoma Multiforme—A Literature Review and Clinical Outcomes“, *Current Oncology*, 31(7), S. 3994–4002. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/curroncol31070296>.

Jin, Y. u. a. (2023) „Lipid droplets: a cellular organelle vital in cancer cells“, *Cell Death Discovery*, 9(1), S. 1–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01493-z>.

Kahlert, U.D. u. a. (2012) „Activation of canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling enhances *in vitro* motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition“, *Cancer Letters*, 325(1), S. 42–53. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.024>.

Kanderi, T., Munakomi, S. und Gupta, V. (2025) „Glioblastoma Multiforme“, in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558954/> (Zugegriffen: 25. Februar 2025).

Kenig, S. u. a. (2015) „Fourier transform infrared microspectroscopy reveals biochemical changes associated with glioma stem cell differentiation“, *Biophysical Chemistry*, 207, S. 90–96. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.09.005>.

- Khabibov, M. u. a. (2022) „Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review)“, *International Journal of Oncology*, 60(6), S. 1–18. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5359>.
- Kim, H.J., Park, J.W. und Lee, J.H. (2021) „Genetic Architectures and Cell-of-Origin in Glioblastoma“, *Frontiers in Oncology*, 10, S. 615400. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.615400>.
- KITAGAWA, T. u. a. (1975) „Resonance Raman Scattering from Hemoproteins: Effects of Ligands upon the Raman Spectra of Various C-type Cytochromes“, *The Journal of Biochemistry*, 78(4), S. 719–728. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130960>.
- Kögler, M. (2018) „Advanced Raman spectroscopy for bioprocess monitoring“. Verfügbar unter: <https://depositonce.tu-berlin.de/handle/11303/7461> (Zugegriffen: 26. Februar 2025).
- Kokar, M.M. und Reveliotis, S.A. (1993) „Reinforcement learning: Architectures and algorithms“, *International Journal of Intelligent Systems*, 8(8), S. 875–894. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/int.4550080805>.
- Koo, H. u. a. (2020) „Ethnic delineation of primary glioblastoma genome“, *Cancer Medicine*, 9(19), S. 7352–7359. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/cam4.3370>.
- Korinth, F. (2021) „Raman-Differenzspektroskopie mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen zur untergrundfreien und bildgebenden Untersuchung von biologischen Proben“. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.22032/dbt.49249>.
- Kou, Y., Geng, F. und Guo, D. (2022) „Lipid Metabolism in Glioblastoma: From De Novo Synthesis to Storage“, *Biomedicines*, 10(8), S. 1943. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081943>.
- Kouri, M.A. u. a. (2022) „Raman Spectroscopy: A Personalized Decision-Making Tool on Clinicians' Hands for In Situ Cancer Diagnosis and Surgery Guidance“, *Cancers*, 14(5), S. 1144. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers14051144>.
- Kretzschmar, D.A. (2018) „Glioblastome“, *Onkologische Welt*, 09(05), S. 232–232. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1677597>.
- Krishna, R. und Colak, I. (2023) „Advances in Biomedical Applications of Raman Microscopy and Data Processing: A Mini Review“, *Analytical Letters*, 56(4), S. 576–617. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/00032719.2022.2094391>.
- Kumar, S. u. a. (2020) „Prognosis, diagnosis and the influence of inhibitors: Raman spectroscopic study of radioresistant brain cancer stem-like cells“, in *Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging. Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging*, SPIE, S. 1135902. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1117/12.2555381>.

