

## Der Einsatz von Gen-Expressionsanalyse-Arrays für die In-vitro-Diagnostik

Die Bestimmung von Genexpressionsmustern mit Hilfe von DNA-Arrays stellt eine neue Dimension der DNA-Diagnostik dar. Neu ist, dass gleichzeitig und in einer einzigen Analyse sehr viele Parameter (exprimierte Gene) aus einer Probe (Biopsie) eines Patienten innerhalb kurzer Zeit bestimmt werden. Die Analyse beschreibt den Ist-Zustand einer jeweiligen Probe, da sie sowohl genetische als auch epigenetische Einflüsse widerspiegelt. Neben der Prädisposition und den Folgen einer Erkrankung liefert die gewonnene Information oftmals auch die Kausalität der Erkrankung. Die Tatsache, dass bisher DNA-Arrays nicht für die Diagnostik eingesetzt werden, liegt darin begründet, dass gegenwärtig allgemein anerkannte Normierungsverfahren fehlen und sowohl die Arrays als auch die benötigten Apparate für die vollautomatische Analyse nicht den allgemeinen Anforderungen für In-vitro-Diagnostika genügen (vgl. Medizinische Genetik, Biochips für die Medizin. Heft 3, 2000). Dazu gehören: analytische und diagnostische Sensitivität, analytische und diagnostische Spezifität, Richtigkeit, Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Beherrschung der Interferenzen und Nachweisgrenzen, Rückverfolgbarkeit der dem Kontrollmaterial zugeschriebenen Werte. Chip-basierte Diagnostika sind in einem realistischen Zeitraum von 3 Jahren für jene Erkrankungen zu erwarten, bei denen die Entnahme einer Blut- oder Gewebespunde möglich und vertretbar ist, so z.B. bei entzündlichen oder tumorösen Hauterkrankungen, hämato-onkologischen, metabolisch/kardiovaskulären oder immunologischen Erkrankungen.

## Zusammenfassung

DNA-Chips werden bereits seit einigen Jahren als Methode zur Genexpressionsanalyse eingesetzt. Die möglichen Herstellungsverfahren für DNA Chips sind zum Teil sehr unterschiedlich und haben seit Entstehung der Technologie stetig zugenommen. Trotz der Unterschiedlichkeit der verwendeten DNA-Sonden, Substrate und Dispensiertechnologien kann die Herstellung von DNA Chips allgemein in folgende Schritte eingeteilt werden: 1) Sonden-Selektion 2) Sonden-Herstellung 3) Substrat-Herstellung und 4) Sonden-Positionierung. Für diese Produktionsschritte lassen sich allgemeine Aspekte zur Qualitätssicherung nennen, welche darauf abzielen, die Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Bedienerfreundlichkeit und Herstellungskosten des Produktes zu optimieren.

## Schlüsselworte

DNA Chip, Mikroarray, Qualität

## Summary

DNA-Chips have been used for gene expression analysis since several years. There is a steadily increasing variety of options for making microarrays. Though there are great differences among the DNA probes, supports, and spotting technologies used, the production of microarray may be divided into the following steps: i) probe selection ii) probe generation, iii) support treatment, and probe positioning. General aspects of quality control concerning the outlined production steps are

*discussed aiming to optimize the sensitivity, specificity, reproducibility, user friendliness and production costs of microarrays.*

