


# Herstellung und Verwendung von DNA-Mikroarrays

Dr. Röbbbe Wünschiers, Uppsala University, Dept. Physiol. Botany, Uppsala, Schweden; Dr. Thomas Zinn, Marchery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren; Dr. Steffen Borzner, Philipps-Universität, FB Biologie/Botanik, Marburg

**Die zunehmende Verfeinerung und Automatisierung von Methoden zur Bestimmung von Gensequenzen erlaubt die Entschlüsselung von Genomen der verschiedensten Organismen. Den Höhepunkt dieser Entwicklung stellt sicherlich die kürzlich veröffentlichte Sequenz der menschlichen Chromosomen dar. Damit wurde eine wesentliche Grundlage zur Untersuchung von Erkrankungen auf molekularer Ebene geschaffen. Neben der Kenntnis über die Organisation und Sequenz von Genen steht jetzt die Analyse der Regulation der Genaktivität, die Genexpression bzw. Transkriptionsanalyse, im Vordergrund. Wie verändert sich bspw. die Expression ausgewählter Gene bei einer Infektion oder Erkrankung? Oder anders gefragt: Kann man anhand der Genexpression erkennen, wie hoch das persönliche Risiko ist, an einer Krankheit wie z. B. Krebs zu erkranken? Derart komplexe Fragestellungen können nur mit einer Technologie bearbeitet werden, die es erlaubt, das Zusammenspiel der Expression vieler Gene simultan zu untersuchen. Die Biochiptechnologie, insbesondere die DNA-Chiptechnologie (DNA-Mikroarrays) bietet einen Ansatz dazu.**

 In der wissenschaftlichen Literatur ist der Begriff Biochip immer häufiger anzutreffen. Was sind Biochips? In der Regel bestehen Biochips aus einem Trägermaterial (der „Chip“), an das auf mikroskopisch engem Raum biologische Sonden („Bio“) gebunden sind. Je nach Anwendung können die Sonden DNA, RNA oder Proteine sein (Tab. 1). Die häufigsten Biochips sind zurzeit DNA-Chips, d. h., die Sonde besteht aus

DNA, die auch als DNA-Mikroarrays bezeichnet werden. Die Anwendung von DNA-Mikroarrays erlebt zurzeit einen Boom, insbesondere in der Molekularbiologie.

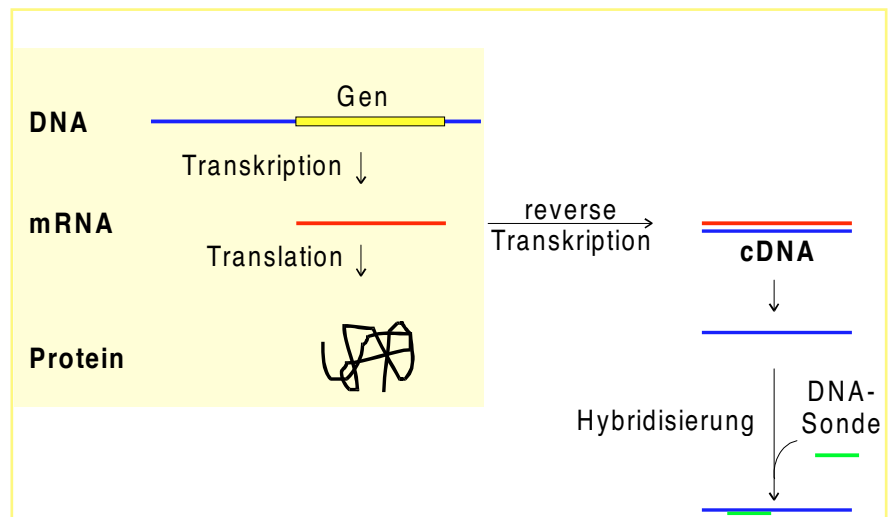
Eine wichtige Fragestellung in der molekulargenetischen Forschung betrifft die Expression von Genen. Die Genexpression beinhaltet alle Schritte, die von der DNA-Sequenz eines Gens zu dem entsprechenden Protein führen. Sie lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Transkription und die Translation (Abb. 1). Während der Transkription wird die genetische Information eines Gens von der DNA abgelesen und in die Form der mRNA (messenger-RNA, Boten-RNA) umgeschrieben. Während die DNA ein doppelsträngiges und stabiles Nukleinsäuremolekül ist, ist die mRNA ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül und vergleichsweise instabil. Die Lebensdauer der mRNA in der Zelle beträgt in der Regel nur wenige Dekaminuten. Die Translation beschreibt die Überset-

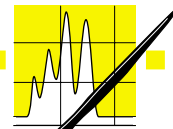
zung der Information auf der mRNA in das entsprechende Protein. Dieser komplexe biochemische Prozess läuft an bestimmten Strukturen, den so genannten Ribosomen, ab.

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wird jede mRNA in das entsprechende Protein übersetzt. Das heißt, es kommt nur extrem selten vor, dass die mRNA gebildet, aber das korrespondierende Protein nicht synthetisiert wird. Daher reicht es in der Regel aus, die in der Zelle vorliegenden mRNA-Moleküle zu identifizieren, um auf die vorhandenen Proteine rückschließen zu können. Dies setzt allerdings voraus, dass die DNA-Sequenz und somit die mRNA-Sequenz der kodierten Proteine bekannt ist.

Dies war in früheren Zeiten selten der Fall und die Transkriptionsanalyse (Welche mRNA ist vorhanden?) beschränkte sich daher auf wenige einzelne Gene. Im Zeitalter der Genomsequenzanalysen hingegen ist die Sequenz aller Gene eines Organismus bekannt

Abb. 1: Schematische Darstellung der in den Zellen ablaufenden Genexpression (gelb unterlegt). Weiterhin sind die im Labor durchgeführte cDNA-Synthese (reverse Transkription) und deren Hybridisierung mit einer DNA-Sonde gezeigt (Abb. Röbbbe Wünschiers).