- Kwan, K. *u. a.* (2019) „Tracing the Origin of Glioblastoma: Subventricular Zone Neural Stem Cells“, *Neurosurgery*, 84(1), S. E15. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/neuros/nyy512>.
- Lee, J.H. und Lee, and J.H. (2018) „The origin-of-cell harboring cancer-driving mutations in human glioblastoma“, *BMB Reports*, 51(10), S. 481–483. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.10.233>.
- Lee-Chang, C. *u. a.* (2019) „Myeloid-Derived Suppressive Cells Promote B cell–Mediated Immunosuppression via Transfer of PD-L1 in Glioblastoma“, *Cancer Immunology Research*, 7(12), S. 1928–1943. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-19-0240>.
- Leske, H. *u. a.* (2023) „MGMT methylation pattern of long-term and short-term survivors of glioblastoma reveals CpGs of the enhancer region to be of high prognostic value“, *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), S. 139. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01622-w>.
- Leszczynska, K.B. *u. a.* (2021) „Emerging Advances in Combinatorial Treatments of Epigenetically Altered Pediatric High-Grade H3K27M Gliomas“, *Frontiers in Genetics*, 12. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.742561>.
- Li, J. *u. a.* (2017) „Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells“, *Cell Stem Cell*, 20(3), S. 303-314.e5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.004>.
- Li, W. *u. a.* (2018) „Discriminant Analysis-Based Dimension Reduction for Hyperspectral Image Classification: A Survey of the Most Recent Advances and an Experimental Comparison of Different Techniques“, *IEEE Geoscience and Remote Sensing Magazine*, 6(1), S. 15–34. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1109/MGRS.2018.2793873>.
- Livermore, L.J. *u. a.* (2019) „Rapid intraoperative molecular genetic classification of gliomas using Raman spectroscopy“, *Neuro-Oncology Advances*, 1(1), S. vdz008. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdz008>.
- Livermore, L.J. *u. a.* (2020) „Raman spectroscopy to differentiate between fresh tissue samples of glioma and normal brain: a comparison with 5-ALA–induced fluorescence-guided surgery“, *Journal of Neurosurgery*, 135(2), S. 469–479. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3171/2020.5.JNS20376>.
- Lopez, E. *u. a.* (2023) „The importance of choosing a proper validation strategy in predictive models. A tutorial with real examples“, *Analytica Chimica Acta*, 1275, S. 341532. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341532>.
- Loras, A. *u. a.* (2023) „Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin“, *Life*, 13(4), S. 905. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/life13040905>.

- Lyu, Y. u. a. (2023) „Prediction of patient choice tendency in medical decision-making based on machine learning algorithm“, *Frontiers in Public Health*, 11. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1087358>.
- Maggs, L. u. a. (2021) „CAR T Cell-Based Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma“, *Frontiers in Neuroscience*, 15. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.662064>.
- Matarredona, E.R. und Pastor, A.M. (2019) „Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as the Origin of Human Glioblastoma Stem Cells. Therapeutic Implications“, *Frontiers in Oncology*, 9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00779>.
- Mattei, V. u. a. (2021) „The Importance of Tumor Stem Cells in Glioblastoma Resistance to Therapy“, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), S. 3863. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms22083863>.
- McBain<sup>a</sup>, C. u. a. (2021) „Treatment options for progression or recurrence of glioblastoma: a network meta-analysis“, *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Preprint], (1). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013579.pub2>.
- McCornack, C. u. a. (2023) „The function of histone methylation and acetylation regulators in GBM pathophysiology“, *Frontiers in Oncology*, 13. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1144184>.
- McKinnon, C. u. a. (2021) „Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management“, *BMJ*, S. n1560. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/bmj.n1560>.
- Minami, J.K. u. a. (2023) „CDKN2A deletion remodels lipid metabolism to prime glioblastoma for ferroptosis“, *Cancer Cell*, 41(6), S. 1048-1060.e9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.05.001>.
- Miyazaki, T. u. a. (2020) „Therapeutic Strategies for Overcoming Immunotherapy Resistance Mediated by Immunosuppressive Factors of the Glioblastoma Microenvironment“, *Cancers*, 12(7), S. 1960. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers12071960>.
- Nakada, M. u. a. (2011) „Aberrant Signaling Pathways in Glioma“, *Cancers*, 3(3), S. 3242–3278. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers3033242>.
- Nguyen, H.-M. u. a. (2021) „Pathogenetic Features and Current Management of Glioblastoma“, *Cancers*, 13(4), S. 856. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers13040856>.
- Nicholson, J.G. und Fine, H.A. (2021) „Diffuse Glioma Heterogeneity and Its Therapeutic Implications“, *Cancer Discovery*, 11(3), S. 575–590. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1474>.

Obrador, E. u. a. (2024) „Glioblastoma Therapy: Past, Present and Future“, *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), S. 2529. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms25052529>.

Olivier, T. und Migliorini, D. (2023) „Autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in glioblastoma: What happened to the evidence?“, *Revue Neurologique*, 179(5), S. 502–505. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2023.03.014>.

