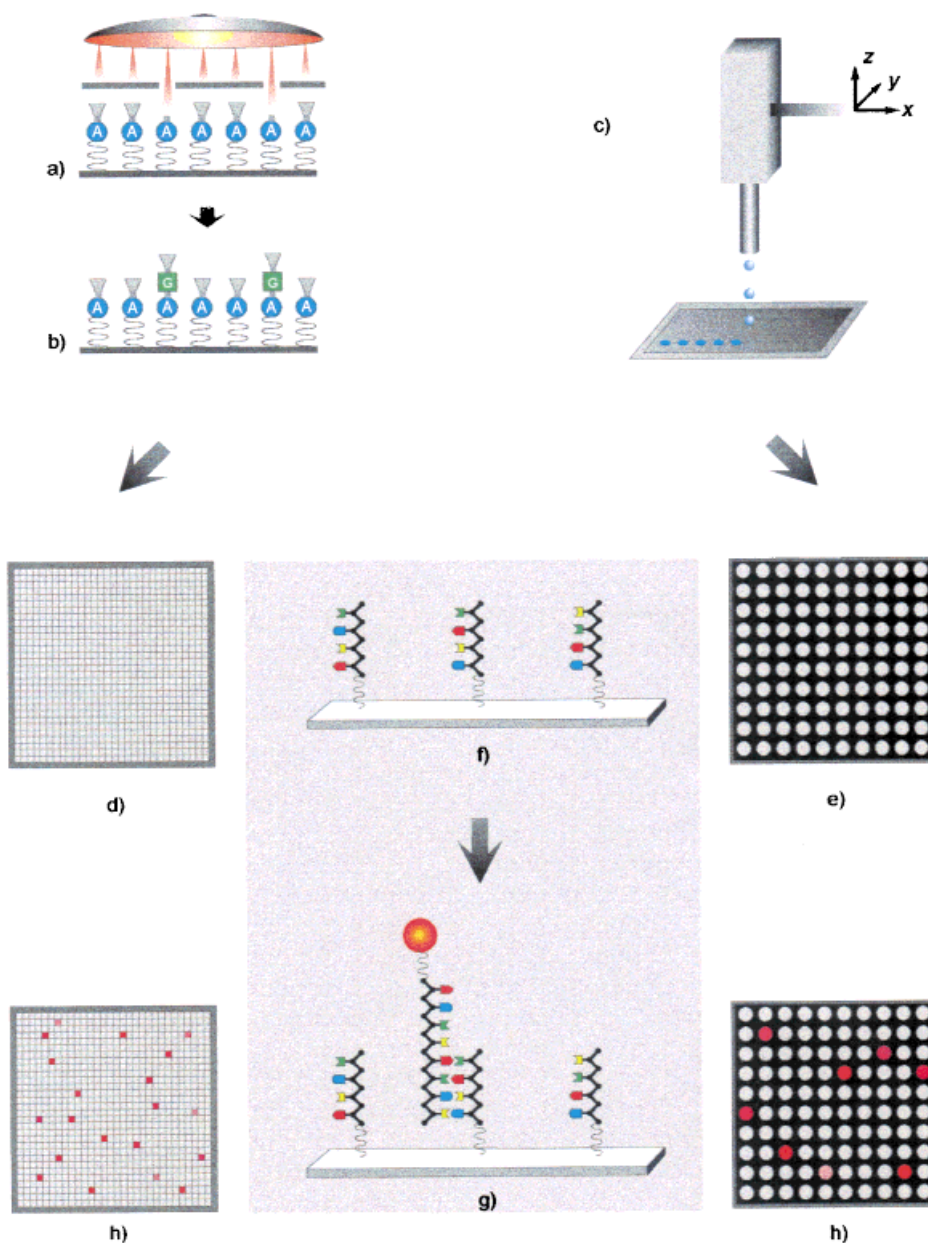


DNA-Mikroarrays**

Christof M. Niemeyer* und Dietmar Blohm

Der Weg vom Southern Blot, dem ersten „Array“,^[1] über das Screening von immobilisierten Klon-Bibliotheken auf Nylonfiltern bis zu den neuartigen Mikroarrays,^[2, 3] die bereits mehrere Millionen^[2e] verschiedener DNA-Fragmente enthalten können, ist im wesentlichen durch zwei Meilensteine gekennzeichnet.^[2a] Der erste war die Verwendung nichtporöser Trägermaterialien, insbesondere Glasoberflächen, und die daraus resultierenden Möglichkeiten der Fluoreszenz-Detektion und der Miniaturisierung (Schema 1). Bis zu 10000 durch enzymatische oder chemische Synthesen hergestellte DNA-Fragmente lassen sich mit automatisierten Dispenser- oder Plotter-Systemen^[2d,f,m, 4] auf chemisch aktivierten Glasträgern kovalent immobilisieren. Der zweite Meilenstein sind die Arbeiten der Firma Affymetrix.^[2e] Mit einem ursprünglich für Peptidsynthesen konzipierten, kombinatorischen Photolithographie-Prozeß gelingt es, lateral hochgradig strukturierte Oligonucleotid-Bibliotheken direkt auf Glasoberflächen zu synthetisieren.^[5] Die Festphase wird zunächst mit Ankergruppen modifiziert, die photolabile Schutzgruppen enthalten.^[6] Die Belichtung durch eine mikrostrukturierte Photomaske führt zur Entschüttung ausgewählter Bereiche, an die der erste Phosphoramidit-Baustein



