

Gen Ekspresyon Analizinde Microarray Teknolojisinin Kullanımı

MICROARRAY TECHNOLOGY FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS

Hayat ERDEM YURTER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Microarray tekniği; ilgilenilen hücreden veya dokudan RNA izolasyonu, komplementer nükleotidler kullanılarak hedef üretimi, işaretlenen hedefin cam/naylona (array) fiks edilen prob ile hibridizasyonu aşamalarından oluşmaktadır. Ekspresyon farklılıkları kontrolle karşılaştırılarak bilgisayar yardımıyla analiz edilmektedir. Bu teknoloji; DNA dizi analizi, mutasyon ve polimorfizm tesbiti, ilaç hedeflerinin tanımlanması, gen ekspresyonu profillerinin oluşturulması, normal ve patolojik durumlarda gen ekspresyon farklılıklarının incelenmesi gibi çok geniş uygulama alanı bulunmaktadır.

Anahtar sözcükler: Microarray, gen ekspresyonu

SUMMARY

Microarray technique requires isolation mRNA from the cells or tissue of interest, creation of complementary nucleotide target and hybridization of the labeled target to gene specific probe affixed to a glass or nylon matrix (the array). Computer-derived differential analysis can be used to determine changes in the expression relative to a control. Microarray technology is used for a wide scope of applications, including sequencing, detection of mutations or polymorphisms, identification of drug targets, gene expression profiling, gene expression patterns normal versus pathological conditions

Key words: Microarray, gene expression

Hayat ERDEM YURTER

Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı
06100 Sıhhye ANKARA
e-mail: herdem@gen.tun.edu.tr

Microarray Teknolojisi

İnsan genom projesinin hedefleri arasında, insan DNA dizisinin tanımlanmasının yanı sıra, fonksiyonel genomik çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Fonksiyonel genomik çalışmalar insan ve model organizmalara ait genlerin baz dizisini taşıyan tam-uzunlukta cDNA setlerinin oluşturulmasını, protein kodlamayan dizilerin fonksiyonlarının araştırılmasını, gen ekspresyonu çalışmalarını, DNA mutagenез çalışmalarını ve protein analizlerini ayrıca bu konularda yeni/hızlı teknolojilerin geliştirilmesini kapsamaktadır (1-3).

Bir organizma içinde bulunan binlerce gen ve bu genlerin ürünleri olan RNA ve proteinlerin ortaklaşa fonksiyon görmeleri hayatın gizemini oluşturmaktadır. Milyonlarca DNA bazının dizilişini bilmek, genlerin ne

yaptıklarını, nasıl çalıştıklarını, hücreden organizmaya giden aşamaları, hastalıkta hangi mekanizmaların değiştiğini, yaşlanmanın nedenlerini, ilaç üretimini vb. öğrenmek anlamına gelmez. Fonksiyonel genomik çalışmalar bu noktada devreye girmektedir. Genlerin bir organizma içinde birbirleriyle nasıl iletişim kurduklarının, birbirlerini nasıl etkilediklerinin anlaşılması çok önemlidir. Bir hücrenin tipi veya içinde bulunduğu evre, o hücrede eksprese olan gen profili yani sahip olduğu genlerin mRNA düzeyindeki değişiklikleri ile belirlenir. Daha önce tanımlanmamış olan birçok genin ekspresyon profili incelenerek ve diğer bilinen genlerin profilleri ile karşılaştırılarak o genlerin olası fonksiyonları hakkında ipuçları elde edilmektedir. Bu bilgiler metabolik yollara ait şemalarla birleştirildiğinde, değişen şartlar altında bu yolların nasıl etkilendiği öğrenile-