O’Neill, K.C. u. a. (2022) „Mass spectrometry imaging discriminates glioblastoma tumor cell subpopulations and different microvascular formations based on their lipid profiles“, *Scientific Reports*, 12(1), S. 17069. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22093-4>.

Plaue, M. (2021) „Unüberwachtes maschinelles Lernen“, in M. Plaue (Hrsg.) *Data Science: Grundlagen, Statistik und maschinelles Lernen*. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 255–281. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-63489-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-63489-9_8).

Pombo Antunes, A.R. u. a. (2020) „Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies“, *eLife*, 9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.7554/elife.52176>.

Reddy, G.T. u. a. (2020) „Analysis of Dimensionality Reduction Techniques on Big Data“, *IEEE Access*, 8, S. 54776–54788. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.2980942>.

Renovanz, M. u. a. (2022) „Glioblastom“, *TumorDiagnostik & Therapie*, 43(04), S. 239–245. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/a-1727-3018>.

Reuss, David.E. (2023) „Updates on the WHO diagnosis of IDH-mutant glioma“, *Journal of Neuro-Oncology*, 162(3), S. 461–469. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11060-023-04250-5>.

Rieger, D. u. a. (2024a) „Glioblastom – aktuelle Therapiekonzepte“, *Die Onkologie*, 30(2), S. 145–156. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00761-024-01473-7>.

Rieger, D. u. a. (2024b) „Glioblastom – aktuelle Therapiekonzepte“, *Die Onkologie*, 30(2), S. 145–156. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00761-024-01473-7>.

Riva, M. u. a. (2021) „Glioma biopsies Classification Using Raman Spectroscopy and Machine Learning Models on Fresh Tissue Samples“, *Cancers*, 13(5), S. 1073. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers13051073>.

Rodriguez, S.M.B. u. a. (2022) „Glioblastoma Stem Cells—Useful Tools in the Battle against Cancer“, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), S. 4602. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms23094602>.

Rončević, A. u. a. (2023a) „Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective“, *Biomedicines*, 11(6), S. 1579. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061579>.

Rončević, A. u. a. (2023b) „Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective“, *Biomedicines*, 11(6), S. 1579. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061579>.

Rong, L., Li, N. und Zhang, Z. (2022a) „Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions“, *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 41(1), S. 142. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02349-7>.

Rong, L., Li, N. und Zhang, Z. (2022b) „Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions“, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), S. 142. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02349-7>.

Ryabchykov, O., Guo, S. und Bocklitz, T. (2020) „Micro-Raman Spectroscopy“, in J. Popp und T. Mayerhöfer (Hrsg.) *Theory and Application*. De Gruyter, S. 81–106. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1515/9783110515312-004>.

Safi, R., Menéndez, P. und Pol, A. (2024) „Lipid droplets provide metabolic flexibility for cancer progression“, *FEBS Letters*, 598(10), S. 1301–1327. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14820>.

Scherm, A. u. a. (2023) „Targeted therapies in patients with newly diagnosed glioblastoma—A systematic meta-analysis of randomized clinical trials“, *International Journal of Cancer*, 152(11), S. 2373–2382. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/ijc.34433>.

Schie, I.W., Stiebing, C. und Popp, J. (2021) „Looking for a perfect match: multimodal combinations of Raman spectroscopy for biomedical applications“, *Journal of Biomedical Optics*, 26(8), S. 080601. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.8.080601>.

Seidel, C. und Nicolay, N.H. (2024) „Vorasicidenib bei niedriggradigen Gliomen – neues Therapieprinzip mit offenen Fragen zu den Langzeitergebnissen“, *Strahlentherapie und Onkologie*, 200(2), S. 178–180. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00066-023-02179-2>.

Shakya, S. u. a. (2021) „Altered lipid metabolism marks glioblastoma stem and non-stem cells in separate tumor niches“, *Acta Neuropathologica Communications*, 9, S. 101. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01205-7>.

Sharma, P. u. a. (2023) „Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts“, *Neuro-Oncology Advances*, 5(1), S. vdad009. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad009>.