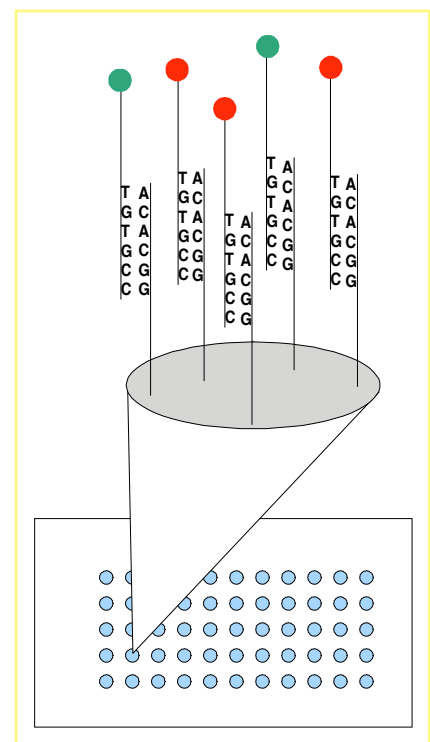


## AUFSÄTZE

## AUFSÄTZE

einzelsträngiges Oligonukleotid, besteht also aus etwa 20–100 Basen. Die Sequenz der Sonde ist komplementär zu einem Abschnitt der zu analysierenden mRNA und hybridisiert mit dieser auf der Membran (Abb. 1). Anschließend kann die gebundene und markierte Sonde sichtbar gemacht werden.

Bei DNA-Mikroarrays wird dieses Verfahren umgekehrt [1]. Nicht die mRNA, sondern die Sonde wird an eine Matrix gebunden. Zudem wird nicht die Sonde, sondern die mRNA bzw. cDNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Abb. 2). Der entscheidende Vorteil der DNA-Mikroarrays ist aber, dass nicht eine, sondern



**Abb. 2:** Darstellung eines einzelnen Spots auf einem DNA-Mikroarray. Dargestellt ist eine kompetitive Hybridisierung. An die Sonden binden cDNA-Moleküle von zwei verschiedenen mRNA-Präparationen (z. B. Probe/Kontrolle; gesund/krank). Die cDNA (also mRNA) mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff ist in größerer Menge vorhanden (Abb. Catherine Wünschiers).

Anwendungsgebiete	Sonden
Genexpressionsanalyse; "Expression profiling" Analyse von Mutationen und Polymorphismen; Vergleichende genomische Analyse	DNA (Oligonukleotide, c DNA, amplifizierte genomische DNA)
Gewebespezifische Expressionsanalysen	RNA
Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen	Peptide, Proteine
Antikörper / Antigen Wechselwirkungen	Antikörper

**Tab. 1:**  
Beispiele für Biochips und ihre Verwendung

Technologie	Dichte; Spotgröße	Bemerkungen
Photolithographische Methode	>106 Proben/cm <sup>2</sup> ; >10 μm	Photolithographische Entfernung von Schutzgruppen oder einer Schutzschicht mit anschließender Kopplung
Piezoelektrischer Transfer	ca. 1000 Proben/cm <sup>2</sup> ; >50 μm	Ink-Jet Prinzip, erlaubt Aufnahme und aktive Dispensierung von Subnanoliter Mengen
Split-Pin-Verfahren	ca. 1000 Proben/cm <sup>2</sup> ; >50 μm	Passiver Transfer; Transfervolumen richtet sich nach Form und Beschaffenheit der Nadeln
Ring and Pin	ca. 1000 Proben/cm <sup>2</sup> ; >50 μm	Passiver Flüssigkeitstransfer

**Tab. 2:**  
Übersicht zu gängigen Verfahren zur Herstellung von DNA-Chips

und ihre Transkription lässt sich mithilfe von DNA-Mikroarray parallel untersuchen. Doch Genomsequenzen sind nicht die einzige Informationsquelle, die genutzt werden kann. Häufig werden auch so genannte cDNA-Bibliotheken (complementary-DNA, komplementäre DNA) verwendet. Sie werden erstellt, indem die gesamte mRNA einer Zellpopulation isoliert und, zur leichteren Handhabung, in DNA umgeschrieben wird (Abb. 1). Allerdings repräsentiert eine cDNA-Bibliothek nur die mRNAs, die unter den gegebenen Umweltbedingungen transkribiert waren, als die mRNA isoliert wurde. Der entscheidende Schritt bei der Transkriptionsanalyse (oft auch als Expressionsanalyse bezeichnet) ist die Synthese spezifischer Sonden, die in DNA-Hybridisierungsexperimenten verwendet werden können.

