

# 2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

---

## Konfigurierung von Oligonukleotid-Bibliotheken für nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren

Dr. Thomas Waschulzik<sup>1</sup>, Manfred Nölte<sup>2</sup>, Gerald Volkmann<sup>2</sup>, Christian Wichert<sup>1</sup>, Dr. Regina Rojek<sup>1</sup>,  
Prof. Dr. Manfred B. Wischnewsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup> iSenselt Intelligente Sensorsoftware und Bioinformatik AG, Fahrenheitstr 7-9, D-28359  
Bremen, {T.Waschulzik,C.Wichert,R.Rojek}@iSenselt.de www.isenseit.de Tel. 0421 949  
06-0

<sup>2</sup> Technologiezentrum Informatik (TZI), Bereich Intelligente Systeme, Universität Bremen,  
Postfach 33 04 40, D-28334 Bremen Postfach 33 04 40, D-28334 Bremen  
{mn,gerald,mwi}@zait.uni-bremen.de www.tzi.de Tel. 0421 2189384

Registriernummer der Online-Anmeldung: XX7

### Vortrag

---

#### Zusammenfassung

Zur Verbesserung der Einsetzbarkeit und zur Vereinfachung der Interpretation der Messergebnisse werden im Umfeld der Biosensorik intelligente bioinformatische Systeme benötigt. Am Beispiel der Konfigurierung von Sensoren für die Nukleinsäureanalytik wird die Notwendigkeit und der Nutzen von Bioinformatiksystemen gezeigt. Es wird vorgestellt wie Entwicklungszeiten reduziert, die Qualität der Sensoren verbessert und die Erstellung von Varianten vereinfacht werden kann.

#### Aufgabenstellung

Mit nukleinsäureanalytischen Verfahren wie der DNA-Mikroarray-Technologie oder Mikrobead-basierten Methoden können genetische Informationen hoch spezifisch nachgewiesen werden. Die nukleinsäure-analytischen Nachweisverfahren können für folgende Aufgabenstellungen eingesetzt werden:

- Genotypisierung (Nachweis von Krankheitserregern in Körperflüssigkeiten und -geweben zur medizinischen Diagnostik und zur Qualitätssicherung bei Lebensmitteln, Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel, Nachweis von Stoffen biologischen Ursprungs in Lebens-, Futter- und Genussmitteln, forensische Anwendungen)
- Genexpressionsanalytik (Erkennung von Expressionsmustern beispielsweise in der Pharmakogenomik)

Zum Nachweis von DNA und RNA werden kurze Nucleinsäuren (Oligonucleotide) verwendet, die einzelsträngig auf DNA-Mikroarrays oder Microbeads befestigt werden. Mit diesen Fänger-Oligonucleotiden, die über ihre Basensequenz definiert werden, ist man in der Lage in speziell aufbereiteten Proben genetische Informationen hoch spezifisch nachzuweisen. Die Konfigurierung von Oligonucleotid-Bibliotheken beinhaltet das Design und die Optimierung von Oligonucleotidmengen zur adäquaten Bearbeitung von technischen und biologischen Aufgaben. Es müssen dabei nicht nur die einzelnen Sonden für den Nachweis von Basensequenzen bestimmt werden, sondern es muss auch die Konsistenz der Bibliothek und die Abdeckung der gesamten Aufgabenstellung bei möglichst niedrigen Kosten gewährleistet werden. Eine Konsistenzbedingung ist, dass alle Sonden unter den bei der Konfigurierung zu definierenden Hybridisierungsbedingungen (Temperatur und Salzgehalt) eine hohe Sensitivität haben.

Bisher wird diese Aufgabe in der Praxis von Hand oder mit unzureichender Software-Unterstützung bearbeitet.

## Methoden

Um eine effiziente automatische Konfigurierung und so eine

- Kostenreduktion
- Verkürzung der Entwicklungszeiten
- Verbesserung und Sicherung der Qualität

zu erreichen, wurde das umfangreiche komplexe Softwaresystem iSenseDNA entwickelt, mit dem vollautomatisch eine optimierte Oligonucleotid-Bibliothek erstellt werden kann. Ausgangsbasis für die Konfigurierung ist die Basensequenz der nachzuweisenden und abzugrenzenden Ziel DNA/RNA.