- Shelnutt, J.A. u. a. (1981) „Protein influences on porphyrin structure in cytochrome c“, *Biochemistry*, 20(22), S. 6485–6497. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1021/bi00525a030>.
- Sherman, J.H. u. a. (2024) „Targeting drug resistance in glioblastoma (Review)“, *International Journal of Oncology*, 65(2), S. 1–15. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3892/ijo.2024.5668>.
- Shutaywi, M. und Kachouie, N.N. (2021) „Silhouette Analysis for Performance Evaluation in Machine Learning with Applications to Clustering“, *Entropy*, 23(6), S. 759. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/e23060759>.
- Sigle, M. u. a. (2023) „Translating genomic tools to Raman spectroscopy analysis enables high-dimensional tissue characterization on molecular resolution“, *Nature Communications*, 14(1), S. 5799. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41417-0>.
- Silva, M.I.D., Stringer, B.W. und Bardy, C. (2023) „Neuronal and tumourigenic boundaries of glioblastoma plasticity“, *Trends in Cancer*, 9(3), S. 223–236. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.10.010>.
- Sim, H.-W., Galanis, E. und Khasraw, M. (2022) „PARP Inhibitors in Glioma: A Review of Therapeutic Opportunities“, *Cancers*, 14(4), S. 1003. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers14041003>.
- Spehalski, E.I. u. a. (2019) „The Quiescent Metabolic Phenotype of Glioma Stem Cells“, *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 12(6), S. 1–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.35248/0974-276X.19.12.502>.
- Statnikov, A., Wang, L. und Aliferis, C.F. (2008) „A comprehensive comparison of random forests and support vector machines for microarray-based cancer classification“, *BMC Bioinformatics*, 9(1), S. 319. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-319>.
- Stoyanov, G.S. u. a. (2022) „Reclassification of Glioblastoma Multiforme According to the 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: A Single Institution Report and Practical Significance“, *Cureus*, 14(2). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.7759/cureus.21822>.
- Strobel, H. u. a. (2019) „Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy“, *Biomedicines*, 7(3), S. 69. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030069>.
- Stupp, R. u. a. (2005) „Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma“, *New England Journal of Medicine*, 352(10), S. 987–996. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- Taïb, B. u. a. (2019) „Lipid accumulation and oxidation in glioblastoma multiforme“, *Scientific Reports*, 9(1), S. 19593. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55985-z>.

- Talbot, H. u. a. (2024a) „KS01.6.A THE LIPID DROPLET PHENOTYPE AS A TARGETABLE METABOLIC DEPENDENCY OF TUMOR CELLS AND PRO-TUMORAL MACROPHAGES IN THE PERI-NECROTIC GBM NICHE“, *Neuro-Oncology*, 26(Supplement\_5), S. v3. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae144.008>.
- Talbot, H. u. a. (2024b) „KS01.6.A THE LIPID DROPLET PHENOTYPE AS A TARGETABLE METABOLIC DEPENDENCY OF TUMOR CELLS AND PRO-TUMORAL MACROPHAGES IN THE PERI-NECROTIC GBM NICHE“, *Neuro-Oncology*, 26(Supplement\_5), S. v3. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae144.008>.
- Tchoghandjian, A. u. a. (2010) „A2B5 Cells from Human Glioblastoma have Cancer Stem Cell Properties“, *Brain Pathology*, 20(1), S. 211–221. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00269.x>.
- Tetzner, A. u. a. (2021) „Künstliche Neuronale Netze – Aufbau, Funktion und Nutzen“, in D. Frick u. a. (Hrsg.) *Data Science: Konzepte, Erfahrungen, Fallstudien und Praxis*. Wiesbaden: Springer Fachmedien, S. 225–239. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-658-33403-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-658-33403-1_14).
- Treps, L. u. a. (2017) „Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles“, *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), S. 1359479. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1359479>.
- Varghese, J. (2020) „Artificial Intelligence in Medicine: Chances and Challenges for Wide Clinical Adoption“, *Visceral Medicine*, 36(6), S. 443–449. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1159/000511930>.
- Vitale, A.M. u. a. (2024) „An overview of glioblastoma multiforme *in vitro* experimental models“, *Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 97(1). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4081/jbr.2024.11920>.
- Vlasi, E. u. a. (2011) „Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), S. 16062–16067. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106704108>.
- Vrazhnov, D. u. a. (2023) „Discovering Glioma Tissue through Its Biomarkers' Detection in Blood by Raman Spectroscopy and Machine Learning“, *Pharmaceutics*, 15(1), S. 203. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010203>.
- Wang, H. u. a. (2022) „Hedgehog signaling regulates the development and treatment of glioblastoma (Review)“, *Oncology Letters*, 24(3), S. 1–15. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13414>.
- Wang, N. u. a. (2023) „Label-Free Raman Spectromicroscopy Unravels the Relationship between MGMT Methylation and Intracellular Lipid Accumulation in Glioblastoma“, *Analytical Chemistry*, 95(31), S. 11567–11571. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00967>.