bilmektedir. Ancak tüm genleri eşzamanlı olarak çalışabilmek oldukça karmaşık bir olaydır ve geniş kapsamlı teknolojilere ihtiyaç vardır. Fonksiyonel genomik çalışmaların amacı, deneysel ve bilgisayara ait yöntemleri kullanarak mümkün olduğunca çok yapısal bilgi edinebilmek ve bu bilgiden yararlanarak olayların biyolojisini anlamaktır. Bu çalışmalarla bütün genlerin ve fonksiyonlarının bir kataloğu oluşturulabilecek ve böylece hücre ve organizma bileşenlerinin birbirleriyle nasıl ortaklaşa çalıştıkları anlaşılacaktır. Geleneksel moleküler biyoloji metodları ile bir deneyde ancak bir gen analiz edilebilmektedir. Bu nedenle ilgilenilen genin fonksiyonlarını kapsamlı olarak açıklamak üzere yeterli olamamaktadır. Son birkaç yılda araştırmacıların çok ilgisini çeken "DNA microarray" adı verilen yeni bir teknoloji geliştirilmiştir. Bu teknoloji tek bir array üzerinde tüm genomu inceleyebilme özelliğindedir. Araştırmacılara aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisini öğrenebilme imkanı sağlamıştır. Bu teknolojiyi tanımlamak üzere biochip, DNA chip, DNA microarray, gene-array gibi değişik terminolojiler kullanılmaktadır (5-8).

Microarray projesi, NIH (National Institute of Health), NHGRI (National Human Genome Research Center), NCBI (National Center for Biotechnology Information), NCI (National Cancer Institute), NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke), BEIP (Biomedical Engineering and Instrumentation Program) gibi daha birçok enstitü ve bölümün katıldığı ortaklaşa yürütülen bir araştırma projesidir (www.nhgri.nih.gov). DNA mikroarray teknolojisinin önümüzdeki yıllarda genomik araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılacağına ve önemli yararlar sağlayacağına inanılmaktadır (9).

DNA mikroarray yönteminin çalışma prensibi baz eşleşmesi (DNA için A-T ve G-C, RNA için A-U ve G-C) veya hibridizasyondur.

Bir array nükleik asit örneklerinin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmaktadır. Bilinen ve bilinmeyen DNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre hibridizasyonu için uygun bir ortam sağlayarak bilinmeyen DNA'ların tanımlanabilmesi amacıyla kullanılır.

Fikse edilen örneğe ait noktanın büyüklüğüne göre makroarray ve mikroarray olmak üzere ikiye ayrılırlar. 300 mikron ve daha büyük çaplı noktacıklardan oluşan makroarray jelde ve blot tarayıcılarda kolaylıkla görülmektedir. Mikroarraylerde ise örnek çapı 200 mikron dan daha küçüktür bu nedenle bir array üzerinde binlerce örnek bulunabilir. Microarray çalışmalarında özel robotlara ve görüntüleme donanımlarına ihtiyaç vardır.

Microarray yüksek hızda çalışan robotlar tarafından imal edilmektedir. Genellikle cam bazen de naylon yüzeyler üzerine DNA dizisi bilinen probalar dizilir. Cam yüzeyin naylon ve nitroselüloz filtrelerle göre avantajları vardır. Örneğin, deneyi minyatürize eder, floresan boyaların kullanımına imkan verir, yüzey sert olduğu için örnek diffüze olmaz böylece lazer analizine imkan sağlar. Microarray oluşturulurken cam yüzey; nötral pH'da DNA ile iyonik bağ oluşturan silan, DNA'ya non -kovalent/geri dönüşmez şekilde bağlanan nitroselüloz-temelli polimer veya polilizin ile kaplanabilir. Bu kaplama ile DNA örnekleri cam yüzeyde fikse edilmektedir (10,11).

Microarray iki şekilde üretilebilmektedir.

1. **Fotolithografi:** Bilgisayar chip endüstrisinde çok kullanılan ve iyi bilinen bir yöntemdir. Silikonize edilmiş olan cam yüzeyde oligonükleotid sentezi gibi bir fotokimyasal reaksiyon gerçekleştiği sırada ultraviyole ışık kaynak olarak kullanılır. Bir engelden geçirilen bu ışık aşamalı olarak reaksiyonu devam ettirir. Bu engelde, birkaç mikrometre genişliğinde ve camın cm²'sinde birkaç yüzbin probun yer alabileceği açıklıklar vardır. Ancak bu insitu sentez teknolojisinin dezavantajı 25 nükleotid uzunluğu ile sınırlı olmasıdır (12,13).
2. **Mekanik fiksasyon:** Ink-jet veya XYZ ekseninde hareket kontrolü olan bir cihaz yoluyla örneklerin fiziksel olarak yüklenmesidir. Bu yöntemde, yüzeyle direkt olarak ilişkili olunması ve çok küçük miktarlarda sıvı kullanılması nedeniyle buharlaşma ve kontaminasyon problemleri görülebilmektedir (14).

