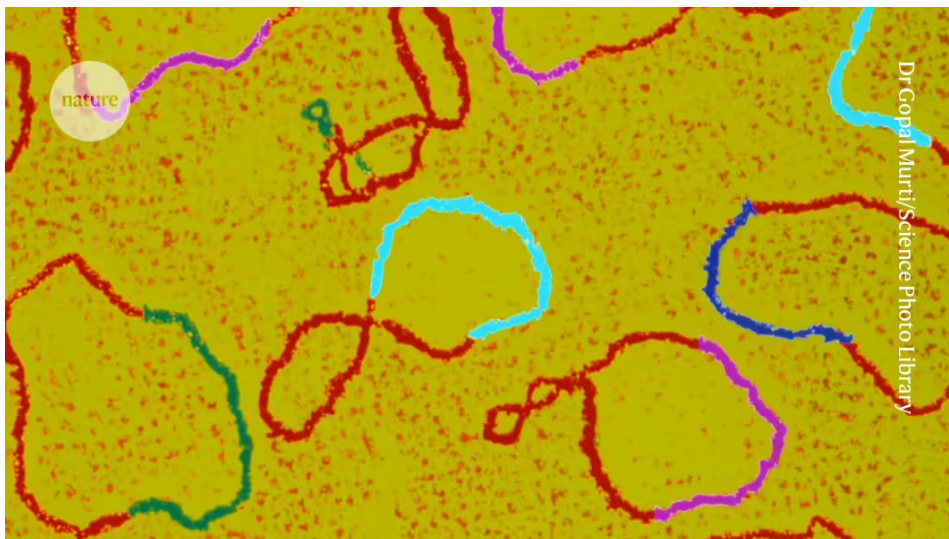


Schwere Fehler plagen DNA-Tool, das ein Arbeitstier der Biologie ist

Erfahren Sie mehr über die Fehler in Labor-Plasmiden und die Auswirkungen auf die genetische Therapie. Forscher haben entdeckt, dass fast die Hälfte der Plasmide konstruktionsbedingte Mängel aufweisen, die zu ineffektiven Therapien führen könnten. Lesen Sie die detaillierte Analyse und was Experten über die Qualitätssicherung von Plasmiden in Labors sagen.



Laborgefertigte Plasmide, ein Arbeitspferd der modernen Biologie, haben Probleme. Forscher führten eine systematische Bewertung der zirkulären DNA-Strukturen durch, indem sie mehr als 2.500 Plasmide analysierten, die in Labors hergestellt und an ein Unternehmen geschickt wurden, das Dienstleistungen wie das Verpacken der Strukturen innerhalb von Viren anbietet, damit sie als Gen-Therapien verwendet werden können. Das Team stellte fest, dass fast die Hälfte der Plasmide Designfehler aufwiesen, darunter Fehler in Sequenzen, die für die Expression eines therapeutischen Gens entscheidend sind. Die Forscher

veröffentlichten ihre Ergebnisse letzten Monat auf dem Preprint-Server bioRxiv¹.

Die Studie legt „einen Mangel an Wissen“ über die Durchführung einer ordnungsgemäßen Qualitätskontrolle von Plasmiden im Labor offen, sagt Hiroyuki Nakai, ein Genetiker an der Health & Science University in Oregon, der nicht an der Arbeit beteiligt war. Er hatte bereits Probleme mit im Labor hergestellten Plasmiden bemerkt, war jedoch von der Häufigkeit der durch die Studie aufgedeckten Fehler überrascht. Es gibt wahrscheinlich viele wissenschaftliche Arbeiten, die veröffentlicht wurden, für die die Ergebnisse aufgrund von Fehlern im Plasmiddesign nicht reproduzierbar sind, fügt er hinzu.

Verschwendete Zeit

Plasmide sind beliebte Werkzeuge in Biologielaboren, da Bakterien, einschließlich des weit verbreiteten Modellorganismus *Escherichia coli*, die Strukturen zur Speicherung und zum Austausch von Genen verwenden. Das bedeutet, dass Biologen Designer-Plasmide herstellen können, die verschiedene interessante Gene enthalten, und dann *E. coli* überreden können, diese aufzunehmen und viele Kopien davon herzustellen.

Bruce Lahn, Chef-Wissenschaftler bei VectorBuilder, einem Unternehmen mit Sitz in Chicago, Illinois, das Genlieferwerkzeuge bereitstellt, sagt, dass er und andere Biologen seit Jahren Probleme mit der Plasmidqualität bemerken. Als Lahn Professor an der University of Chicago war, verbrachte ein Doktorand in seinem Labor sechs Monate damit, zwei Plasmide zu reproduzieren, die in der wissenschaftlichen Literatur gemeldet worden waren. „Wir haben nicht über die Qualität der Plasmide nachgedacht, aber dann funktionierte das Experiment nicht“, weil die Plasmide Fehler enthielten, sagt er.