### ■ DNA-Hybridisierungen

Das methodische Herz der Transkriptionsanalyse von Genen und damit von DNA-Mikroarrays ist die DNA-Hybridisierung. Die Hybridisierung von DNA ist die Aneinanderlagerung zweier einzelsträngiger DNA-Moleküle aufgrund der Watson-Crick-Basenpaarung. Bei der herkömmlichen Transkriptionsanalyse wird die mRNA einer Zellpopulation isoliert, auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert (Northern-Blot): Lange mRNA-Moleküle befinden sich auf der einen Seite der Membran, lange hingegen auf der anderen. Um zu testen, ob ein Gen transkribiert (expressiert) wurde, wird die Membran in eine Pufferlösung getaucht, welche eine z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonde enthält. Die DNA-Sonde ist ein

Oberfläche bzw. Aktivierung oder Substrat	Weitere Verarbeitung	Bemerkungen
Aldehydgruppen	Reduktion mit Natriumborhydrid	
Aminosilane	UV, Hitzebehandlung	
Poly-L-Lysine	UV, Hitzebehandlung	
Epoxy Aktivierung		
Streptavidin		für Biotin markierte DNA-Fragmente
Phenole		

Tab. 3: Verfahren zur Immobilisierung von DNA auf Glasträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays

mehrere Tausend unterschiedlicher Sonden gleichzeitig an die Matrix des DNA-Mikroarrays gebunden sind. Jede einzelne Sonde bildet einen Spot, der mindestens einige Dutzend Mal dieselbe Sonde enthält. Dies hat mehrere Vorteile: Zum einen ist die Signalstärke der hybridisierten mRNA pro Spot höher und zum anderen können kompetitive Hybridisierungen durchgeführt werden (Abb. 2 und 3).

### Herstellung von DNA-Mikroarrays

Bei DNA-Mikroarrays handelt es sich um eine hochdichte, rasterförmige

Anordnung von DNA-Molekülen auf einem Trägermaterial. Jeder Punkt oder Spot entspricht einer DNA-Sonde für ein spezifisches zu analysierendes Gen (Abb. 2). Je nach Herstellungsverfahren sind DNA-Mikroarrays mit einer unterschiedlichen Anzahl und Dichte von DNA-Sonden belegt (Tab. 2). In einem Hybridisierungsexperiment können damit Unterschiede in der Expression Tausender Gene simultan untersucht werden (Abb. 3).

Bei den auf die Chipträger aufzubringenden DNA-Molekülen handelt es sich überwiegend um Oligonukleotide, wie cDNA-Bibliotheken oder amplifizierte PCR-Produkte, die einige

Dutzend Basen lang sind [2]. Bei der Verwendung von Oligonukleotiden können diese in situ auf dem Trägermaterial synthetisiert oder nach ihrer Synthese auf das Trägermaterial aufgebracht werden. Als Trägermaterialien haben sich im Wesentlichen planare Glas- oder Kunststoffträger oder auf Membranen basierende Trägermaterialien durchgesetzt [3]. Diese sind mit verschiedenen Oberflächensubstraten versehen, die eine Immobilisierung der aufgetragenen DNA-Moleküle ermöglichen (Tab. 3).

### In-situ-Synthese von DNA-Sonden

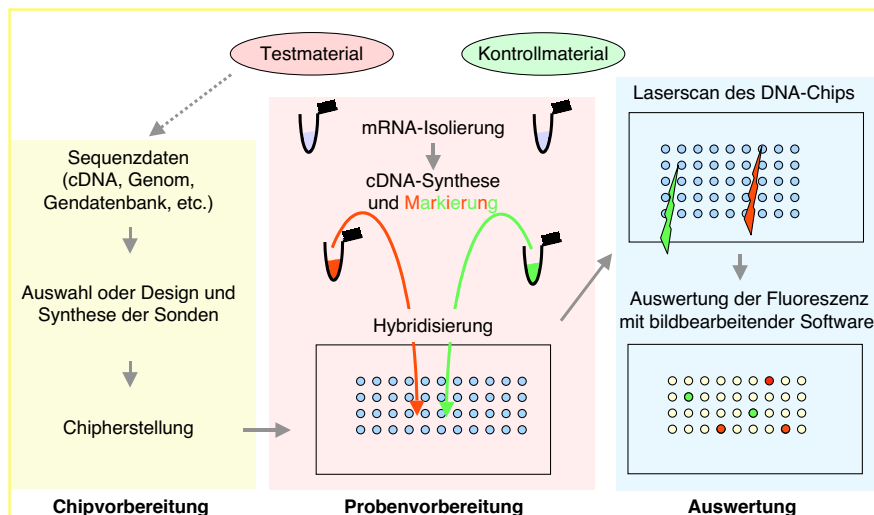
Bei der In-situ-Synthese von Oligonukleotiden auf der Chipoberfläche verwendet man photolabile Schutzgruppen (photolithographisches Verfahren) [4, 5]. Zu Beginn der Synthese liegen alle Moleküle mit dieser photolabilen Schutzgruppe auf der Oberfläche des Trägers vor (Abb. 4). Nach Aufbringen einer Lochmaske und anschließender Bestrahlung erfolgt eine positionsspezifische Aktivierung durch die Abspaltung der „offen“ liegenden Schutzgruppen im Bereich der Löcher. Die durch die Maske abgedeckten Bereiche werden dagegen nicht aktiviert und somit dem nachfolgendem Kopplungsschritt entzogen.