Schema 1. Vergleich der verschiedenen Chip-Formate. Durch die photolithographische „on-chip“-Oligonucleotid-Synthese nach Affymetrix (a, b) sind deutlich feiner strukturierte DNA-Mikroarrays zugänglich (d) als durch das Aufbringen von zuvor synthetisierten DNA-Fragmenten mit Plotter-Systemen oder Nanoliter-Dispensern (c, e), das es jedoch ermöglicht, auch längere, beispielsweise durch PCR hergestellte DNA auf Chips zu immobilisieren. Nach erfolgter Hybridisierung von Fluorophor-markierten cRNA- oder cDNA-Proben (f, g) wird das erhaltene Hybridisierungsmuster (h) mit einem Fluoreszenz-Scanner ausgelesen.

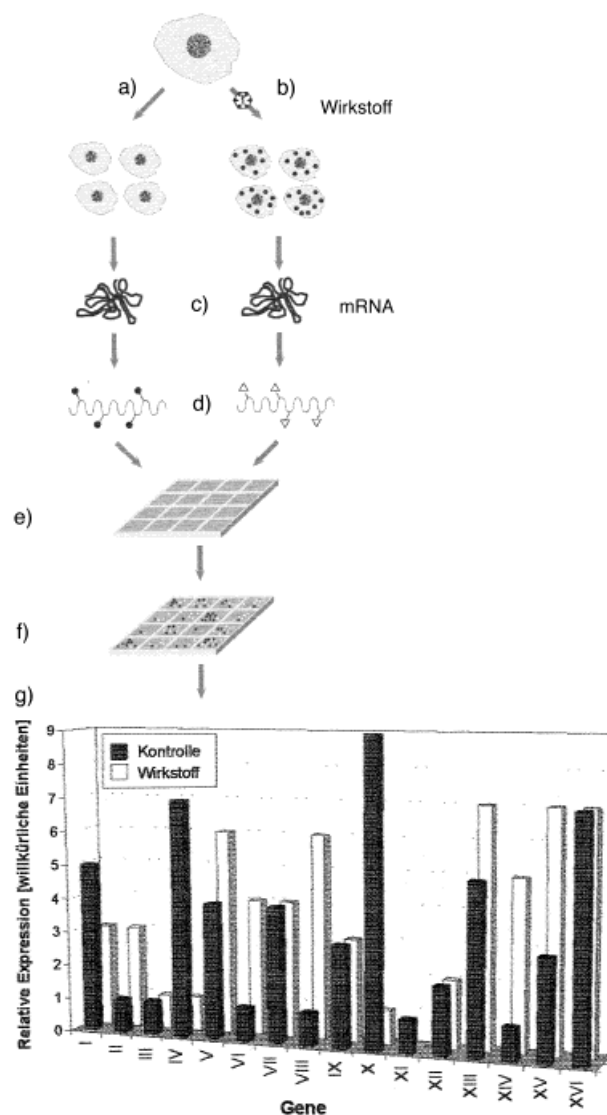
[*] Dr. C. M. Niemeyer, Prof. Dr. D. Blohm
Universität Bremen, FB2-UFT
Biotechnologie und Molekulare Genetik
Leobener Straße, D-28359 Bremen
Fax: (+49) 421-218-7578
E-mail: cmn@biotec.uni-bremen.de

[**] Wir danken S. Hahner und M. Adler für
Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen
und für kritische Diskussionen.

gebunden wird. Da auch die neu eingeführten Nucleotide photolabile Schutzgruppen enthalten, lassen sich durch iterative Wiederholung des Prozesses neue Muster und somit zweidimensional strukturierte Oligonucleotid-Arrays herstellen. Beispielsweise wurde eine Anordnung aus 256 Octanucleotiden auf einer Fläche von 1.3×1.3 cm in 16 Reaktionscyclen innerhalb von vier Stunden synthetisiert.^[7] Gegenwärtiger Stand der Fertigungsroute sind Arrays, die mehr als 300 000 verschiedene DNA-Oligomere mit einer Länge von bis zu 25 Nucleotiden enthalten. Die Verwendung dieser GeneChip-Mikroarrays erfordert ein Mikrofluidsystem, einen Fluoreszenz-Scanner sowie Steuer- und Auswertungssoftware, deren Gesamtkosten bei etwa 175 000 US-Dollar liegen.^[2c] Eine naßchemische In-situ-Synthese von Oligonucleotiden auf Glasoberflächen wurde von der Arbeitsgruppe von Southern entwickelt.^[8] Mit einer schrittweise versetzbaren Vorrichtung zum Aufbringen der Synthesereagentien auf wenige Mikrometer große Flächen lassen sich Oligonucleotid-Arrays herstellen, die ca. 2000 verschiedene Oligomere aus 17 Nucleotiden (17mere) enthalten.^[8b]