## Keywords

DNA Chip, microarray, quality

DNA Arrays haben sich mittlerweile - nach fast 10 Jahren Entwicklung (Drmanac et al., 1989; Fodor et al., 1991; Khrapko et al., 1989; Maskos and Southern, 1992) - als Methode zur parallelen Expressionsanalyse etabliert (Skena et al., 1995). Zur Herstellung der Arrays werden unterschiedliche Ansätze bezüglich der Sonden, der Sondenherstellung, Sondenpositionierung und Substrate verfolgt, wovon jedoch nur sehr wenige Standards zur Produktion und Qualitätssicherung aufweisen und als Massenprodukt marktreif sind. Als DNA-Sonden werden entweder EST-Klone (Lennon et al., 1996), vorselektionierte cDNA Fragmente (Bosio et al., 1999; Tomiuk and Hofmann, 2001), oder aber 25-80 nt lange Oligonukleotide verwendet (Hughes et al., 2001; Lipshutz et al., 1995). Diese werden entweder mit Hilfe photolithographischer Masken (Lipshutz et al., 1995), digitalen Mikrosiegeln (Singh-Gasson et al., 1999) oder dem Ink-Jet Verfahren (Okamoto et al., 2000) direkt auf der Oberfläche in situ synthetisiert (Hughes et al., 2001) oder aber nach erfolgter Synthese mit Hilfe unterschiedlicher Pin- oder Piezo-Spotter aufgebracht (Therault et al., 1999). Als Substrat werden behandelte Glasoberflächen, Silizium Wafer oder Po-

lymere benutzt. Alle diese Ansätze führen letztlich zum selben Ziel: planare Träger, auf deren Oberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher, aber in Ihrer Position bekannter und adressierbarer (DNA-) Moleküle angeordnet sind. Somit lassen sich die einzelnen Herstellungsverfahren anhand der Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Bedienerfreundlichkeit und Herstellungskosten des Produktes miteinander vergleichen. In diesem Artikel werden einige prinzipielle, für die meisten Herstellungsverfahren gültigen Aspekte der Produktions-Qualitätssicherung genannt.

## Sonden-Selektion

Die Sonden-Selektion ist ein zentraler Aspekt in der Qualitätssicherung der Array-Produktion und wird maßgeblich durch bioinformatische Arbeiten bestimmt. Da der Aufwand zur Qualitätssicherung der Sondenpositionierung und Sonden-Herstellung immens sein kann, wird derzeit die Auswahl und Qualitätssicherung der Klone oftmals von den zur Verfügung stehenden Mitteln und dem Wunsch nach einer möglichst hohen Anzahl an Klonen geleitet. Im einfachsten Fall werden für eine Genanalyse alle Klone einer nicht näher charakterisierten und nicht sequenzierten cDNA-Bank verwendet. Sobald allerdings DNA-Arrays für diagnostische Zwecke oder zur Substanzcharakterisierung („Compound-Profilings“) eingesetzt werden, ist es sinnvoll und ein unabdingbares Qualitätskriterium, möglichst genau charakterisierte DNAs zu verwenden, um die Eindeutigkeit der ausgewählten Sequenzen garantieren zu können.

Ausgehend von EST-Klonen stehen verschiedene bioinformatische Methoden steigender Komplexität zur Prüfung und Auswahl der Sonden zur Verfügung welche an dieser Stelle nicht erschöpfend diskutiert werden können (Brors 2000). Zu den grundlegenden Methoden zählt, dass zunächst die Redundanz einer EST-Klon-Kollektion durch ein „clustering“ der Sequenzen erniedrigt werden kann (siehe z.B. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ UniGene/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/)). Hierbei werden cDNAs mit überlappenden Sequenzen in Gruppen geordnet. Desweiteren können die Sequenz-„cluster“ durch ein „sequence assembly“ zu einer consensus Sequenz zusammengeführt werden. Selbst diese grundlegenden Schritte sind allerdings nicht vollständig und z.T mit unvermeidbaren Fehlern behaftet. So kann das „clustering“ die Redundanz nicht vollständig eliminieren, da z.B. bei einigen Genen der Mittelbereich nicht bekannt ist und somit zwei oder mehr Cluster für ein Gen existieren. Ebenso können aufgrund repetitiver Sequenzen oder chimärer cDNA-Klone (Klone, bei denen im Generierungsprozess zwei unterschiedliche, nicht zusammengehörige cDNAs fälschlicherweise zusammengeführt worden sind) nicht zusammengehörige cDNAs in einem Sequenz-„cluster“ geordnet werden (Tomiuk and Hofmann, 2001). Daher reicht es oftmals nicht, sich auf die Information von EST-Klonen zu verlassen. Bei einer Überprüfung von 1189 cDNA Klonen der IMAGE Consortium mouse cDNA clone collection konnte z. B. gezeigt werden, dass nur ca. 62% der kommerziell vertriebenen EST-Klone einen eindeutigen und korrekten Klon enthalten (Halgren et al., 2001). Auch sequenz-verifizierte Klone sind aufgrund vertauschter Sequenzen, falscher Annotation (Bezug zwischen Genname und Gensequenz) und/oder falsch bestimmter Orientierung in bis zu 30% der Fälle fehlerbehaftet (Knight, 2001). Daher sollte eine Annotation der verwendeten Gene durch mehrere Sequenz- und Datenbankvergleiche erfolgen. Dies gilt unabhängig davon, ob die Klone direkt für die Herstellung von cDNA-Arrays verwendet werden oder ob sie lediglich als Matrize zur Herstellung von Oligonukleotiden dienen. Im Falle der