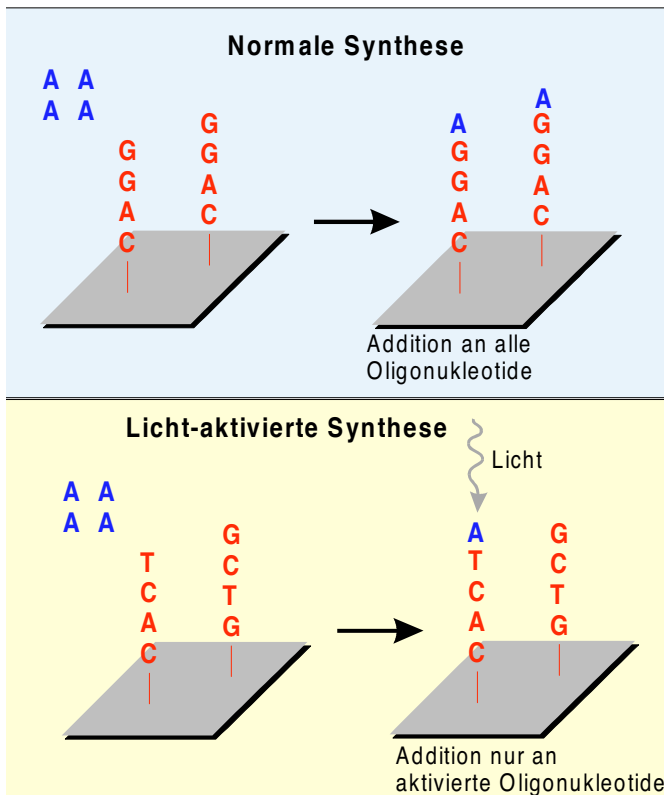
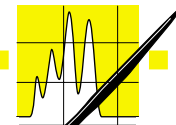
Durch das sequenzielle Aufbringen unterschiedlicher Lochmasken und die nachfolgenden Syntheseschritte können Oligonukleotide von ca. 20–25 Nukleotiden Länge synthetisiert werden. Bei einer erreichbaren Lochgröße von 10  $\mu\text{m}$  können bis 106 Oligonukleotidsonden pro  $\text{cm}^2$  synthetisiert werden.

Eine Beschränkung in der Synthese ergibt sich daraus, dass jeder Schritt lediglich mit einer Kopplungseffizienz von ca. 95 % erfolgt [6]. Rechnerisch ergibt sich, dass bei einer Oligonukleotidlänge von 25 Nukleotiden lediglich ein Drittel der Moleküle der gewünschten Sequenz entsprechen. Durch Optimierungen der Schutzgruppen- und Synthesechemie können inzwischen Kopplungseffizienzen von bis 99 % erreicht werden, jedoch ist die Länge der in situ synthetisierten Oligonukleotide beschränkt.

Der relativ hohe Anteil an verkürzten, nicht erwünschten Abbruchproduk-

Abb. 3: DNA-Mikroarrays. Ausgehend von Sequenzdaten erfolgen die Synthese der DNA-Sonden und die Produktion des DNA-Mikroarrays (Chipvorbereitung). Aus dem zu untersuchenden Testmaterial und einem Kontrollmaterial werden mRNA isoliert, während der cDNA-Synthese mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, vereinigt und mit dem DNA-Mikroarray hybridisiert (Probenvorbereitung). Zur Analyse des Chips wird die Fluoreszenzemission der jeweiligen Farbstoffe mit einem Laserscanner ermittelt und überlagert. In der resultierenden Falschfarbendarstellung repräsentiert ein roter Spot ein stärkeres Hybridisierungssignal der Sonde mit dem Testmaterial, ein grüner dagegen ein stärkeres Signal mit dem Kontrollmaterial. Gelbe Spots repräsentieren eine gleichmäßige Hybridisierung mit beiden Proben (Abb. Röbbé Wünschiers).





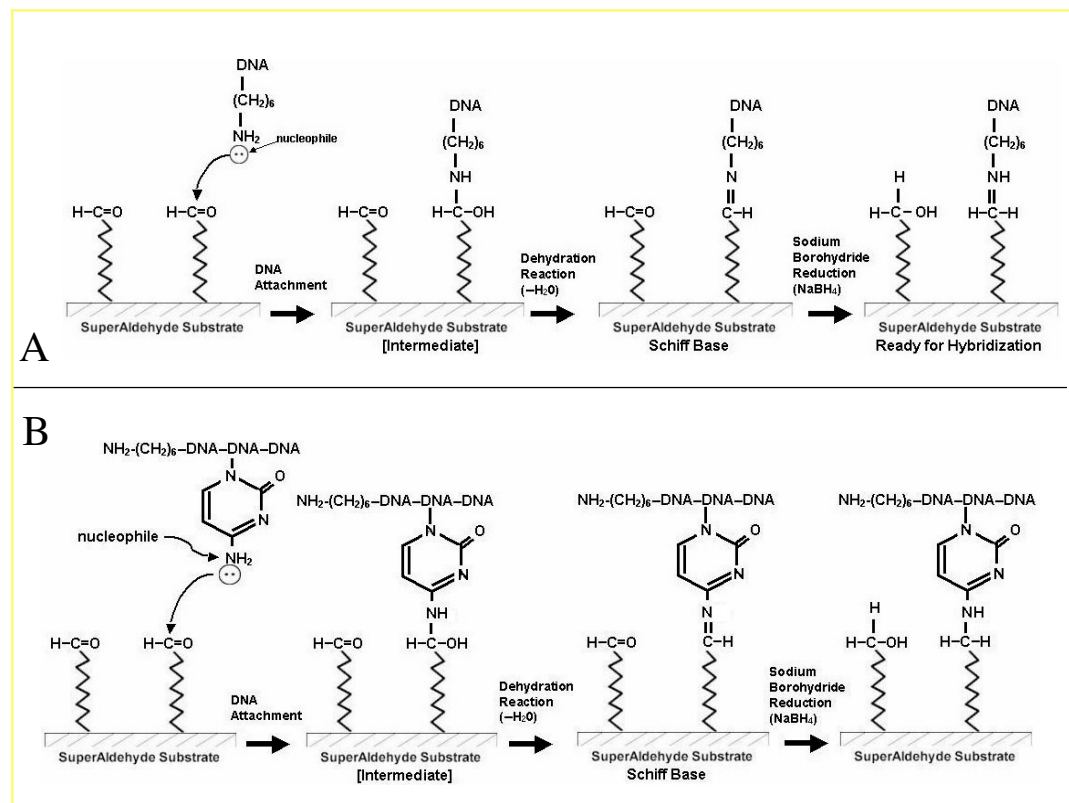
**Abb. 4:** Bei der normalen In-situ-Synthese von Oligonukleotiden auf einer Matrix würden alle DNA-Moleküle dieselbe Sequenz haben (oben). Durch die Lichtaktivierung einzelner Spots können unterschiedliche Oligonukleotide auf einer Matrix synthetisiert werden (Abb. Catherine Wünschiers).

