

Microarrays: verschuiving van doe-het-zelf naar kant-en-klaar

Kleinere chips met grotere mogelijkheden

De tien jaar oude microarray techniek is volop in ontwikkeling. Fabrikanten kunnen steeds meer genen aanbrengen op een chip en ontdekken steeds weer nieuwe toepassingsmogelijkheden. Daardoor wordt het wel steeds lastiger om experimenten helemaal zelf uit te voeren. Maar de grootste uitdaging blijft de data-analyse achteraf.

Door Els van den Brink, gepubliceerd in Laboratorium Magazine van september 2006.

Op microscopisch niveau lijkt een DNA microarray op een borstel, waarbij DNA-stukjes - oligonucleotides of probes- als borstelharen zijn verbonden met een plaatje van glas, plastic of silica. Stukjes DNA of RNA, gelabeld met een fluorescente marker in verschillende kleuren, kunnen binden aan de overeenkomstige oligonucleotides op de array. Door het meten van de fluorescentie is eenvoudig te bepalen waar de verschillende stukjes DNA of RNA gebonden zijn en in welke hoeveelheden. De microarray is vooral bekend van het analyseren van de genexpressie. Daarbij vergelijken onderzoekers bijvoorbeeld de hoeveelheid RNA in ziek en gezond weefsel om te bepalen welke genen in het zieke weefsel meer of minder tot expressie komen.

Markt in ontwikkeling

De microarray technologie begint zo langzamerhand een standaardtechniek te worden. Toch is de techniek niet veel ouder dan een jaar of tien. In 1995 publiceerde Mark Schena voor het eerst een artikel over een microarray-analyse van 45 verschillende genen. In de loop der jaren is de techniek steeds verder ontwikkeld. Producenten kunnen steeds meer probes aanbrengen op één kleine chip. Affymetrix verkoopt tegenwoordig zelfs arrays met 6,5 miljoen probes, elk op een spotje van 5 μ m. En waarschijnlijk is de grens daarmee nog steeds niet bereikt.

Standaardtechniek of niet, de microarray-technologie is nog volop in ontwikkeling. Door het toenemende aantal probes per chip zijn er steeds betere scanners nodig om ze te meten en steeds betere software voor de analyse. Bovendien is de genexpressie-analyse ondertussen nog maar een van de vele toepassingsmogelijkheden. Daardoor groeit de markt voor microarrays economisch gezien nog steeds. In 2004 ging er in deze markt wereldwijd ongeveer 1,38 miljard dollar om, dus ruim 1 miljard euro. In 2008 is dat naar verwachting gestegen tot 1,86 miljard dollar, oftewel een stijging met vijftig procent! (bron: Strategic Directions International).

Hoofdrospelers

Op de microarray-markt zijn heel wat bedrijven actief (zie kaders). De overduidelijke marktleider is Affymetrix. Volgens een analyse van twee jaar geleden heeft die een kwart van het marktaandeel in handen. De overige spelers moeten genoegen nemen met een marktaandeel van hooguit enkele procenten. Agilent is daarvan een van de grotere, maar verder is de onderlinge rangorde niet echt duidelijk. Volgens Johan den Dunnen, hoofd van het Leiden Genome Technology Center (LGTC) binnen het LUMC en contactpersoon van het ArrayNL-platform, is vooral Illumina een opvallende speler, die

duidelijk in de lift zit. Dat heeft te maken met hun lage prijzen, ongeveer de helft van die van Affymetrix.

Sommige bedrijven, zoals Affymetrix en Agilent, bieden het complete pakket voor de microarray-gebruiker. Dit loopt van printapparatuur tot de benodigde reagentia. Anderen hebben een beperkter aanbod (zie kader 'Applicaties en specialisaties'). Molecular Devices heeft bijvoorbeeld alleen de benodigde scanners in de aanbieding. De meeste bedrijven leveren een systeem dat vergelijkbaar is met de producten van marktleider Affymetrix. Die systemen zijn daardoor onderling uitwisselbaar. Een aantal bedrijven heeft echter een eigen uniek systeem ontwikkeld. Illumina heeft bijvoorbeeld speciale bead- ofwel kralen-arrays ontworpen. De probes zijn niet verbonden met een glasplaatje, maar met duizenden kleine losse bolletjes.

Hollands glorie

In Nederland zijn alleen enkele kleinere bedrijven bezig op het terrein van microarrays. Kreatech ontwikkelt bijvoorbeeld speciale fluorescente labels. PamGene heeft flow-through microarrays ontwikkeld, waardoor de hybridisatie binnen vijftien minuten kan gebeuren in plaats van overnacht. Recent is FlexGen van start gegaan met de ontwikkeling van een instrument voor de productie van arrays-on-demand. Nimblegen produceert op dit moment zulke arrays, waarvoor onderzoekers zelf elke willekeurige DNA-sequentie kunnen aanleveren om arrays mee te laten maken. FlexGen wil niet alleen zulke arrays leveren, maar ook de apparatuur waarmee onderzoekers deze arrays zelf kunnen maken. Aan de diagnostische kant is Agendia actief, dat microarrays verkoopt om de prognoses bij borstkanker vast te stellen.