Oligo-Arrays muss zusätzlich darauf geachtet werden, dass jedes falsch sequenzierte Nukleotid je nach Position und Länge der verwendeten Oligos tiefgreifende Auswirkungen auf die Hybridisierungseffizienz und damit Sensitivität und Selektivität der Arrays haben kann. Es wurde berichtet, dass bei 50-60 nt langen Oligos bereits ein einzelner Basenaustausch 10 Nukleotide vom 5'-Ende des Oligonukleotids entfernt ebenso wie 8 % Sequenzabweichung das Hybridisierungssignal auf 50 % reduzieren kann (Hughes et al., 2001).

Für die Herstellung der Arrays können die vollständigen cDNA-Klone oder aber Fragmente hieraus verwendet werden. Für letzteres spricht die Vermeidung von repetitiven DNA-Elementen (Alu-repeats, microsatellite repeats, SINEs oder LINEs (Jurka, 2000), welche zu unspezifischen Hybridisierungen führen können. Des weiteren sollten durch geeignete Fragmentselektion stark konservierte Bereiche vermieden und Genvarianten beachtet werden, die aufgrund alternativer Polyadenylierungssignale, alternativer Splicesignale sowie alternativer Promotoren entstehen (Tomiuk and Hofmann, 2001).

#### **Sonden-Herstellung**

Nach unserer Erfahrung ist die sicherste aber auch zunächst aufwendigste Methode die de novo Generierung von > 150 – 200 bp langen Sonden mittels RT-PCR und genspezifischen Primern und anschließender Klonierung, Sequenzierung und PCR-Amplifikation der Fragmente. Aufgrund dieser Fragmentlänge ist der Hybridisierungsprozess stabil gegenüber einzelnen Basenaustauschen und sequenz-abhängigen Sekundärstrukturen. Andererseits ist die Fragmentlänge kurz genug, um auch noch stark konservierte cDNAs oder Splice-Varianten in den meisten Fällen unterscheiden zu können. Als alternative Methode werden verstärkt Oligonukleotide eingesetzt. Die Qualität hängt hier maßgeblich von der Reinheit der Produkte ab. Da die Kopplungseffizienz nicht 100% beträgt, nimmt die Ausbeute an Oligonukleotid mit der Länge ab (Pease et al., 1994), so dass unter vertretbarem Aufwand bis zu 80 nt lange Oli-

gonukleotide hergestellt werden können. Werden die Oligonukleotide erst nach Synthese auf das Substrat aufgebracht, so ist eine Abtrennung fehlerhafter Nebenprodukte zwingend. Bei z.B. 98% Kopplungseffizienz und 70 nt beträgt die Ausbeute an Produkt ca. 24%. Werden die Oligos in situ synthetisiert, so kommt hinzu, dass eine nachträgliche Kontrolle und Aufreinigung der Sonden zwar technisch möglich ist aber von kommerziellen Herstellern trotz der damit verbundenen Qualitätsverluste bisher nicht durchgeführt wird (Beier and Hoheisel, 2000; Kwiatkowski et al., 1999). In diesen Fällen wird häufig mit multiplen Sonden je Gen gearbeitet.