Jetzt bei VectorBuilder sagt Lahn, dass er ständig mit dem Problem konfrontiert wird – also entschied er sich, es

systematisch zu bewerten. Wenn Kunden fehlerhafte Plasmide einreichen, „verschwenden sie viel Zeit“, und die zusätzlichen Schritte bei der Qualitätskontrolle erhöhen die Kosten für die Herstellung der Plasmide und deren Verpackung in Viren, sagt er.

Die Analyse des VectorBuilder-Teams ergab ein Sammelsurium von Fehlern in den mehr als 2.500 bewerteten Plasmiden. Einige enthielten Gene, die Proteine codierten, die für *E. coli* giftig waren, was bedeutet, dass sie das Wachstum der Organismen verlangsamten oder stoppen könnten, auf die Biologen angewiesen sind, um ihre Plasmide zu replizieren. Andere, die für die Verpackung in Viren bestimmt waren, codierten Proteine, die für diese Viren giftig waren. Und einige enthielten repetitive DNA-Sequenzen, die in Plasmiden Mutationen akkumulieren können.

Überprüfung von Fehlern

Die häufigsten Fehler, die Lahn und seine Kollegen fanden, waren mit einem Schlüsselwerkzeug der Gen-Therapie verbunden. Therapien werden oft in adeno-assoziierten Viren (AAVs) verpackt, die größtenteils harmlos sind und Behandlungen zu Zellen transportieren können. Bei der Herstellung der Plasmide für diese AAVs sandwichten Forscher ein therapeutisches Gen zwischen Sequenzen, die als ITRs bezeichnet werden und eine entscheidende Rolle dabei spielen, sicherzustellen, dass das Gen in das Virus zur Lieferung verpackt wird. Diese Sequenzen senden im Wesentlichen ein biologisches Signal an Zellen, das besagt „Ich gehöre in dieses Virus“. Das Team stellte jedoch fest, dass etwa 40% der AAV-Plasmide in der Studie Mutationen in den ITR-Regionen aufwiesen, die diese wichtige Nachricht verfälschen könnten. Wenn Forscher diese falsch konzipierten Plasmide verwenden würden, könnte ihre Gen-Therapie nicht funktionieren – und es könnte lange dauern, bis die Wissenschaftler herausfinden, warum.

Mark Kay, ein Facharzt für Pädiatrie und Genetik an der Stanford

School of Medicine in Kalifornien, hat auch aus erster Hand gesehen, dass Plasmidfehler Laborprojekte verzögern können. Er ist jedoch zuversichtlich, dass Wissenschaftler diese Fehler erkennen und beheben können. Er sagt, dass Gen-Therapie-Forscher mögliche ITR-Probleme kennen und dass Fehler in klinischen Umgebungen unwahrscheinlich sind. Das liegt daran, dass Regulierungsbehörden wie die US Food and Drug Administration strenge Standards haben, die Forscher dazu verpflichten, ihre Plasmide sorgfältig zu analysieren, bevor sie sie in der Klinik einsetzen.

Nakai sagt, dass die Überprüfung von Plasmiden auf Fehler durch Sequenzierung die Forscher auf die in der Studie hervorgehobenen Probleme aufmerksam machen könnte. Einige Unternehmen, darunter Plasmidsaurus in Eugene, Oregon, und Elim Biopharmaceuticals in Hayward, Kalifornien, bieten Plasmidsequenzierung für ungefähr 15,00 US-Dollar pro Probe an, sagt Nakai, der kein finanzielles Interesse an beiden Unternehmen hat. Er empfiehlt auch, dass neue Labormitarbeiter Zeit damit verbringen, von erfahrenen Plasmid-Konstrukteuren zu lernen; es ist ein mühsamer, handwerklicher Prozess, sagt er, aber wenn Sie einen Fehler machen, kann er eine enorme Menge Zeit und Geld verschwenden.

Ein weiterer Weg für Labore, Probleme zu vermeiden, besteht darin, ihre Plasmidsequenzen in Open-Access-Repositories öffentlich zugänglich zu machen, sagt Melina Fan, Chief Scientific Officer der gemeinnützigen Organisation Addgene in Watertown, Massachusetts. Addgene bietet ein solches Repository, sagt Fan, und es „sequenziert die hinterlegten Plasmide und teilt die Sequenzdaten über die Website zur Nutzung durch die Gemeinschaft mit“. Die Überprüfung von Plasmiden ist wichtig, fügt sie hinzu.

Lahn hofft, dass die Analyse seines Teams die Aufmerksamkeit der Forscher darauf lenkt, dass diese Arbeitstier-Labortools oft als selbstverständlich hingenommen werden. „Die Gesundheit des Werkzeugs ist etwas, über das die Leute nicht nachdenken“,

sagt er, obwohl sie es sollten.

1. Bai, X. *et al.* Preprint auf bioRxiv

<https://doi.org/10.1101/2024.06.17.596931> (2024).

Referenzen herunterladen

Details

Besuchen Sie uns auf: natur.wiki