SNP- en CGH-arrays

Genexpressie analyse is dus slechts een van de vele toepassingsmogelijkheden van microarrays. Ze zijn bijvoorbeeld ook geschikt om verschillen in de genen zelf te bepalen, op allerlei niveaus. Bij *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)-arrays gaat het om zeer kleine verschillen in het DNA, terwijl *Comparative Genomic Hybridization* (CGH)-arrays geschikt zijn voor de analyse van DNA op verlies en verdubbelingen (*copy number*-variaties). Zo is bijvoorbeeld te bepalen of bepaalde genen te weinig of juist te vaak voorkomen in een cel. In principe is dat ook mogelijk met SNP-arrays. Nimblegen en Affymetrix bieden daarnaast ook nog arrays voor *Comparative Genome Sequencing*, door anderen ook wel resequencing genoemd. Daarbij wordt niet alleen vastgesteld welke genen afwijkend zijn, maar kan ook direct worden vastgesteld wat die afwijking precies is.

Een alternatieve toepassing is de *chromatin immunoprecipitatie* (ChIP). Hier draait het erom de bindingsplaatsen te bepalen op het DNA van eiwitten, zoals polymerases en transcriptiefactoren. Naast arrays met het complete genoom zijn daarvoor ook arrays op de markt met alle promotor-regio's, waar dit soort eiwitten vaak aan binden.

Variaties

Eén van de nieuwste varianten van expressie-arrays is de *splice-array*. Dat heeft te maken met 'alternative splicing', een proces waarmee een gen op verschillende manieren kan worden afgeleze. Dit geeft verschillende eiwitten als resultaat. Exons, stukjes DNA die er later weer tussenuit geknipt worden, staan centraal bij deze techniek. Splice-arrays worden bijvoorbeeld aangeboden door Jivan in samenwerking met Nimblegen, en door ExonHit in samenwerking met Agilent. Affymetrix biedt hiervoor sinds kort een 'whole genome exon array' aan, met een miljoen verschillende exons. Affymetrix levert bovendien een set van zeven 'tiling arrays' van het menselijke genoom. Hiermee wordt in stapjes van 35 nucleotiden het complete genoom wordt gedekt.

Een nieuwkomer is ook een microarray voor microRNA (miRNA). Dat zijn kleine RNA fragmenten die in de cel delen van het mRNA kunnen afdekken en zo transcriptie voorkomen. Combimatrix heeft hiervoor al arrays in de aanbieding. Agilent verwacht dit jaar de eerste miRNA producten te kunnen lanceren.

Eiwitniveau

De droom van vele onderzoekers zijn de eiwit-arrays: een oplossing waarmee ze op eiwitniveau de expressie van genen kunnen meten. Basisgedachte is dat deze arrays een directer beeld geven van wat er in een cel gebeurt. RNA is tenslotte slechts een tussenstap van DNA naar eiwit. Probleem van de eiwitarrays is dat ze veel moeilijker te maken zijn. Synthetisch, net als bij DNA, is veel te duur evenals het isoleren van alle eiwitten individueel. Invitrogen verkoopt een array met enkele honderden eiwitten erop.

Servicecentrum

Voor microarray-gebruikers wordt de drempel wel steeds hoger om de experimenten in eigen beheer uit te voeren. Omdat de fabrikanten steeds meer probes op een array kunnen printen, is het noodzakelijk om elke twee tot drie jaar een nieuwe scanner aan te schaffen. Bovendien hangt er aan de benodigde analyse-software een aardig prijskaartje: die is vaak net zo duur als alle overige apparatuur bij elkaar. Volgens Johan den Dunnen van het LGTC besluiten daarom steeds meer laboratoria om dit soort experimenten niet meer zelf te doen, maar uit te besteden aan een servicecentrum, zoals het LGTC (zie kader). Zulke centra zijn vooral te vinden binnen verschillende universitaire instellingen. Deze zijn meestal ook toegankelijk voor gebruikers van buitenaf. Die mogen dan zelf bepalen in hoeverre ze de experimentele handelingen deels nog zelf uitvoeren of compleet uitbesteden. Ook bedrijven bieden soms zo'n service, zoals bijvoorbeeld Nimblegen of ServiceXS.