Kullanılan baz dizisinin özelliğine bağlı olarak iki tip array vardır. Birinci tipte, 500-5.000 baz uzunlu-

ğündeki cDNA problemleri robotlar aracılığı ile cam gibi katı yüzeylere tutturulur. Bir seri hedef teker teker veya karışım halinde bu yüzeye uygulanır. Stanford Üniversitesi'nde geliştirilmiş olan bu yöntem "geleneksel DNA microarray" olarak kabul edilmektedir. İkinci tüpte, 20-80 mer oligonükleotid veya peptid nükleik asit (PNA) problemler sentezlenerek dizilirler. Array işaretli DNA ile hibridizasyona sokularak komplementer dizilerin varlığı/miktarı tanımlanır. Bu yöntem fotolithografik özellikli ürünler üretmek için satan Affymetrix Inc. tarafından geliştirilmiştir (15).

Karşılaştırmalı gen ekspresyonu çalışmaları ile kanser/tümörlerde kopya sayısındaki değişiklikler, tüm genomu yayılabilecek amplifikasyonlar ve delesyonlar çalışılabilir ve kopya sayısı değişimlerinin gen ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırılabilir. Karşılaştırmalı gen ekspresyonu çalışmasını örnek olarak DNA microarray teknolojisini basamaklar halinde kısaca açıklayalım (16-19):

1. Hücre popülasyonu seçimi: Dokuya özgül genleri, kanserde regülatör genlerin hatalarını, çevresel değişikliklere verilen hücresel yanıt ve hücre döngüsündeki değişiklikleri çalışabilmek gibi birçok amaçla farklı hücre grupları seçilebilir. Klonlanmış hücre hattı, maya vb. homojen hücre popülasyonu çalışmaları doku biyopsisi gibi birçok hücre tipini (epitel, endotel, sinir, kas, bağ doku hücreleri) bulunduran örneklerin çalışmalarından daha kolaydır. Biyopsi gibi karışık örneklerde LCM (Laser capture microdissection) ile özgül hücre tiplerinin ayrılması gerekmektedir. Ancak bu yöntem zaman alıcı olmasına rağmen mRNA'ların degrade olmaması için hızlı olmak zorundadır (20-22).
2. mRNA saflaştırılması ve revers transkripsiyon: Bir hücredeki RNA'ların yaklaşık olarak %3'ünü oluşturan mRNA 1-2 mikrogram olacak şekilde saflaştırılır. Kırılgan bir molekül olan mRNA daha dayanıklı cDNA molekülüne revers transkripsiyonla çevrilir. Bütün mRNA'lar aynı verimlilikle cDNA'ye çevrilemezler. Aynı mRNA'yı değişik hücrelerde karşılaştırırken problem oluşturmasa da

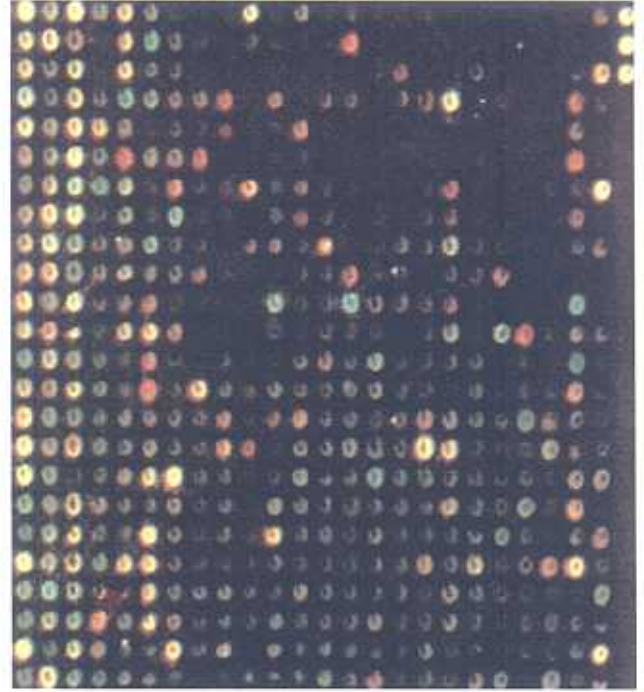
farklı mRNA'ların kantitatif çalışmalarında bu olay karışıklık yaratabilmektedir. Bazı RNA'ların ise sadece bir kısmı cDNA'ya çevrilebilmekte ve tam olmayan bu sentez arraye bağlanmasını bozmaktadır. Bu problemi uçtan yapılan sentez yerine rastgele primerlerle yapılan cDNA sentezinin uygulanmasıyla çözülmektedir. Ancak bu da gereksiz olarak tRNA ve rRNA'nında örnekte yer almasına neden olmaktadır.