Eine Motivation zur Entwicklung von DNA-Mikroarrays ergab sich aus den Bestrebungen innerhalb des Human-Genom-Projektes, leistungsfähigere Varianten der Nucleinsäure-Sequenzierung zu entwickeln. Als vielversprechender Ansatz galt das „sequencing by hybridization“^[9] (SBH), das die De-novo-Sequenzierung einer unbekannten Nucleinsäuresequenz durch Hybridisierungsanalyse ermöglichen sollte. Dabei wird ein DNA-Array verwendet, das alle möglichen $65\,536 (=4^8)$ Octanucleotide enthält. Im Laufe der Erprobung zeichnete sich ab, daß die SBH mit unerwarteten Problemen verknüpft ist, DNA-Arrays aber unmittelbar für die Analyse der Genexpression^[2c,e,f,m, 3] sowie für die Resequenzierung und die Mutationsanalyse^[2h] verwendbar sind. Die besondere Stärke der Array-Analytik ergibt sich aus der hochredundanten Messung vieler paralleler Hybridisierungsereignisse. Diese Redundanz, die ein hohes Maß an Nachweissicherheit gewährleistet, bedeutet nicht die mehrfache Platzierung identischer Oligomersonden auf dem Chip, sondern daß viele Sonden mit unterschiedlicher Sequenz für eine Ziel-Nucleinsäure vorhanden sind.

Zur Analyse der Genexpression wird beispielsweise aus verschiedenen Geweben die Gesamt-mRNA oder zur Verbesserung der Nachweisgrenze polyadenylierte RNA (poly-(A)⁺-RNA) isoliert, die enzymatisch in cDNA überführt und mit der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) oder durch isotherme Amplifikation vervielfältigt und z.B. mit Fluorophoren markiert wird. Das Sondenmaterial wird am Mikroarray hybridisiert, das Oligomer-Sonden in Form kurzer Oligonucleotide oder auch längerer cDNA-Fragmente, z.B. PCR-Produkte, enthält, die zu den zu untersuchenden Genabschnitten komplementär sind. Eine experimentelle Variante mit verbesserter Leistungsfähigkeit ist die differentielle Expressionsanalyse (Schema 2). Hier werden zwei zu vergleichende mRNA-Populationen mit verschiedenen Fluorophoren markiert, so daß deren Konkurrenz um die festphasengebundenen Sonden über die Farbe direkt abgelesen und als Aussage über die relative Stärke der Expression gewertet werden kann. Durch einen derartigen Vergleich der Transkriptionsaktivität individueller Gene lassen sich



Schema 2. Differentielle Expressionsanalyse am Beispiel von Wirkstoff-Effekten. Zellen werden ohne Wirkstoff (a) und in dessen Gegenwart kultiviert (b). Die isolierte mRNA (c) wird amplifiziert und mit verschiedenen Fluorophoren markiert (d). Eine Mischung der Nucleinsäureproben wird am Mikroarray hybridisiert (e). Die Konkurrenz um die Chip-gebundenen, komplementären Sondenmoleküle führt zur Bildung von Mischfarben (f), symbolisiert durch unterschiedliche Häufigkeit der beiden Markierungen, die mit einem Fluoreszenz-Scanner ausgelesen und quantifiziert werden (g).

nicht nur Rückschlüsse ziehen, ob und wie externe Parameter auf die zelluläre Genexpression wirken, auch fundamentale Differenzierungs- und Wachstumsprozesse wie Mitose und Meiose lassen sich untersuchen.^[2k] Wegen des kleinen Genoms wird gegenwärtig vor allem Hefe als eukaryotischer Modellorganismus untersucht. Die baldige Verfügbarkeit von Mikroarrays mit Sonden für alle ca. 100 000 menschlichen Gene zeichnet sich jedoch ab.^[2a] Sie werden die Bedeutung des Expressions-Monitoring für die Pharmaforschung noch weiter verstärken, da sowohl krankheitsrelevante Genprodukte als Angriffsorte von Wirkstoffen aber auch die Wirkstoffeffekte selbst durch Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening, HTS) analysierbar sind.^[2i]