- Folgende Kriterien werden bei der Konfigurierung der Bibliotheken berücksichtigt:
- Sensitivität,
- Spezifität,
- Abdeckung von Ziel-DNA/RNA-Mengen bei Mutationen oder alternativen Spleiß-Varianten,
- Sekundärstruktur der Fänger-Oligonucleotide,
- Sekundärstruktur der Ziel-DNA/RNA [6,7,8,9],
- Probleme der Probenaufbereitung,
- ....

Für die Erstellung der Bibliotheken kommen unter anderem folgende Verfahren zum Einsatz:

- Wissensbasierte Systeme zur Bewertung der Qualität der Fänger-Oligonucleotide
- Numerische Optimierungsverfahren, genetische/evolutionäre Algorithmen zur Qualitätsverbesserung und Kostenreduktion der Oligonucleotid-Bibliothek [1]

- Induktive Algorithmen für die Prognose der Sekundärstrukturen von Fängeroligonukleotiden und der Ziel-DNA/RNA zur Verbesserung der Sensitivität der Hybridisierungsreaktion
- „Data Mining“ Verfahren für die Prognose von Hybridisierungseigenschaften [3,5,9]

## Ergebnisse

Mit der Konfigurierungssoftware wurden bisher verschiedene Oligonukleotid-Bibliotheken unter anderem für den Nachweis von Hepatitis-C Viren und für den Nachweis von menschlichen Genen mit alternativen Spleiß-Varianten erstellt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die automatischen Bibliotheken bessere Eigenschaften hinsichtlich der aufgrund von Datenbankabfragen bestimmten Spezifität und Sensitivität haben als die auf konventionellem Weg erstellten Bibliotheken [2,4]. Inzwischen wurde ein Internet-Interface entwickelt, über das die Konfigurierung von Bibliotheken als elektronische Dienstleistung angeboten wird. Die Qualität der automatisch erstellten Bibliotheken hinsichtlich der Hybridisierungssignale wird zur Zeit mit Partnern aus der Forschung und der Industrie evaluiert.

## Literatur

- [1] A. Kel, A. Ptitsyn, V. Babenko, S. Meier-Ewert, H. Lehrach. A genetic algorithm for designing gene family-specific oligonucleotide sets used for hybridization: the G protein-coupled receptor protein superfamily. *Bioinformatics*, 14(3):259-270, 1998.
- [2] M. Nölte, H. Gersdorf, G. Volkmann, R. Bischoff, U. Bohnebeck, M. Sirava, T. Schäfer, T. Waschulzik, D. Blohm. Ein Bioinformatik-Prototyp zur Optimierung einer Oligonukleotidbibliothek für die Identifikation von Hepatitis C Viren mittels DNA-Mikroarrays in "DNA-Chiptechnologie: Anwendung und Nutzung", Statusseminar DECHEMA 2000.
- [3] M. Nölte, T. Waschulzik, M. Bethke, J. Hoheisel, D. Blohm. Bestimmung von Hybridisierungseigenschaften von Oligonukleotiden mit Hilfe künstlicher Neuronaler Netzwerke in "Chiptechnologie für DNA-Diagnostik und Sequenzanalyse in Deutschland", Statusseminar DECHEMA 1999.
- [4] M. Nölte, G. Volkmann, D. Drutschmann, T. Waschulzik, D. Blohm. Bioinformatik-System zur Optimierung von Oligonukleotid-Bibliotheken für DNA-Mikroarrays in „Chiptechnologien: Vom Genom zum Proteom“, Statusseminar DECHEMA 2001.
- [5] T. Xia, J. SantaLucia, M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, D. H. Turner. Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Modell for Formation of RNA Duplexes with Watson-Crick Base Pairs. *Biochemistry*, 37, p. 14719-14735, 1998.
- [6] M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Parameters: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999).
- [7] D.H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker & D.H. Turner. Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Provides Robust Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* 228, 910-940 (1999).
- [8] C. Flamm, W. Fontana, I. L. Hofacker, and P. Schuster. RNA folding at elementary step resolution. *RNA*, 6:325-338, 2000.
- [9] Martin Fekete, Ivo L. Hofacker, and Peter F. Stadler. Prediction of RNA base pairing probabilities using massively parallel computers. *J.Comp.Biol.* 7: 171-182 (2000)
- [10] T Waschulzik. Qualitätsgesicherte effiziente Entwicklung vorwärtsgerichteter künstlicher Neuronaler Netze mit überwachtem Lernen (QUEEN). Libri Books on Demand, ISBN 3-8311-1386-6, (2001)