Prijsverschil

De kosten zijn ook te drukken door geen kant-en-klare arrays te gebruiken, maar de arrays zelf te printen. Commerciële arrays worden echter steeds goedkoper, waardoor het prijsverschil niet meer is dan een factor twee tot vijf, schat Den Dunnen. "Maar het is pas goedkoop bij grote aantallen", voegt hij eraan toe. Voordat de eerste array geprint kan worden, is namelijk een grote investering nodig door de aankoop van alle benodigde oligonucleotides. Liggen die eenmaal op de plank, dan kunnen met het grootste gemak nog eens een paar duizend van dezelfde arrays worden geprint, zonder veel extra kosten. Het LGTC doet dat dus alleen bij arrays waar veel gebruikers voor zijn, meestal met DNA van mens of muis. Een probleem bij het zelf printen is bovendien dat de apparatuur zeer gevoelig is voor stof, temperatuur en luchtvochtigheid. Daar moeten gebruikers wel goed mee om weten te gaan. "Rond 2000 had elke universiteit wel zo'n printer aangeschaft", vertelt Den Dunnen, "maar een groot deel daarvan wordt nu niet meer gebruikt."

Metten, maar dan....

Voor nieuwe gebruikers van microarrays heeft Den Dunnen nog wel een paar tips. "Ga eerst naar een expert om je ideeën door te spreken. Wat denk je precies te gaan meten en heb je daar echt wel een microarray voor nodig? En zo ja, wat voor array is dan het meest geschikt en welke apparatuur kun je het beste gebruiken?" En wat vooral belangrijk is: "Besef dat het werk pas begint als je de data hebt. Het meten is doodsimpel. Maar daarna komt het pas. Vroeger was het eenvoudig met een Northern blot, waarbij je het resultaat kreeg van de expressie van één gen. Nu heb je in één keer data voor 48.000 genen. Waar begin je dan?"

Belangrijkste leveranciers van microarray-producten*

Affymetrix
 Agilent
 Applied Precision
 CombiMatrix
 GE Healthcare
 Genetix
 Genomic Solutions
 Illumina
 Molecular Devices
 Nimblegen
 Perkin Elmer
 Whatman/Schleicher&Schuell

*websites: www.bedrijfsnaam.com

Leveranciers van microarrays				
Leverancier	Toepassing	Organismes	Genoomselectie	Custom arrays ¹
Affymetrix	Gen expressie, CGH, chIP, SNP, copynumber analyse	Mens, muis, rat + 26 andere zoals fruitvlieg, kip en tomaat.	Compleet genoom, promotor of ENCODE regio's, SNPs, exons.	ja
Agilent	Gen expressie, chIP, CGH, alternative splicing.	Mens, muis, rat	Compleet genoom, promotor, ENCODE, of selectie van belangrijkste genen	ja
NimbleGen	Gen expressie, CGH, chIP, comparative genome sequencing, alternative splicing.	Mens, muis, rat, C. elegans, fruitvlieg, zebrafish, gist, Arabidopsis, 125 microorganismes	Compleet genoom, promotor regio's, splice varianten	ja
Illumina ²	Gen expressie, SNP	Mens, muis	Compleet genoom	ja
CombiMatrix ³	Gen expressie, SNP, CGH, chIP, miRNA.	Mens, muis, rat, + 14 andere zoals E. coli, malaria en gist.	Selectie voor bepaalde toepassing, bijv. kanker markers of metabolisme.	ja
GE Healthcare	Gen expressie, SNP, CGH.	Mens, muis, rat	Compleet genoom, selectie van belangrijkste genen, SNPs.	nee
Whatman/Schleicher&Schuell	Cytokine Multiplex Quantification, Human Biomarker Profiling	Mens, muis	Genoomselectie	ja

¹ Custom arrays: arrays die klanten zelf kunnen ontwerpen, binnen bepaalde voorwaarden.

² Illumina heeft eigen systeem van bead arrays.

³ CombiMatrix heeft eigen systeem van electrode-arrays.

Leveranciers van microarray-toebehoren					
Leverancier	Printer	Hybridisatiestation	Scanner	Analyse-software	Reagentia
Affymetrix	-	+	+	+	+
Agilent	-	+	+	+	+
Molecular Devices	-	-	+	-	-
Perkin Elmer	+	+	+	+	+
CombiMatrix	+	+	+	-	-
GE Healthcare	-	+	+	+	+
Genomic Solutions	+	+	+	+	+
Genetix	+	-	+	+	+
Applied Precision	-	-	+	-	-
Illumina	+	+	+	+	+
Whatman/Schleicher&Schuell	-	-	-	+	+

Microarray-servicecentra in Nederland

Micro-array Department UvA
 Micro Array Core Facility VU University Medical Center
 KWF Central Microarray Facility
 LGTC Leiden
 University of Maastricht Genome Center
 Microarray facility Nijmegen
 Erasmus Center for Biomics
 Microarray facility, Genomics Laboratory UMC Utrecht
 ServiceXS

www.micro-array.nl
www.vumc.nl/microarrays
microarrays.nki.nl
www.LGTC.nl
www.gen.unimaas.nl/popgen
www.humangenetics.nl/microarray/ma_index_en.php
www.erasmusmc.nl/biomics/index2.html
www.microarrays.med.uu.nl/home/index.php
www.ServiceXS.nl/