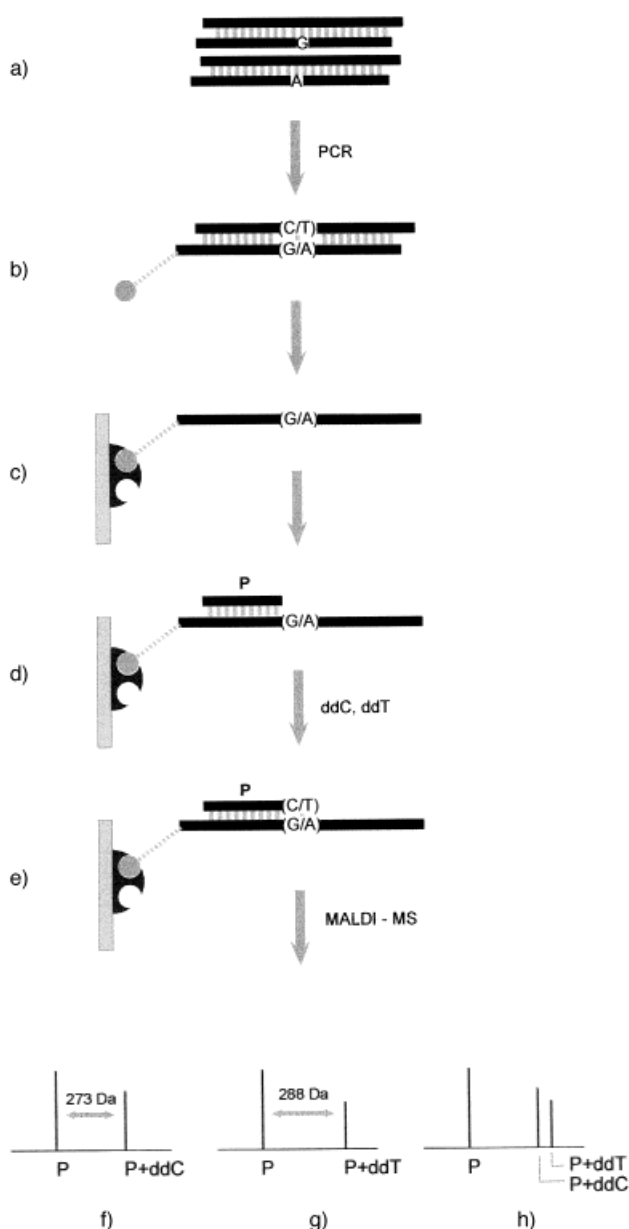
Neben der mehr forschungsorientierten Expressionsanalyse gewinnt inzwischen auch die zweite Hauptanwendung von Mikroarrays zunehmend an Bedeutung, die Analyse bereits bekannter Nucleinsäuresequenzen, beispielsweise im Rahmen eines Mutations-Screenings.^[2h] Hierzu sind die Arrays so aufgebaut, daß neben dem zur Zielsequenz vollständig komplementären Oligomer auch entsprechende Homologe vorliegen, in denen einzelne Basen ausgetauscht sind. Dies führt zur Bildung charakteristischer Hybridisierungsmuster, die sich einerseits zur Detektion mutierter Basen und andererseits zur Erkennung unspezifischer Fehlhybridisierungen eignen.^[2h] Um eine möglichst effiziente Genotypisierung vornehmen zu können, werden Mikroarrays entwickelt, die das simultane Lesen von mehreren zehn- bis hunderttausend Basen ermöglichen. Eine solche Hochdurchsatz-Analyse von Punktmutationen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ist neben Anwendungen in der Populationsgenetik^[2i] und der Identifizierung von Organismen auch in der klinischen Diagnostik von Krebs^[2g] und viralen Erkrankungen, z. B. von AIDS,^[2e] von größter Bedeutung, insbesondere für das Konzept der „Pharmacogenomics“.^[2i] Das Lesen einzelner Basenpositionen wird auch zur Resequenzierung hochvariabler Genbereiche genutzt, wie sie beispielsweise im für Brustkrebs verantwortlichen *brca1*-Gen vorkommen, von dem mehr als 400 spezifische Mutationen bekannt sind.^[2h]

So imponierend der technische Fortschritt bei der Array-Herstellung auch ist, so ungeklärt sind noch diverse grundlegende Fragen in diesem jungen Forschungsgebiet, beispielsweise die der Topologie DNA-funktionalisierter Oberflächen und die nach den Details der an der Phasengrenze ablaufenden molekularen Wechselwirkungen. So wurde kürzlich eine Reihe von Arbeiten zur Charakterisierung von DNA-Monoschichten publiziert, die durch Selbstorganisation aus endständig Thiol-modifizierten Oligomeren auf Goldsubstraten hergestellt wurden.^[10] Neben klassischen Hybridisierungsexperimenten mit radioaktiv markierten Oligomeren wurden hierzu auch Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (x-ray photoelectron spectroscopy, XPS),^[10a] Neutronenreflexion,^[10b] Rasterkraftmikroskopie^[10c, 10g] und elektrochemische Methoden wie Cyclovoltammetrie^[10c-f] eingesetzt. Dabei wurden sowohl Informationen über die Beladungsdichte der Oberflächen als auch Hinweise auf die Ausrichtung der DNA-Stränge erhalten. Monoschichten aus einzelsträngigen Oligomeren liegen beispielsweise horizontal auf der Oberfläche, wodurch Mehrpunktkontakte gebildet werden,^[10a,b] während doppelhelicale Fragmente nahezu vertikal zur Festphase orientiert sind.^[10b,f] Interessanterweise lassen sich auch Einzelstränge aufrichten, indem die DNA-funktionalisierte Oberfläche mit kurzkettigen Thioalkanolen behandelt wird.^[10a,b]