### Transfer von DNA-Sonden auf den Biochip

Ein weit verbreitetes Verfahren ist der aktive oder passive Transfer von DNA-Sonden (Oligonukleotide, cDNAs oder durch PCR Amplifikation erhaltenen DNA-Fragmente) auf definierte Positionen des Arrays [7]. Bei den so genannten Spotting- oder Printmethoden erfolgt das Aufbringen der Sonden nach ihrer Synthese (Oligonukleotide) bzw. nach ihrer PCR-Amplifikation (cDNA-Sonden) an eine aktivierte Trägeroberfläche [8]. Diese Verfahren sind apparativ weniger aufwendig und flexibler einsetzbar als das zuvor beschriebene In-situ-Verfahren zur Herstellung von DNA-Mikroarrays. Zudem bieten sie den Vorteil, dass die DNA-Sonden vor dem Aufbringen auf die Trägeroberfläche aufgereinigt werden können. Insbesondere bei Oligonukleotiden können die aufgrund der nicht

ten der Oligonukleotidsynthese setzt die Qualität bei den nachfolgenden Hybridisierungsexperimenten herab. Um dennoch eine hinreichende Spezifität in den nachfolgenden Hybridisierungsexperi-

menten zu erreichen, verwendet man in der Regel mehrere sich ergänzende Oligonukleotide, die jeweils unterschiedliche Bereiche des zu untersuchenden Gens repräsentieren.



**Abb. 5:** Herstellung von DNA-Mikroarrays. Kopplung von aminomodifizierten DNA-Fragmenten an einen aldehydaktivierten Glas-träger. (A) Nach dem nukleophilen Angriff der Aminogruppe an die aldehydaktivierte Glasoberfläche wird eine Schiff'sche Base gebildet. Anschließend erfolgt die Reduktion mit Natriumborhydrid. (B) Nebenreaktion der aromatischen Aminofunktionen der Guanin-, Cytosin- oder Adeninbasen am Beispiel von Cytosin



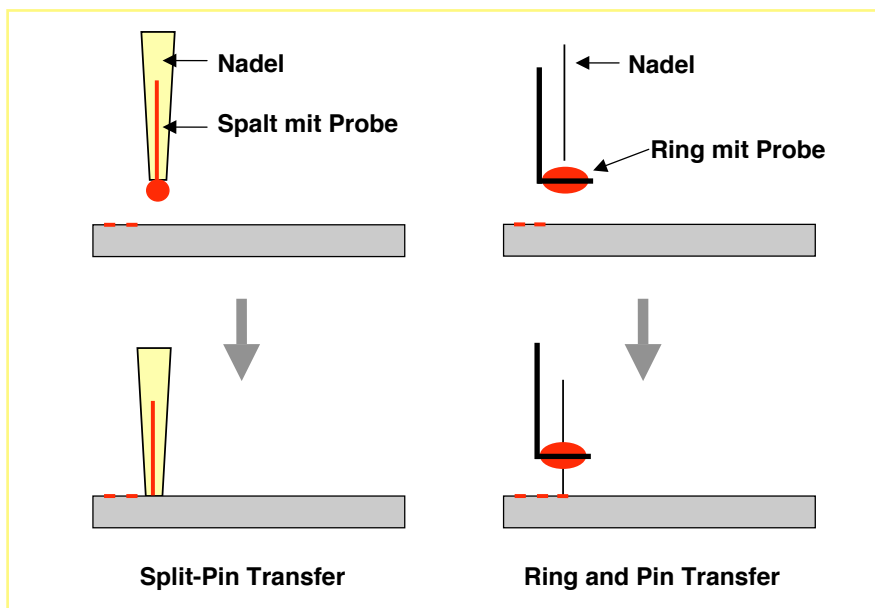


Abb. 6: Schematische Darstellung der Split-Pin- und Ring-and-Pin-Transfer-Verfahren (Abb. Röbbe Wünschiers)

vollständig verlaufenden Kopplungsschritte entstehenden unspezifischen Abbauprodukte entfernt werden, was zu einer höheren Spezifität der Hybridisierung führt.

Bei der Verwendung von DNA-Sonden, die durch PCR-Amplifikation hergestellt wurden, ist eine Aufreinigung zur Entfernung von PCR-Primern und weiteren Reaktionskomponenten erforderlich. Das Aufbringen und die nachfolgende Immobilisierung der aufgereinigten DNA-Sonden erfolgt dann an aktivierten Trägeroberflächen (Tab. 3, Abb. 5). Die Substrate zur Kopplung der DNA-Moleküle an die Trägeroberflächen sind aus jenen Materialien abgeleitet, die bei klassischen Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen in der Säulenchromatographie Verwendung finden. Das Aufbringen der aufgereinigten DNA-Sonden auf die aktivierten Trägermaterialien erfolgt durch den Einsatz spezieller Pipettierroboter.