3. cDNA'nın floresan işaretlenmesi: Microarraye bağlanan cDNA'nın görülebilmesi varlığını belli eden bir "reporter" molekülle işaretlenmesine bağlıdır. İncelenen örnek 2 örnek farklı boylarla boyanır. Bu boyalar genellikle floresan özelliği olan rodamin/floresin veya Cy3/Cy5 dir.
4. DNA microarray ile hibridizasyon: Array üzerinde bulunan binlerce farklı DNA dizisi üzerine, laboratuvarında hazırlanmış olan cDNA'lar uygulanır. cDNA komplementerini bulduğu noktada hibridizasyon yapar ve floresan sayesinde bu noktayı görünür kılar. Array üzerindeki her bir nokta ayrı bir deney olarak yorumlanır. Tüm genom dizisinin tamamı çıkarılmış olan organizmalarda (bazı bakteriler ve *S.cerevisiae* adlı mayada) bilinen her genin genomik DNA'sını ve olası ORF (open reading frame) yapısını çalışmak mümkün olmaktadır. Total genomik DNA izole edildikten sonra PCR ile çoğaltılır ve böylece sınırsız sayıda array hazırlanması mümkün olur. Örneğin, *S. cerevisiae* nin tüm genleri (Yaklaşık olarak 6100) tek bir microarray üzerinde toplanabilmektedir.
5. Hibridize edilen arrayin taranması: Tarama okuyucu denilen sistemle yapılır. Okuyucu, bilgisayarla kontrol edilen "inverted scanning fluorescent confocal" mikroskoptur ve lazerle çalışmaktadır. Proba bağlanmış olan floresan işaretli moleküller lazerle stimüle edildiklerinde ışımaya yaparlar. Array tarayıcının amacı, komplementer noktalara bağlanan probun yaydığı ışını tesbit etmektir.

6. Taranan görüntünün yorumlanması: Floresan boya rengi olarak kırmızının, yeşilin ve sarının (Kırmızı+yeşil=sarı) yoğunlukları ölçülerek değerlendirmeler yapılır (Şekil 1). Sarı noktalar her iki hücre grubunda da eşit miktarda cDNA bağlandığını göstermektedir. Bir noktada saptanan floresan yoğunluğu o hücre tipinde bulunan mRNA yoğunluğunu belirtmektedir. Düzensiz noktalar, özgül olmayan hibridizasyon, slayt üzerine toz bulunmasında sinyal verebilir ve yoğunluk farkına karar veremeyi zorlaştırır, kalibrasyon problemleri yaşanabilir. Bu nedenlerle microarray sonuçlarının yorumlanabilmesi için birçok yazılım paketi hazırlanmıştır. Böylece eksprese olan genlerin hepsi tanımlanabilmesi bile hücre tiplerini belirleyebilecek ekspresyon profili adeta bir "fingerprint" olarak kullanılabilir.

Şekil 2'de microarray tekniğinin gen ekspresyon analizi amaçlı kullanımı basamakları halinde gösterilmiştir.