Grundlagenforschung mit Oligonucleotid-Arrays wird auch von der Arbeitsgruppe von Southern ausgeführt,^[2b, 8] beispielsweise um die Auswirkung von Faktoren wie Gestalt, Länge und Basenzusammensetzung der sich bildenden Doppelhelices auf die Effizienz der Hybridisierung zu untersuchen.^[8c-f] Auch sterische Effekte als Folge der Festphasen-Belegungsdichte oder der Länge von Oligonucleotid- und Spacer-Gruppen werden experimentell untersucht.^[8g] Problematisch ist, daß Schmelztemperatur und Sekundärstruktur einer Nucleinsäure die Effizienz der Duplexbildung beein-

flussen,^[8e] da es für die Mikroarray-Analytik sehr wichtig ist, sequenzunabhängig einheitliche Signalintensitäten zu erhalten. Lösungsansätze reichen von der Zugabe quartärer Ammoniumsalz-Additive zum Hybridisierungspuffer,^[11] dem Einbau von Nucleotidanaloga in die Festphasen-gebundenen Oligomere^[12] bis hin zur semiempirischen Auswahl geeigneter Sequenzabschnitte.^[13] Diese Arbeiten sind für die experimentelle Mikroarray-Technologie, aber auch darüber hinaus relevant, beispielsweise für die Antisense-Technik. So wurde mit Mikroarrays die sequenz- und längenabhängige Hybridisierungseffizienz von annähernd 2000 Oberflächen-gebundenen Oligomeren parallel untersucht, um Antisense-Oligonucleotide für die effektive Bindung an mRNA auszuwählen^[8h] und um die Faltung von mRNA-Molekülen zu untersuchen.^[8k]

In der Mikroarray-Analytik besteht ein großes Interesse an der technischen Weiterentwicklung sicherer und hochempfindlicher Detektionsmethoden, um beispielsweise auch geringste Mengen von mRNA ohne die Notwendigkeit einer vorherigen separaten Amplifikation noch analysieren zu können. In der Array-Technik haben Fluorophore die bisher gebräuchlichen, hochempfindlich zu quantifizierenden Radionuclid-Markierungen weitgehend abgelöst.^[2d,e] Gegenwärtig verfügbare Fluoreszenz-Scanner ermöglichen die Quantifizierung von Sub-Attomol-Mengen eines Fluorophors bei einem dynamischen Meßbereich von drei und mehr Dekaden.^[2d] Generell ist der Hybridisierungsnachweis auf Basis markierter Nucleinsäuren jedoch mit Nachteilen verbunden, da nicht nur sichergestellt sein muß, daß hochgradig homogen markierte Proben verwendet werden, sondern auch stringente Waschschrte zur Abtrennung des nichtgebundenen Probenmaterials nach erfolgter Hybridisierung erforderlich sind. Anstelle dieser Endpunktbestimmung wäre eine Echtzeit-Hybridisierungsanalyse wünschenswert, um aus der sequenz- und temperaturabhängigen Bindungskinetik einzelner Oligomer-Sonden zusätzliche, für die Analytik nützliche Informationen zu erhalten. Als geeignete, markierungsfreie Detektionsprinzipien werden beispielsweise optische^[14] oder massensensitive Methoden,^[15] häufig in Kombination mit metallischen Transducerschichten, untersucht. Wenngleich bislang noch nicht ausreichend sensitiv, ist die Impedanzspektroskopie^[16] sehr attraktiv, da mit ihr die Vision des DNA-Chips mit integrierter Auswertungselektronik realisierbar wäre. In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten zur elektronisch gesteuerten Hybridisierung^[17] zu nennen, die jüngst erfolgreich zur SNP-Detektion eingesetzt wurde.^[17d] Eine besonders leistungsfähige Variante des markierungsfreien Auslesens (read out) von Mikroarrays ist die Massenspektrometrie.^[18] Die Firma Sequenom entwickelte eine SNP-Analysemethode,^[18b] bei der Festphasen-gebundene Oligonucleotide nach Hybridisierung mit Proben-DNA enzymatisch um eine Base verlängert und die Reaktionsprodukte mit Matrix-assistierter Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-MS analysiert werden (Schema 3). Durch vollständige Automatisierung werden Tagesdurchsätze von ca. 10000 Proben erreicht. Da mit MALDI-MS-Detektion das Molekulargewicht von DNA-Oligomeren auf wenige Einheiten genau bestimmbar ist, läßt sie sich auch für Sequenzierungen nach der Sanger-Methode im Massenbereich bis ca. 20 kDa, was ca. 60 Nucleotiden entspricht, vorteilhaft einsetzen.^[18c,d]