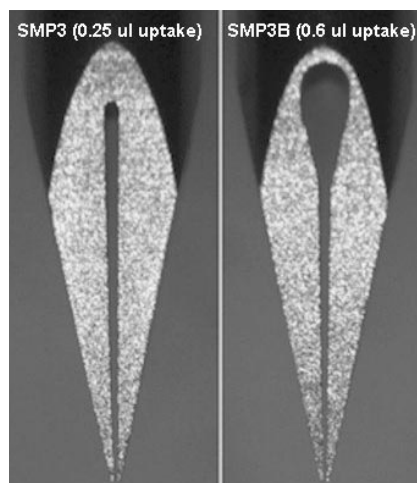
### Spotting-Verfahren

Bei den so genannten Spotting-Verfahren werden die in speziellen Pufferlösungen vorliegenden DNA-Sonden durch eine Nadel oder Kapillare aufgenommen und an einer definierten Position des aktivierten Trägers wieder abgegeben (Abb. 6). Das transferierte Probenvolumen und damit auch die Größe der resultierenden Spots, die wiederum

die Dichte des Arrays beeinflussen, wird durch die Geometrie und Beschaffenheit der Nadel bestimmt (Abb. 7).

Im einfachsten Fall werden „Nadeltools“ mit 96 oder 384 Kapillaren verwendet. Diese erlauben das Dispensieren von Nanolitermengen zur Herstellung von auf Membranen basierenden Arrays mit dann jedoch relativ niedriger Dichte. Höhere Dichten lassen sich mit verfeinerten Spotting-Methoden erreichen (Tab. 2). Bei der Split-Needle- oder der Ring-and-Pin-Methode lassen sich Spotgrößen von ca. 50–100  $\mu\text{m}$  erreichen. Bei einer Packungsdichte

Abb. 7: Originalaufnahmen von Split-Pin-Nadeln. Das Probenaufnahmevermögen beträgt 0,25 bzw. 0,6  $\mu\text{l}$ .



te von ca. 1000 Sonden pro  $\text{cm}^2$  können damit bis zu ca. 19000 Sonden auf einem Glasträger aufgetragen werden. Wie bei einer Schreibfeder wird bei der Split-Needle-Technologie die zu transferierende Lösung in einem feinem Spalt der Nadel durch Kapillarkräfte aufgenommen. Beim Kontakt der Nadel mit dem aktivierten Trägermaterial wird ein Teil der aufgenommenen Flüssigkeit abgegeben und durch Adhäsionskräfte zurückgehalten.

Bei der Ring-and-Pin-Methode erfolgt die Flüssigkeitsaufnahme durch einen Ring, der in die zu transferierende Lösung eintaucht. Durch die Oberflächenspannung der Lösung verbleibt ein Teil der Lösung in diesem Ring (Abb. 6). Die Abgabe der Lösung erfolgt dann durch eine feine Nadel, die durch die im Ring „haftende“ Lösung durchsticht. Ein Teil der Lösung wird dann durch Adhäsionskräfte transferiert und auf der Oberfläche des Trägers abgelegt.

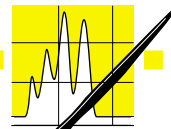
Neben einer hohen Positioniergenauigkeit der verwendeten Roboter wird die Qualität der resultierenden Spots von Umgebungsbedingungen wie der Luftfeuchtigkeit oder Temperatur beeinflusst, die bei Aufbringen der Sonden genau eingestellt werden müssen. Das eigentliche Spotten erfolgt daher in einer abgeschlossenen Kammer.

### Piezoelektrischer Transfer

Ein weiteres Verfahren zum aktiven Transfer der Proben ist der piezoelektrische Transfer (Ink-Jet-Prinzip). Dabei wird die zu transferierende Flüssigkeit zunächst aktiv aufgenommen. Mittels eines Piezoelementes können kleine Mengen (Nanoliter bis 100 Picoliter) der Flüssigkeit auf dem Trägermaterial abgegeben werden. Ein Vorteil dieses Verfahrens gegenüber den zuvor beschriebenen ist die höhere Präzision, die damit erreicht werden kann.

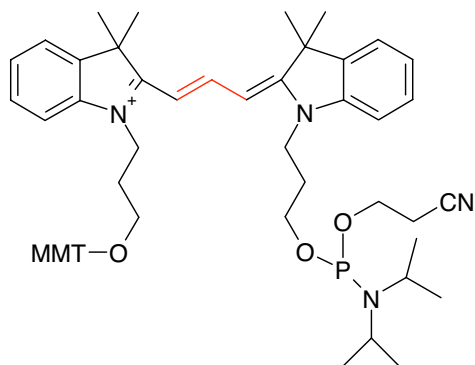
### Herstellung der Hybridisierungsproben, Hybridisierung und Auswertung

Zur Vorbereitung des eigentlichen Hybridisierungsexperimentes wird in getrennten Ansätzen aus dem zu analysierenden (induzierten oder veränder-

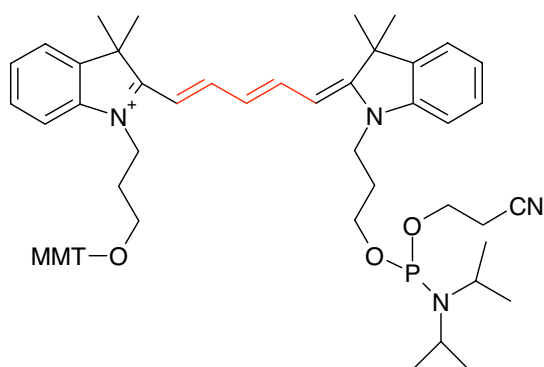


AUFSÄTZE

AUFSÄTZE



**Cy3 (Absorption: 552 nm; Emission: 570 nm)**



**Cy5 (Absorption: 643 nm; Emission: 667 nm)**

**Abb. 8:**  
Strukturformeln  
der Fluoreszenz-  
farbstoffe Cyanin-3  
(Cy3) und Cyanin-5  
(Cy5).  
Cy3 und Cy5 unter-  
scheiden sich le-  
diglich in der An-  
zahl der Kohlen-  
stoffatome in der  
konjugierten Poly-  
en-Verknüpfung  
(rot markiert).  
MMT: 4-Monome-  
thoxytrityl (Abb.  
Röbbe Wünschiers)

ten) Probenmaterial und aus einem Referenzmaterial mRNA isoliert und diese dann in cDNA umgeschrieben (Abb. 1 + 3).