Microarray teknolojisinde hassas noktaların başında standardizasyon gelmektedir. Her amaca uygun bir "gold standard" yoktur. Affimetrix arraylerde genellikle her bir gen için 20 prob bulunmaktadır. Standardizasyon için aktin/ GAPDH gibi genlerin ekspresyon düzeyleri kullanılır veya array üzerinde her gen için aynı bir yoğunluk belirleyici (150U/gen) uygulanır ve standardizasyon ona göre yapılır. Diğer arraylerde (siparişe dayalı cDNA veya oligo) standardizasyon daha önemli bir sorundur. Standart, deneyin amacına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin meme kanser hücreleri çalışırken kullanılan standart meme kanser hücre hatlarının bir kısmını olmalıdır (23). Kendi arrayini üreten laboratuvarlar her üretimlerinde farklı genleri ve ekspresyon düzeylerini kontrol olarak kullanırlar. Bu nedenle farklı laboratuvarlardan gelen verileri karşılaştırmaya zorluğu yaşanmaktadır. Sıklıkla Northern blot, real-time PCR, immün boyama gibi yöntemlerle sinyallerin doğruluğunu kontrol etmek gerekmektedir.



Şekil 1. Microarray görünümü (Her bir noktacığın rengi ve yoğunluğu, incelenen örneğe ait özgül bir gen bilgisi vermektedir).

Microarray uygulamaları

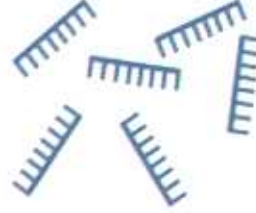
Mikroarray teknolojisinin 2 ana uygulama alanı vardır. Bunlardan ilki yeni baz dizilerinin belirlenmesi, ikincisi ise genlerin ekspresyon düzeylerinin saptanmasıdır. Binlerce transkriptin aynı anda incelenebilmesi yeni ağlar bulunmasına ve eksprese olan gen profillerinin çıkarılmasına imkan verir. Microarray teknolojisinin kullanıldığı belli başlı alanlar aşağıda gösterilmiştir (24,25).

1. Kompleks genetik hastalıkların araştırılması
2. İlaç geliştirme ve toksikoloji çalışmaları
3. Mutasyon/Polimorfizm saptanması (SNP's)
4. Patojen analizleri
5. Hastalık durumlarında genlerin ekspresyon değişiklikleri
6. Dokular arasında gen ekspresyon farklılıkları
7. Koruyucu tıp
8. Hastalıkların alt gruplarını saptamak ve semptom görülmeden önce o hastalığın tedavisi için kullanılacak olan ilaçların üretimi
9. Populasyona (genotipe) hediyeleşmiş ilaçlar
10. Genetik testler

a.İlgilenilen gen tanımlanır.



b.Gen bankasından tam/kısmen baz dizisi tanımlanmış olan cDNA klonları sağlanır veya bilinen dizilerin sentetik oligonükleotidleri üretilir.



c.Gene özgül polinükleotid cDNA'lar (20-80 mer).

d.Polinükleotid cDNA'lar robot ile cam/membrana tutturulur. Pozitif kontrol olarak "house-keeping" genlerin veya bilinen miktarda RNA taşıyan genlerin cDNA'ları kullanılır.



e.Tek bir array 100-birkaçbin noktaya taşıyabilir.



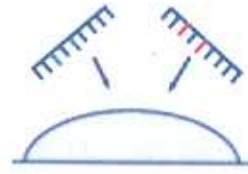
f.İlgilenilen dokudan veya hücreden mRNA elde edilir.



g.Fluoresan bağlı nükleotidler (örneğin kırmızı) kullanılarak mRNA cDNA'ya çevrilir. Kontrol mRNA yeşil floresan bağlı nükleotidler kullanılarak cDNA'ya çevrilir.

Gen ekspresyon analizinde microarray teknolojisinin kullanımı

g. Floresan ile işaretli cDNAlar array üzerinde bulunan cDNA ile hibridize edilir.



h. Kontrol DNA ve analiz edilen cDNA lazer ile incelenir.

i. "Scanning confocal" mikroskop kullanılarak emisyon spektrumları ölçülür.

k. Emisyon spektrumları yazılım yardımıyla değerlendirilir ve array üzerinde renk oluşumuna çevrilir. Örnek ve kontrol verileri birbiri üzerine çakıştırılarak her noktadaki yeni bir renk vermeye sağlanır.

j. Her bir noktadaki ait veri gen adı, klon adı, yoğunluğu, yoğunluk oranı (örneğin kırmızı/yeşil) standard sabiti, güven aralığı olarak depolanır.

k. Kırmızı/yeşilin yoğunluk oranı:

= 1 gen ekspresyonunda değişiklik yok

>1 gen ekspresyonunda artma

<1 gen ekspresyonunda düşme



Şekil 2. Microarray teknolojisinin gen ekspresyon analizi amacıyla kullanımı

İnsanlarda hastalıklarla ilişkili olan değişiklikleri tanımlamak üzere birçok çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla hastaya ait klinik örnekler, insan hücre hatları ve bazı durumlarda hastalığın hayvan modelleri kullanılabilir. Doku biyopsileri kullanılarak meme kanseri, kolon kanseri ve aterosklerozda klinik örneklerle çalışmalar yapılmıştır. Meme kanseri örneklerinde ve hücre hatlarında 5000 gen bulunduran array kullanılmış ve proliferasyonla ilişkili ve agresif meme tümörlü örneklerde transkripsiyonu arttıran bir "gene cluster" bulunmuştur. Benzer bir çalışmada, ribozomal proteinlerle homolog olan 48 EST kullanılmış ve tümör dokusunda bir değişiklik saptanmamıştır. Bir başka çalışmada ise cerrahi sırasında insan karotis arterinden ateroskleroz örnekleri alınmış ve Affimetrix array ile incelenmiştir. Hastalarda Egr-1'in (Early growth response gene) 5 kat arttığı bulunmuştur. Bu genin ürünü bir DNA bağlanan

protein olup büyüme faktörü, sitokin, adhezyon molekülleri ve pıhtılaşmayla ilişkili proteinlerin transkripsiyonunu etkilemektedir (25,26-28).

Hücre hatları; kanser, oftalmoloji, merkezi sinir sistemi gibi farklı alanlarda kullanılmıştır. Ayrıca hücre hatlarında, sitokinlerin, sitomegalovirus enfeksiyonunun, onkogen transfeksiyonunun etkilerini araştırmak üzere array kullanılmaktadır (30-32). Örneğin insan fibroblastları sitomegalovirus ile enfekte edilip, 24 saat içinde 6000 genin ekspresyonunu nasıl etkilendiği çalışılmıştır (30). 258 genin 4 katından daha fazla arttığı bulunmuştur. Örneğin sitotoksik T lenfositlerine karşı korunmayı sağlayan HLA-E 6 kat, bir otoantijen olan RO/SSA 12 kat, anasidonik asitten prostoglandin sentezinde rol alan bazı bileşenlerin 4 kattan daha fazla arttığı bulunmuştur. Bir başka çalışmada insan fibrosarcom hücre hattı olan HT 1080 interferon alfa,

beta ve gama ile muamele edilmiş ve apoptosisle ilgili genlerin arttığı saptanabilmektedir (31).

Önce hayvanlarda olmak üzere insanlarda ilaçların gen ekspresyonunu nasıl etkilediğini takip etmek ve ilaçların yan etkilerini öğrenmek amacıyla toksikoloji konusunda microarray teknolojisinden beklentiler büyüktür (36,37). Ancak çalışmalar başladıktan sonra basit bir sistemde bile nedeni açıklanamayan RNA düzeyleri saptanmış ve sonuçların beklenilenden çok daha karmaşık olduğu anlaşılmıştır. Küçük dozlarda bile B-naphthoflavone tedavisinin sitokromları arttırdığını ve xenobiotic metabolize edici enzimler, glutasyon düzenleyicileri, DNA tamir enzimleri, heat shock proteinler ve housekeeping genlerinin karaciğerdeki ekspresyonlarında değişiklikler yarattığını göstermiştir. Ensefalomiyopati, lenfoma, böbrek tübül hastalıkları, akciğer fibrozu gibi birçok hastalıkta hayvan modelleri oluşturulmuş ve microarray analizleri için kullanılabilir (34,36,38-40).