Schema 3. Massenspektrometrische SNP-Analyse. Genomische DNA (a) eines heterozygoten Probanden mit einer Punktmutation (G→A) wird durch PCR amplifiziert, wobei eine Biotin-Markierung in das DNA-Fragment eingeführt wird (b). Die DNA wird denaturiert und an einer Streptavidin-beschichteten Festphase immobilisiert (c). Anschließend erfolgt die Hybridisierung mit einer Oligonucleotidsonde (P), die unmittelbar vor der Stelle der Punktmutation bindet (d) und enzymatisch in Gegenwart von Didesoxynucleotiden, die zum Kettenabbruch führen (ddC und ddT), verlängert wird (e). Die durch MALDI-TOF-MS-Analyse der Produkte erhaltenen, schematisch dargestellten Massenspektren zeigen das Ergebnis eines gesunden Probanden (f) und eines kranken homozygoten Probanden (g) sowie das eines heterozygoten Probanden (h).

Die geradezu euphorische Aufbruchstimmung im Gebiet der DNA-Mikroarrays ist wohl gleichermaßen auf die faszinierenden biologisch-analytischen Möglichkeiten der Forschung und auf die wirtschaftlichen Erwartungen im Bereich der biomedizinischen Diagnostik und bei diversen industriellen Anwendungen zurückzuführen. Zwischen Wunsch und Wirklichkeit liegen allerdings noch ernstzunehmende technische Hürden, die von der reproduzierbaren Chip-Herstel-

lung bis hin zur Notwendigkeit reichen, alle Tausende Hybridisierungen eines Chips unter identischen Bedingungen durchführen zu müssen. Ihre gegenwärtige Grenzen findet die Mikroarray-Analytik noch bei der Bestimmung von Längenpolymorphismen repetitiver Elemente von Mikro- und Minisatelliten-DNA, die in der Forensik und für Verwandtschaftsanalysen genutzt werden. Als Lösungsansatz zeichnet sich massenspektrometrisches HTS ab.^[18e] Zur weiteren Sensitivitätsverbesserung der Array-Analytik könnten die aktuellen Entwicklungen im Bereich der Einzelmolekül-Nachweisverfahren oder auch Chip-basierte Amplifikationsmethoden beitragen.^[19] Um die volle Leistungsfähigkeit dieser neuen Technologie zu nutzen, ist es allerdings notwendig, die Rolle der Bioinformatik stärker als bisher zu berücksichtigen. Wegen der gigantischen Datenmengen, die bei den Array-Hybridisierungen anfallen, werden umfassende Hard- und Software-Lösungen benötigt, mit denen sowohl das Vorab-Design von Experiment und Chip als auch die Analyse und Standardisierung der Ergebnisdaten bewerkstelligt werden kann, um sie beispielsweise im Rahmen der industriellen Genomforschung^[2k] nutzbar zu machen. Dies ist besonders wichtig, wenn die nächsten Array-Generationen tatsächlich mehrere Hundertmillionen Oligomersonden enthalten sollen.^[2e] Als zusätzlicher Parameter erlangt die gegenwärtig kaum berücksichtigte Rolle der Translation, also der Abgleich von mRNA-Expressionsdaten mit der tatsächlich vorliegenden Proteinausstattung einer Zelle, dem Proteom, zunehmend an Bedeutung. Es bleibt daher abzuwarten, ob die zukünftige Entwicklung von Protein-, Antikörper-^[20] oder Zell-Arrays^[2a] helfen wird, Genom- und Proteomforschung^[21] zu korrelieren und zum Verständnis der gesamtzellulären Vorgänge beizutragen, damit die mehrdimensionalen Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp aufgeklärt und vereinheitlicht werden können.

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2865–2869

Stichwörter: Analytische Methoden • Gentechnik • Mikroarrays • Nucleinsäuren • Oligonucleotide

- [1] E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* **1975**, 98, 5003.
- [2] Eine Reihe von Übersichtsartikeln wurde kürzlich als „Supplement“ von *Nature Genetics* veröffentlicht: a) E. S. Lander, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 3; b) E. M. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 5; c) D. J. Duggan, M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, J. M. Trent, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 10; d) V. G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati, G. Childs, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 15; e) R. J. Lipshutz, S. P. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 20; f) D. D. L. Bowtell, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 25; g) K. A. Cole, D. B. Krizman, M. R. Emmert-Buck, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 38; h) J. G. Hacia, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 42; i) C. Debouck, P. N. Goodfellow, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 48; k) D. E. Bassett, Jr., M. B. Eisen, M. S. Boguski, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 51; l) A. Chakravarti, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 56; m) Zu frühen Ergebnissen europäischer Arbeitsgruppen siehe: A. Vente, B. Korn, G. Zehetner, A. Poustka, H. Lehrach, *Nat. Genet.* **1999**, 22, 22.
- [3] J. D. Hoheisel, *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 465.
- [4] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, 270, 467.
- [5] S. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. Tsai Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767.
- [6] Aktuelle Arbeiten: a) Chemie der photolithographischen DNA-Synthese: G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentale, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5081; M. C.