#### **Substrat-Herstellung**

Es werden derzeit sehr unterschiedliche Substrate verwendet. Kriterien für die Auswahl eines Substrates sind optische Eigenschaften (Eigenfluoreszenz), mechanische Eigenschaften (Temperaturbeständigkeit, Stabilität), produktionstechnische Eigenschaften (Chargenidentität, Planarität), Oberflächeneigenschaften (Hydrophobizität, Reaktivität) und Herstellungskosten. Die Substrate bestehen aus einer festen Phase und ein oder zwei unterschiedlichen Beschichtungs-Lagen. Die feste Phase kann Silizium, Glas oder ein Polymer sein. Während die Oberflächeneigenschaften (Hydrophobizität, Ladung, reaktive Gruppen) eines Polymers im Produktionsprozess vorgegeben werden können und somit z.T. eine nachträgliche Beschichtung erübrigen, zeichnet sich Glas durch die besseren optischen Eigenschaften aus. Durch die erste Beschichtungs-Lage wird die Oberflächenbeschaffenheit optimiert und Hydrophobizität bzw. Ladung des Substrats (mit)bestimmt. Durch eine zweite Beschichtungslage werden oftmals – wenn nicht schon in der ersten Beschichtungs-Lage vorhanden - reaktive Gruppen und oder Abstandhalter eingeführt. Die reaktiven Gruppen werden benötigt um die Sonden entweder gerichtet über einen Linker oder ungerichtet über die funktionellen Gruppen der Nukleinsäuren an das Substrat zu binden. Eine gerichtete, endständige Kopplung der Sonde – z.B. über eine 5' ständige Aminoalkan-Molekül – hat gerade für kurze

Sonden den Vorteil, dass die Sonde über ihre vollständige Länge für den Hybridisierungsprozess zur Verfügung steht. Weiterhin können über die Länge, die Ladung und die Dichte der Abstandshalter die Dichte und die Hybridisierungseigenschaften der Sonden beeinflusst und kontrolliert werden (Guo et al., 1994; Shchepinov et al., 1997). Diese Vorteile können bei einer unspezifischen Kopplung der Sonde z.B. über ihr Phosphat-Rückgrat und einer positiv geladenen Polylysinbeschichtung mit anschließendem „UV-crosslinking“ nicht genutzt werden. Allen Substraten ist gemein, dass Ihre Qualität neben den produktionsspezifischen Eigenschaften, maßgeblich durch eine möglichst konstante und niedrige Eigenfluoreszenz gekennzeichnet ist. Je niedriger die Eigenfluoreszenz, je höher ist – bei ansonsten vergleichbaren Bedingungen – der dynamische Bereich der messbaren Signale. Die Eigenfluoreszenz hängt wiederum von der Art, der Schichtdicke und der Uniformität der festen Phase bzw. Beschichtung ab. Während die feste Phase über mechanische Messverfahren qualitätskontrolliert werden können sind physikalische Qualitätskontrollen der Beschichtungen nicht trivial (Rasterelektronen und Atomic Force Mikroskopie, Ellipsometriemessungen, Kontaktwinkelbestimmung), da sich oftmals der Brechungsindex der Beschichtung kaum von der festen Phase unterscheidet und zudem die Beschichtungsdicke oftmals geringer ist als die Varianz der Substratdicke. Daher bietet sich die direkte Messung der Eigenfluoreszenz an.