- Weller, M. u. a. (2022) „Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021“, *Der Onkologe*, 28(2), S. 155–163. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00761-021-01083-7>.
- Womeldorff, M., Gillespie, D. und Jensen, R.L. (2014) „Hypoxia-inducible factor–1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma“, *Neurosurgical Focus*, 37(6), S. E8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3171/2014.9.FOCUS14496>.
- Wong, Q.H.-W. u. a. (2021) „Molecular landscape of IDH-mutant primary astrocytoma Grade IV/glioblastomas“, *Modern Pathology*, 34(7), S. 1245–1260. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00778-x>.
- Wu, Q., Berglund, A.E. und Etame, A.B. (2021) „The Impact of Epigenetic Modifications on Adaptive Resistance Evolution in Glioblastoma“, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), S. 8324. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms22158324>.
- Wurm, L. u. a. (2023) „Rapid, label-free classification of glioblastoma differentiation status combining confocal Raman spectroscopy and machine learning“, *The Analyst*, Advance Article. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1039/d3an01303k>.
- Yeo, A.T. u. a. (2022) „Single-cell RNA sequencing reveals evolution of immune landscape during glioblastoma progression“, *Nature Immunology*, 23(6), S. 971–984. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01215-0>.
- Youngblood, M.W., Stupp, R. und Sonabend, A.M. (2021) „Role of Resection in Glioblastoma Management“, *Neurosurgery Clinics of North America*, 32(1), S. 9–22. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.nec.2020.08.002>.
- Yuan, X. u. a. (2018) „Effect of Laser Irradiation on Cell Function and Its Implications in Raman Spectroscopy“, *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8), S. e02508-17. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-17>.
- Zhang, L. u. a. (2023) „A Handheld Visible Resonance Raman Analyzer Used in Intraoperative Detection of Human Glioma“, *Cancers*, 15(6), S. 1752. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cancers15061752>.
- Zhang, S. u. a. (2023) „Molecular Fingerprint Detection Using Raman and Infrared Spectroscopy Technologies for Cancer Detection: A Progress Review“, *Biosensors*, 13(5), S. 557. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/bios13050557>.
- Zhu, L. u. a. (2024) „Precise Identification of Glioblastoma Micro-Infiltration at Cellular Resolution by Raman Spectroscopy“, *Advanced Science*, 11(36), S. 2401014. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/advs.202401014>.
- Zikou, A. u. a. (2018) „Radiation Necrosis, Pseudoprogression, Pseudoresponse, and Tumor Recurrence: Imaging Challenges for the Evaluation of Treated Gliomas“, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2018(1), S. 6828396. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1155/2018/6828396>.

## 5. Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulf Kahlert und Prof. Dr. Michael Hacker als meine persönlichen Mentoren und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Diskussionen und ihre persönliche Bereitschaft, mich jederzeit fachlich zu unterstützen. Sie haben mich inspiriert, für die Wissenschaft begeistert und werden meinen weiteren Weg somit weiter prägen. Ihre Förderung hat mir den Freiraum gegeben, diese Arbeit konzeptionell und methodisch eigenständig zu entwickeln.

Mein weiterer Dank geht an Dr. Björn Fischer für die persönliche, geduldige Betreuung und als geduldiger Ansprechpartner für die Vielzahl an Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt zudem Prof. Dr. Katharina Faust, der Direktorin der Klinik für Neurochirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Möglichkeit, diese Arbeit in einem wissenschaftlich exzellenten Umfeld durchzuführen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Volker Neuschmelting, Dr. Igor Fischer und insbesondere Dr. Jakub Dybas danken, die mich durch den Austausch und Ihre große Expertise ebenfalls sehr unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in allen Phasen dieser Dissertation mit Rückhalt, Zuversicht und Verständnis begleitet haben. Ohne ihre Geduld, Loyalität und Motivation wäre diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen.

Diese Dissertation ist ihnen gewidmet, für ihren Glauben an mich, auch in Momenten, in denen Wissenschaft Geduld verlangt.