

Suse Beyer

Dr. sc. hum.

**SELDI-TOF-MS: Beurteilung von Plattform, Präprozessierungsalgorithmen und statistischen Auswerteverfahren für den Einsatz der Technologie zur Vorhersage der kanzerogenen Wirkung chemischer Stoffe**

Geboren am 17.02.1970 in Ulm

Diplom der Fachrichtung Biologie am 7.4.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biometrie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. Annette Kopp-Schneider

Bedingt durch die hohe Sensitivität der SELDI-Methode als MS-basierter Plattform ist für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen eine genaue Kontrolle prä-analytischer Variablen der Chip-Präparation und der Probenprozessierung notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde diesbezüglich ein für die Analyse von Leberlysatsproben optimiertes Präparationsprotokoll durch die Veränderung verschiedener SELDI-Chip-Präparationsschritte etabliert, wodurch die Aussagekraft von SELDI-Spektren stark erhöht werden konnte. Da die Parameterwahl bei der Prä-Prozessierung von hochdimensionalen SELDI-Rohspektren zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen nach der statistischen Datenanalyse führen kann, wurden weiterhin zur Ermittlung optimaler Parameter für einzelne Prä-Prozessierungsschritte zwei Software-Tools für die Prä-Prozessierung verglichen. Da das in beiden Software-Tools implementierte globale Normalisierungsverfahren als nicht geeignet für die Normalisierung von komplexen SELDI-Spektren erschien, wurde ein alternatives Normalisierungsverfahren für komplexe Proteinproben etabliert. Dieses Verfahren benutzt für die Normalisierung nur die Intensitäten des niedermolekularen Standardproteins Insulin  $\beta$ -Kette Fragment, das in geringen Konzentrationen jeder Leberlysatsprobe als *spike* zugesetzt worden war. Es konnte gezeigt werden, dass eine relative Quantifizierung der Intensitäten in komplexen Spektren nach der *spike*-

abhängigen Normalisierung genauer war als nach einem globalen Normalisierungsansatz.

Basierend auf diesen für Leberlysatenproben optimierten prä- und postanalytischen Schritten wurde in der vorliegenden Arbeit der Einsatz von SELDI-Proteinprofilen zur Bewertung des kanzerogenen Potentials chemischer Stoffe exemplarisch an verschiedenen toxikologischen Studien geprüft. In der ersten tierexperimentellen Studie waren Wistar-Ratten mit dem Leberkanzerogen NNM zur Induktion von Lebertumoren behandelt worden. Die Abbildung NNM-spezifischer Endpunktmarker konnte nach differentiellen Expressionsanalysen basierend auf SELDI-Spektren gezeigt werden. Zusätzlich ließen die SELDI-Proteinprofile eine Unterscheidung zwischen neoplasie-spezifischen und nicht neoplasie-spezifischen Markern zu; diese Ergebnisse korrelierten mit Ergebnissen konventioneller histopathologischer Methoden. Neben NNM-spezifischen Endpunktmarkern konnte an einer zweiten tierexperimentellen Studie die Detektion von frühen Markern mittels SELDI durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die gewählte Normalisierungsmethode einen wesentlichen Einfluss auf die Anzahl der detektierten signifikant regulierten Proteinmassen besitzt. Zur Beantwortung der Frage, ob mittels SELDI-Proteinprofilen die Vorhersage der kanzerogenen Wirkung chemischer Stoffe möglich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit zur Erstellung eines Prädiktionsmodells für die Leberkanzerogenese verschiedene Klassifikationsalgorithmen getestet. Dabei konnten mit *Support Vector Machines (SVMs)* und *Random Forest (RF)* Klassifikationsmodelle erstellt werden, die mit geringen Fehlerraten die Zuordnung von SELDI-Proteinprofilen in drei verschiedene toxikologische Klassen ermöglichten.