### Sonden-Positionierung

Bei den Spotting Verfahren ist die Qualität des Spotting Prozesses durch die Varianz des dispensierten Volumens und durch die Positioniergenauigkeit zu beschreiben. Bei Hybridisierung der Arrays mit zwei unterschiedlich markierten Proben (z.B. stimulierte Probe gegen Kontrolle) ist aufgrund der Verwendung relativer Signalintensitäten eine geringe Abweichung im Volumen nicht kritisch. Wird dagegen je Array nur eine Probe hybridisiert, so müssen die absoluten Signalintensitäten unterschiedlicher Arrays und damit unterschiedlicher Dispensierereignisse verglichen werden. In diesem Fall hat die aufgetragene Menge einen größeren Einfluss auf das Ergebnis. Zur Aufnahme und Abgabe der cDNA-Lösungen (kontakt- und kontaktlose Verfahren) werden unterschiedliche Technologien genutzt. Nach dem Prinzip des Kontaktverfahrens arbeitende Robotoren verwenden Metall-Nadeln die die zu dispensierende Lösung passiv durch Adhäsion aufnehmen und durch Aufschlagen auf die Substrat-Oberfläche eine mehr oder weniger definierte Flüssigkeits-Menge von ca. 0,5–2 nl abgeben (Bowtell, 1999). Die kontaktlose Dispensiertechnik stellt eine dem Tintenstrahl-Drucker Prinzip nachempfundene Methodik dar. Hierbei wird eine beliebige Menge an Flüssigkeit mit einer Glas oder Silizium Kapillare aktiv durch eine Pumpe aufgenommen und dann in kleinen, definierten Tropfen von 50–500 pl Volumen abgegeben. Die Flüssigkeitsabgabe wird durch ein Piezo-Element

gesteuert, dass nach Spannungsgabe die Kapillare kurzzeitig komprimiert (Theriault et al., 1999). Das kontaktlose Verfahren kann bezüglich seiner Qualität besser überprüft werden, da die Auf- und Abgabe aktiv erfolgt. Sie zeichnet sich auch durch eine höhere Reproduzierbarkeit aus, da wiederum die Abgabemenge eingestellt werden kann, die Probe nicht wie bei den Metallnadeln unterschiedlich stark – in Abhängigkeit von der Verfahrdauer, Umgebungsfeuchtigkeit und -temperatur und Oberflächenbeschaffenheit – eintrocknen kann und die Dispensierdüsen praktisch verschleißfrei sind.

Ungenauigkeiten in der Positionierung können zu Signal- und somit Sensitivitätsverlusten führen. Durch sog. spot-finder Funktionen wird mittels der Bildverarbeitung versucht, leichte Ungenauigkeiten im Raster zu kompensieren. Mit zunehmender Automatisierung der Bildverarbeitung kann dies allerdings leicht zur Verrechnung artifizierlicher Signale führen. Daher sind Positionierungungenauigkeiten von mehr als 10% des Spot-Durchmessers nicht zu tolerieren.

Die Identität der Klone kann nach dem Spotten nur noch mit großem Aufwand festgestellt werden. Der Spotting-Schritt muss daher minutiös dokumentiert werden, es muss ohne Zweifel sichergestellt sein, dass eine bestimmte DNA tatsächlich an der gewünschten Position auf dem Träger transferiert worden ist. Eine automatische Protokollierung der vom Spotter

Anzeige

angefahrenen Positionen und erfolgten Dispensiervorgänge gepaart mit einer Vision-Kontrolle der abgegebenen Spots, trägt hier maßgeblich zur Qualitätskontrolle bei. Zusätzlich erhöht eine Hybridisierung mit Strang-spezifischen Oligonukleotiden die Sicherheit. Für eine nachträgliche Kontrolle müssen die Produktionsplatten, in denen die DNAs für das Spotten vorgelegt wurden, aufbewahrt werden. Für eine statistische Auswertung der Signalintensitäten müssen mehrere Replikate derselben DNA in voneinander getrennten Bereichen des Substrats aufgetragen werden.

Die dargelegten Produktionsprozesse und Qualitätskontrollen verdeutlichen, dass ein hoher Grad an Automatisierung sowie eine zentrale Produktionsdatenerfassung die Grundlage für eine Array-Produktion stabiler Qualität bilden.

Ebenso wichtig für die Aussagekraft der nach einem Experiment erhaltenen Signale, sind neben dem Produktionsprozess auch die Hybridisierung und die Aufnahme bzw. Auswertung der Primärdaten. Auf diesen Themenbereich kann hier nicht näher eingegangen werden, es bleibt allerdings festzuhalten, dass diese Prozesse ähnlich komplex wie die Produktion der Arrays sind aber ebenfalls durch geeignete Kontrollen qualitätsgesichert werden können.