Die Reinheit und Qualität der zugrunde gelegten mRNA ist von entscheidender Bedeutung für das gesamte Experiment [1]. Während der enzymatischen cDNA-Synthese, oder im Anschluss daran, erfolgt eine Markierung der cDNA-Moleküle. Durchgesetzt hat sich die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Cyanin-3 (Cy3) oder Cyanin-5 (Cy5). Bei diesen Farbstoffen handelt es sich um analoge Moleküle mit einer vergleichbaren Fluoreszenzausbeute, jedoch bei unterschiedlichen Wellenlängen (Abb. 8).

Dabei wird die zu untersuchende cDNA-Population mit einem anderen Farbstoff markiert als die Referenz-cDNA-Population. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt zur Entfernung nicht inkorporierter Farbstoffmoleküle werden beide cDNA-Proben mit

dem DNA-Mikroarray in einem kompetitiven Hybridisierungsexperiment hybridisiert. Anschließend werden die Fluoreszenzen der beiden Farbstoffe individuell bestimmt. Dazu werden die Arrays üblicherweise mit einem Laserscanner abgetastet und die resultierende Fluoreszenz wird für jeden der beiden Farbstoffe detektiert. Anschließend werden die für den jeweiligen Farbstoff erhaltenen Bilder per Computersoftware zu einem Bild überlagert.

Vor einer Quantifizierung der Fluoreszenzemissionen erfolgt eine computergestützte Weiterverarbeitung der Rohdaten (Hintergrundkorrektur, Ausschluss von Signalsättigungen, Normalisierung der Fluoreszenz) mit einer Bildverarbeitungssoftware. Anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzemissionen kann nun ermittelt werden, ob die DNA-Sonde beispielsweise stärker bzw. schwächer mit der cDNA des Probenmaterials oder des Referenz-

renzmateriale hybridisiert. Da jede aufgebrauchte DNA-Sonde des Arrays einem Gen des zu untersuchenden Organismus zugeordnet ist, kann man mit dieser Methode Rückschlüsse auf die relative Expression der untersuchten Gene unter den gewählten Bedingungen erhalten.

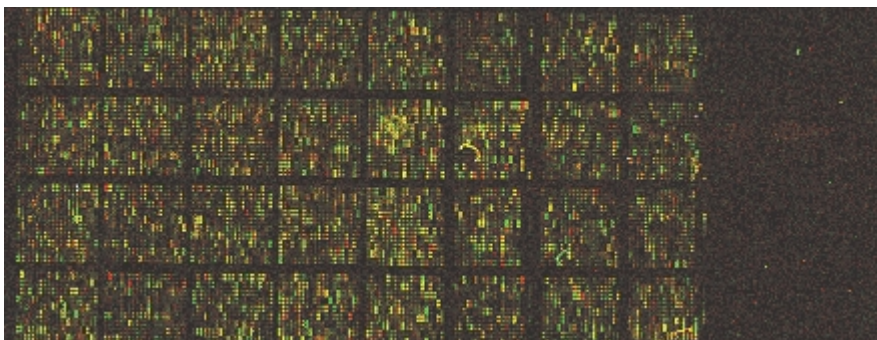
### ■ Anwendungsgebiete von DNA-Mikroarrays

Der Einsatz von DNA-Mikroarrays erlaubt die parallele Analyse einer Vielzahl von bekannten DNA-Sonden und ist grundsätzlich zur qualitativen und quantitativen Analyse zellulärer Regulationsprozesse (Untersuchung von Geninteraktionen, Funktionsanalyse von Genen, Expressionsanalysen) verwendbar. Darüber hinaus kann diese Technologie bei der Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen bzw. beim Verständnis der Wirkung neuer Pharmaka zum Einsatz kommen. Nachfolgend sind einige mögliche Anwendungsgebiete angedeutet.

### ■ Analyse von Punktmutationen, z. B. SNPs

Bei den SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) handelt es sich um einzelne Basenaustausche, die an zahlreichen Positionen eines Genoms vorliegen (ein Austausch pro 500 bis 1000 Basenpaare). Im menschlichen Genom gibt es vermutlich mehrere 3 bis 6 Millionen dieser SNPs.

Die Lokalisation der SNPs im Genom einer Spezies ist identisch, jedoch die Kombination der einzelnen Basenaustausche ist eine individuelle Eigenschaft, die neben weiteren variablen Regionen innerhalb eines Genoms die genetische Vielfalt zwischen den Individuen bestimmt. Nicht nur Eigenschaften, wie Augenfarbe, Blutgruppe oder Körpergröße werden durch diese genetische Variabilität bestimmt, son-



**Abb. 9:** Das Photo zeigt die Falschfarbendarstellung eines DNA-Mikroarrays aus einem Hybridisierungsexperiment. Die kompetitive Hybridisierung erfolgte mit cyanin-3- und cyanin-5-markierten cDNAs (Test und Kontrollmaterial). Nach Fluoreszenzanregung und Detektion wurden die erhaltenen Bilder per Computersoftware überlagert. Punkte mit grüner Farbe repräsentieren ein stärkeres Hybridisierungssignal der mit Cy5 markierten mRNA, Punkte mit roter Farbe ein stärkeres Hybridisierungssignal der mit Cy3 markierten mRNA. Gelbe Punkte repräsentieren ein gleiches Verhältnis von beiden. Die Verhältnisse der Fluoreszenzemissionen für eine immobilisierte Probe erlaubt Rückschlüsse auf die Expression des entsprechenden Gens

dem bestimmte SNPs sind beispielsweise für die individuelle Verträglichkeit bzw. das Ansprechen von Medikamenten verantwortlich. Auch das Risiko, das eine Krankheit zum Ausbruch kommt, wird wahrscheinlich durch SNPs bestimmt. Daher besteht ein verstärktes Interesse an der Lokalisation dieser SNPs und ihrer Analyse. Eine Zielvorstellung ist die Schaffung einer auf einen Patienten individuell maßgeschneiderten Therapie, abgestimmt auf das individuelle SNP-Muster eines Patienten.