- Pirrung, L. Fallon, G. H. MacGall, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 241; M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, im Druck;
- b) Oberflächenanbindung und Synthese von Linkergruppen: M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 1970.
- [7] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5022.
- [8] a) E. M. Southern, U. Maskos, J. K. Elder, *Genomics* **1992**, 13, 1008; b) U. Maskos, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 1679; c) U. Maskos, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 1675; d) U. Maskos, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4663; e) E. M. Southern, S. C. Case-Green, J. K. Elder, M. Johnson, K. U. Mir, L. Wang, J. C. Williams, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1368; f) J. C. Williams, S. C. Case-Green, K. U. Mir, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1365; g) M. S. Shchepinov, S. C. Case-Green, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1155; h) N. Milner, K. U. Mir, E. M. Southern, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 537; k) M. Sohail, S. Akhtar, E. M. Southern, *RNA* **1999**, 5, 646.
- [9] a) W. Bains, G. Smith, *J. Theor. Biol.* **1988**, 135, 303; b) R. Drmanac, I. Labat, I. Brukner, R. Crkvenjakov, *Genomics* **1989**, 4, 114; c) K. Khrapko, L. Y., A. Khorly, V. Shick, V. Florentiev, A. D. Mirzabekov, *FEBS Lett.* **1989**, 256, 118; d) C. R. Cantor, A. Mirzabekov, E. Southern, *Genomics* **1992**, 13, 1378.
- [10] a) T. M. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8916; b) R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, S. Satija, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9798; c) A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4670; d) S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 31; e) S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. McPherson, A. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen, M. G. Hill, *Langmuir* **1998**, 14, 6781; f) S. O. Kelley, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 941; g) Kraftmikroskopie von DNA-Mikroarrays auf Glas-trägern: L. T. Mazzola, S. P. Fodor, *Biophys. J.* **1995**, 68, 1653.
- [11] K. A. Jacobs, R. Rudersdorf, S. D. Neill, J. P. Dougherty, E. L. Brown, E. F. Fritsch, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 4637.
- [12] Gemischte Oligomere aus Ribo- und Desoxyribonucleotiden: J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 430; modifizierte Uridin- und Adenosinbasen in der *brcal*-Analytik: J. G. Hacia, S. A. Woski, J. Fidanza, K. Edgemon, N. Hunt, G. McGall, S. P. Fodor, F. S. Collins, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 4975; Alkyldesoxycytidin-modifizierte Nucleotide (H. K. Nguyen, E. Bonfils, P. Auffray, P. Costaglioli, P. Schmitt, U. Asseline, M. Durand, J. C. Maurizot, D. Dupret, N. T. Thuong, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 4249) weisen in Gegenwart chaotroper Agentien einheitliche Duplexstabilitäten auf: H.-K. Nguyen, O. Fournier, U. Asseline, D. Dupret, N. T. Thuong, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 1492; Peptid-Nucleinsäuren (PNAs) sind ideale Sondenmoleküle für Mikroarrays, da die Duplexbildung kaum durch Sekundärstrukturen beeinflusst wird: H. F. Arlinghaus, M. N. Kwoka, K. B. Jacobson, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3747; J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2792; siehe auch Lit. [3].
- [13] Aus den experimentell bestimmten Hybridisierungseffizienzen der Array-gebundenen Oligomere werden unter Verwendung bioinformatischer Verfahren mit neuronalen Netzen heuristische Regeln aufgestellt, nach denen die Sequenzen der nächsten Oligomer-Generation ausgewählt werden: D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E. L. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1675.
- [14] Oberflächenplasmonen-Resonanz: a) S. J. Wood, *Microchem. J.* **1992**, 47, 330; b) Analyse enzymatischer DNA-Manipulationen: P. Nilsson, B. Persson, M. Uhlen, P. A. Nygren, *Anal. Biochem.* **1995**, 224, 400; c) Ellipsometrie: D. E. Gray, S. C. Case-Green, T. S. Fell, P. J. Dobson, E. M. Southern, *Langmuir* **1997**, 13, 2833; d) Reflexions-Gitterkopp-ler: F. F. Bier, F. W. Scheller, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 669; e) Resonanzspiegelsensor: H. J. Watts, D. Yeung, H. Parkes, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4283; f) Reflektometrische Interferenzspektroskopie: J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, M. Zerlin, C. Maul, R. Thiericke, S. Grabley, *Anal. Biochem.* **1997**, 249, 94.