Hastalıkların sınıflandırılmasında microarray teknolojisinin gücü büyüktür. Örneğin, hematolojik malignansilerle yapılan bir çalışmada 6817 gen bulunan bir array üzerinden seçilen 50 gen analiz edilmiş ve lösemiler ALL ve AML olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada 36/38 hasta doğru olarak sınıflandırılabilmiş 2 hasta ise belirsiz kalmıştır. İncelenen 50 genin bir kısmı AML ve ALL ayırımında kullanılan genlerdir bir kısmı ise yeni tanımlanmıştır. Bir başka çalışma B hücre lenfomalarının ayırımında başarılmıştır. Oluşturulan lenfochip üzerinde bulunan 17856 gen ile B hücrelerinin farklılaşma evreleri açıklanarak bu analiz yapılabilmektedir. (41,42)

Çok yeni ve ümit verici olan microarray teknolojisinin önümüzdeki yıllarda yaygın olarak kullanılacağına ve genlerin fonksiyonları/regülasyonlarına ilişkin önemli bilgiler sağlayacağına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Shoemaker DD, Schadt EE, Armour CD, et al. Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature*. 2001;409:922-927.
2. Celis JE, Krühoffer M, Gromova I, et al. Gene

expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA micro-arrays and proteomics. *FEBS Letters* 2000;480:2-16.

3. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405:827-836.
4. Hunt SP, Livesey FJ. *Functional genomics*. Oxford University Press. First Edition 2000; 113-137.
5. Lander ES. Array of hope. *Nature genetics* 1999;21:3-4.
6. Duggan D, Bitter M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature genetics* 1999;21:10-14.
7. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature genetics* 1999;21:33-37.
8. Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature genetics* 1999;21:42-47.
9. www.nhgri.nih.gov
10. Southern E, Mir K, Shepchinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics* 1999;21:5-9.
11. Beier M, Hoheisel JD. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Res* 1999;27: 1970-1977.
12. Pease AC, Solas D, Sullivan FJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:5022-5026.
13. Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 1995;19:442-447.
14. Lockhart DJ, Dong H, Bryne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996;14: 1675-1680.
15. www.gene-chips.com
16. www.es.wustl.edu
17. www.aat.array.com
18. www.gmf-microarray.ed.ac.uk
19. DeRisi J, Penland I, Brown PO, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer 1996;14:457-460.
20. Sgroi DC, Teng S, Robinson G, et al. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res* 1999; 59:5656-5661.

21. Luo L, Salunga RC, Guo H, et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 1999;5:117-122.
22. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, et al. Laser capture microdissection:molecular analysis of tissue. *Science* 1997;278:1481-1483.
23. Perou CM, Jeffrey SS, Van De RM, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9212-9217.
24. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, et al. Genome wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;23:41-46.
25. Gerry NP, Witowski NE, Day J, et al. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol* 1999;292:251-262.
26. Alon U, Barkai N, Notterman DA, et al. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6745-6750.
27. Khan J, Bittner ML, Chen Y, et al. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochim Biophys Acta* 1999;1423:17-28.
28. Hiltunen MO, Niemi M, Yla-Herttuala S. Functional genomics and DNA array techniques in atherosclerosis research. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:515-519.
29. McCaffrey TA, Fu C, Du B, et al. High level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* 2000;105:653-662.
30. Zhu H, Cong JP, Mamtora G, et al. Cellular gene expression altered by human cytomega-lovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 14470-14475.
31. Der SD, Zhou A, Williams BR, et al. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha,beta or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15623-15628.
32. Khan J, Bittner ML, Saal IJL. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13264-13269.
33. Gonzalez P, Epstein DL, Borrás T. Characterization of gene expression in human trabecular meshwork using single-pass sequencing of 1060 clones. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:352-361.
34. Ross DT, Scherf U, Eizen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000;24:227-235.
35. Scarlato M, Beesley J, Pleasure D. Analysis of oligodendroglial differentiation using cDNA arrays. *J Neurosci Res* 2000;59:430-435.
36. Bartosiewicz M, Trounstein M, Barker D, et al. Development of a toxicological cDNA array and quantitative assesment of this technology. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:66-73.
37. Morton MJ, De Risi JL, Bennet HA, et al. Drug target validation and identification of secondary drug target affects using DNA microarrays. *Nat Med* 1998;4:1293-1301.
38. Takenaka M, Imai E, Nagasawa Y, et al. Gene expression profiles of the collecting duct in the mouse renal inner medulla. *Kidney Int* 2000;57:19-24.
39. Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1778-1783.
40. Scherf U, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000; 24:236-244.
41. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer:class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-537.
42. Alizadeh AA, Eizen MB,Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.