Zur Analyse von SNPs können DNA-Mikroarrays verwendet werden. In einem Hybridisierungsexperiment einer Probe mit einem immobilisierten Oligonukleotid werden bei einzelnen Basenaustauschen die Hybridisierungseigenschaften derart geändert, dass eine detektierbare Signalveränderung auftritt und diese Mutationen erfasst werden.

### ■ Molekulargenetische Analyse vor Transplantationen

Im Falle einer Organ- oder Knochenmarktransplantation kann es zu immunbedingten Abstoßungsreaktionen kommen. Die Möglichkeit, zwischen körpereigenem und fremdem Gewebe zu unterscheiden, wird innerhalb eines Organismus durch so genannte Histokompatibilitätsantigene bestimmt. Die entsprechenden Gene sind auf dem Chromosom 6 lokalisiert.

Um bei einer Organtransplantation das Risiko für eine Abstoßung des

Spenderorgans zu verringern, ist eine weitgehende genetische Übereinstimmung dieser Gene zwischen Spender und Empfänger unabdingbar. Neben serologischen und auf der PCR-Reaktion basierenden molekularbiologischen Methoden bietet auch hier die DNA-Mikroarraytechnologie ein mögliches Instrument für eine gezielte Analyse.

### ■ Protein-Mikroarrays

Zwar sind DNA-Mikroarrays kraftvolle Hilfsmittel, um die Expression von Genen zu verfolgen, aber ihr Einsatz beschränkt sich auf die erste Hälfte der Genexpression: den Schritt von der DNA zur mRNA (Transkription). Um jedoch den zweiten Teil beleuchten zu können, den Schritt von der mRNA zum Protein (Translation) und die Interaktion zwischen Proteinen untersuchen können, sind Protein-Mikroarrays notwendig. Mikroarrays also, bei denen Antikörper an eine Matrix gebunden sind und die mit markierten Proteinen hybridisiert werden. Von Protein-Mikroarrays hört man jedoch erstaunlich wenig – erstaunlich, da die Proteinchemie viel älter als die Nukleinsäurechemie ist. Wo liegen die Probleme?

Ein Problem ist, dass DNA-Mikroarrays sehr viel stabiler als Protein-Mikroarrays sind. Die DNA ist ein äußerst stabiles Molekül, wie fossile Funde immer wieder beweisen. Zum anderen ist die Kopplungschemie zur Anbindung von Proteinen an eine Trägermatrix komplexer als für DNA-Moleküle. Ein wesentliches Problem ist die viel

schwächere Signalstärke, die sich bei der Detektion erreichen lässt. Dies liegt an der relativen Größe der Proteinmoleküle. Trotz dieser Probleme erfährt die methodische Grundlage für Protein-Mikroarrays in jüngster Zeit neue Impulse und findet bereits erste Anwendungen [9, 10].

### ■ Ausblick

DNA-Mikroarrays bieten bereits vielfältige Möglichkeiten in der molekulargenetischen Forschung. Um auch in der klinischen Diagnostik Anwendung zu finden, müssen jedoch Maßnahmen zur Qualitätssicherung bzw. eine Validierung der Methoden erfolgen [11]. Nicht nur die Qualität der DNA-Chips (Haltbarkeit von Chips etc., Reproduzierbarkeit der Experimente) sondern auch die dem Experiment zugrunde gelegten Sequenzdaten bzw. Klone aus Genbanken, die Probenvorbereitungsschritte (mRNA-Isolation, Markierungsreaktion), die Hybridisierung und die Auswertung der Ergebnisse sind kritisch zu betrachten.

Durch die Verwendung von vereinheitlichten internen und externen Standards kann ein Teil dieser Probleme gelöst werden. Darüber hinaus werden derzeit auch Richtlinien zur Qualitätssicherung von DNA-Chipanalysen erarbeitet.

### Literatur

- [1] Shena, M (1999) DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press
- [2] Hedge, P et al. (2000) Biotechniques 29: 548.
- [3] O'Donnell-Maloney, MJ et al. (1996) Trends Biotechnol. 14: 401.
- [4] Chee, M et al. (1996) Science 274: 610.
- [5] Fodor, SP et al. (1991) Science 251: 767.
- [6] McGall, GH et al. (1997) J. Am. Chem. Soc. 119: 5081.
- [7] Walter, G et al. (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3: 298.
- [8] Shena, M et al. (1995) Science 270: 467.
- [9] De Wildt, RMT et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18: 989.
- [10] Schaffitzel, C et al. (1999) J. Immunol. Methods 231: 119.
- [11] Halgren, RG et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29: 582.

### Kontakte:

Dr. **Röbbe Wünschiers**, Uppsala University, Dept. Physiol. Botany, EBC, Villavägen 6, SE-75236 Uppsala, wuenschi@yahoo.com  
 Dr. **Thomas Zinn**, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Postfach 101352, D-52355 Düren  
 Dr. **Steffen Borzner**, Philipps-Universität, FB Biologie/Botanik, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35032 Marburg