- [15] Die Hybridisierung von Nucleinsäuren läßt sich mit piezoelektrischen Schwingquarzen (QCM = quartz crystal microbalance) verfolgen: Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijro, M. Mukae, A. Murakami, K. Makino, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8299; b) S. Yamaguchi, T. Shimomura, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1925; c) K. Ito, K. Hashimoto, Y. Ishimori, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 327, 29; d) Hybridisierung an QCM-gebundene DNA-Multischichten: F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2043; e) Detektion einzelner Fehlpaarungen mit QCM-gebundenen PNA-Sonden: J. Wang, P. E. Nielsen, M. Jiang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, M. Mowat, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5200; f) Hybridisierung an QCM-gebundene DNA-Dendrimere: J. Wang, M. Jiang, T. W. Nilsen, R. C. Getts, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8281; g) Verfolgung der enzymatischen Aktivität von DNA-Polymerase an QCM-Oberflächen: K. Niikura, M. Hisao, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8537; zur elektrochemischen Hybridisierungsanalyse siehe: J. Wang, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1681.
- [16] R. Hintsche, M. Paeschke, A. Uhlig, R. Seitz, *Frontiers in Biosensors Fundamental Aspects* (Hrsg.: F. W. Scheller, F. Schaubert, J. Fredowitz), Birkhäuser, Basel, **1997**, S. 267.
- [17] Dieses Prinzip wurde von der US-amerikanischen Firma Nanogen entwickelt: a) C. F. Edman, D. E. Raymond, D. J. Wu, E. Tu, R. G. Sosnowski, W. F. Butler, M. Nerenberg, M. J. Heller, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4907; b) R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. O'Connell, M. J. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 1119; c) J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, A. Uribe, L. O. Gerrue, J. Carrino, M. J. Heller, J. P. O'Connell, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 541; d) P. N. Gilles, D. J. Wu, C. B. Foster, P. J. Dillon, S. J. Chanock, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 365.
- [18] a) Übersicht: E. Nordhoff, F. Kirpekar, P. Roepstorff, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**, 15, 67; b) Enzymatische Verlängerung immobilisierter Oligomere mit Didesoxy-Terminatoren zum Nachweis von SNPs auch bei Heterozygotie: G. S. Higgins, D. P. Little, H. Köster, *Biotechniques* **1997**, 23, 710; c) MALDI-MS-Sequenzierung des menschlichen *p53*-Gens: D. J. Fu, K. Tang, A. Braun, D. Reuter, B. Darnhofer-Demar, D. P. Little, M. J. O'Donnell, C. R. Cantor, H. Köster, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 381; d) Durch Verwendung eines Infrarot-Lasers sind Nucleinsäuren einer Masse von mehr als 500 kDa detektierbar: S. Berkenkamp, F. Kirpekar, F. Hillenkamp, *Science* **1998**, 281, 260; e) MALDI-MS-Detektion von Längenpolymorphismen: A. Braun, D. P. Little, D. Reuter, B. Müller-Mysok, H. Köster, *Genomics* **1997**, 46, 18; P. L. Ross, P. Belgrader, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3966.
- [19] a) Ein Fluoreszenz-Einzelmolekülnachweis (Übersicht: S. Weiss, *Science* **1999**, 283, 1676) wurde kürzlich zur Analyse von DNA-Hybridisierung (W. Trabesinger, G. J. Schutz, H. J. Gruber, H. Schindler, T. Schmidt, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 279) und RNA-Transkription (A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, 280, 585) verwendet; b) Oberflächen-fixierte DNA kann durch isotherme „rolling circle“-Amplifikation vervielfältigt werden: P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **1998**, 19, 225.
- [20] Peptid-Arrays (R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, 48, 9217) werden beispielsweise zum Screening von Antikörpern verwendet: A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Methods Mol. Biol.* **1998**, 87, 25; photolithographische Immobilisierung von Immunglobulinen: L. F. Rozsnyai, D. R. Benson, S. P. A. Fodor, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 801; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 759; die Methode der „DNA-directed immobilization“ (DDI) nutzt DNA-Arrays als Bindungsmatrizes für Antikörper und Enzyme und ermöglicht so auch den Zugang zu gemischten Nucleinsäure- und Protein-Arrays: C. M. Niemeyer, L. Boldt, B. Ceyhan, D. Blohm, *Anal. Biochem.* **1999**, 268, 54; Protein-Mikroarrays zum Screening der Genexpression: A. Lueking, M. Horn, H. Eickhoff, K. Bussow, H. Lehrach, G. Walter, *Anal. Biochem.* **1999**, 270, 103.
- [21] Die Basis der Proteomforschung (Übersichtsartikel: A. Persidis, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 393; R. Parekh, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, Suppl. 19; A. Dove, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 233; F. Lottspeich, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2630–2647; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2476–2492) ist die Trennung von Proteingemischen durch zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese (P. H. O'Farrel, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 4007), mit der, in Analogie zum Southern Blot,^[1] 2D-Proteinarrays hergestellt werden, die mehr als 10000 Spots umfassen können.