Es ist zweifelsfrei, dass eine Vielzahl von Institutionen und Firmen bereits heute erfolgreich Microarrays zur Analyse komplexer Zusammenhänge der Genexpression einsetzen und eingesetzt haben (Scherf, 2000 #205). Obwohl bei diesen Studien noch nicht von einem Hochdurchsatz an Proben gesprochen werden kann, haben vor allem Technologien zum Erfolg geführt, deren Qualität vergleichsweise einfach und, in Anbetracht der massiv parallelen Natur der Arrays, effizient sicher gestellt werden konnte. Es ist zu erwarten, dass sich dieser Trend auch für die Herstellung von Arrays für die in-vitro Diagnostik fortsetzt und manche auf dem ersten Blick faszinierende Technologien verdrängt werden.

#### Literatur

Beier, M., Hoheisel, J. D. (2000). Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 28, E11.

Bosio, A., Stoffel, W., Stoffel, M. (1999). Device for the parallel identification and quantification of polynucleic acids. In EP0965647: MEMOREC Stoffel GmbH.

Bowtell, D. D. (1999). Options available – from start to finish – for obtaining expression data by microarray [published erratum appears in *Nat Genet* 1999 Feb;21(2):241]. *Nat Genet* 21, 25-32.

Brors, B. (2000). Qualitätsstandards für DNA Chip-Analysen. *medizinische genetik* 12: 301-303.

Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., Crkvenjakov, R. (1989). Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* 4, 114-28.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-73.

Guo, Z., Guilfoyle, R. A., Thiel, A. J., Wang, R., Smith, L. M. (1994). Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res* 22, 5456-65.

Halgren, R. G., Fielden, M. R., Fong, C. J., Zacharewski, T. R. (2001). Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones [In Process Citation]. *Nucleic Acids Res* 29, 582-8.

Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shannon, K. W., Lefkowitz, S. M., Ziman, M., Schelter, J. M., Meyer, M. R., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, Y. D., Stephaniants, S. B., Cavet, G., Walker, W. L., West, A., Coffey, E., Shoemaker, D. D., Stoughton, R., Blanchard, A. P., Friend, S. H., Linsley, P. S. (2001). Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19, 342-7.

Jurka, J. (2000). Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet* 16, 418-20.

Khrapko, K. R., Lysov Yu, P., Khorlyn, A. A., Shick, V. V., Florentiev, V. L., Mirzabekov, A. D. (1989). An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett* 256, 118-22.

Knight, J. (2001). When the chips are down. *Nature* 410, 860-1.

Kwiatkowski, M., Fredriksson, S., Isaksson, A., Nilsson, M., Landegren, U. (1999). Inversion of in situ synthesized oligonucleotides: improved reagents for hybridization and primer extension in DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 27, 4710-4.

Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., Soares, M. B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33, 151-2.

Lipshutz, R. J., Morris, D., Chee, M., Hubbell, E., Kozal, M. J., Shah, N., Shen, N., Yang, R., Fodor, S. P. (1995). Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 19, 442-7.

Maskos, U., Southern, E. M. (1992). Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. *Nucleic Acids Res* 20, 1675-8.

Okamoto, T., Suzuki, T., Yamamoto, N. (2000). Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology [In Process Citation]. *Nat Biotechnol* 18, 438-41.

Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., Fodor, S. P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5022-6.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [see comments]. *Science* 270, 467-70.

Shchepinov, M. S., Case-Green, S. C., Southern, E. M. (1997). Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 25, 1155-61.

Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M. R., Cerrina, F. (1999). Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array [see comments]. *Nat Biotechnol* 17, 974-8.

Theriault, T. P., Winder, S. C., Gamble, R. C. (1999). Application of ink-jet printing technology to the manufacture of molecular arrays, B. D. Hames, ed. (Oxford: Oxford University Press Inc., New York).

Tomiuk, S., Hofmann, K. (2001). Microarray probe selection strategies. Briefings Bioinform submitted.

#### Korrespondenzadresse

Dr. Andreas Bosio  
MEMOREC Stoffel GmbH, Köln  
Stöckheimer Weg 1  
50829 Köln  
Tel. 0049 221 950 4816  
Fax 0049 221 950 4848  
andreas.bosio@memorec.com