



## Stellungnahme der ZKBS zur Bewertung des Vektors pCDM8

### Einführung

Ein Betreiber arbeitet mit dem bei der Firma Invitrogen käuflich zu erwerbenden Expressionsvektor pCDM8. Da dieser Vektor im Bereich der Transkriptionseinheit Sequenzen des HIV-1 LTR enthält, wird angefragt, ob die zusätzlichen Nukleinsäureanteile Konsequenzen auf die Einstufung der gentechnischen Arbeiten mit pCDM8 haben könnten.

In PNAS 84, 3365-3369 (1987), wird für den Vorläufer von pCDM8 ein chimärer Promotor beschrieben, der *enhancer*-Sequenzen des humanen Cytomegalie Virus (HCMV) mit LTR Sequenzen (-67 bis +80) des HIV-1 fusioniert enthält. In Nature 329, 840-842 (1987), wird der Promotorbereich von pCDM8 als Cytomegalie Virus/T7 RNA-Polymerase-Promotor ohne Hinweis auf HIV-Sequenzen beschrieben.

Ein durch die Geschäftsstelle der ZKBS durchgeführter Sequenz-Homologieabgleich der Transkriptionseinheit von pCDM8 (pCDM8 Sequenz: Nukleotide 1780-2200) gegen eine Nukleinsäuredatenbank (Genebank) ergab Folgendes:

Die Transkriptionseinheit, die mit einer putativen TATA-Box abschließt (pCDM8 Sequenz: Nukleotid 2126), enthält *enhancer*-/Promotorsequenzen des *major immediate early* Gens von HCMV (IE-1 Gen). Die TATA-Box ist in 10 Nukleotiden homolog zur HIV-1-TATA-Box im 5'-LTR (Nature 313, 277-284 (1985)). Der TATA-Box folgen in 3'-Richtung 34 Nukleotide, von denen 31 mit dem HIV-1 Uganda Isolat UL 455 die beste Homologie zeigen (92 %; pCDM8 Sequenz: Nukleotide 2119-2154). Daran schließen 40 Nukleotide des T7-Promotors sowie Restriktionsendonuklease-Schnittstellen an.

### Stellungnahme der ZKBS

Der Vektor pCDM8 ist ein eukaryoter Expressionsvektor mit Ursprüngen für die Replikation in *E. coli* K12 (ColE1 ori) und in Säugetierzelllinien (SV40 ori und Polyoma ori). Durch den M13 ori eignet er sich für die Einzelstrang-Verpackung in M13 Phagenhüllen und durch das bakterielle Suppressor-Gen *supF* kann die Selektion auf bestimmten *E. coli* K12 Stämmen erfolgen. Die *enhancer*- und Promotorregion des *major immediate early* (IE-1) Gens des humanen Cytomegalie Virus erlaubt die Expression in Säugetierzelllinien. Dieser Bereich ist über eine 34 Basenpaar lange Sequenz, die zu 92 % homolog zu einem HIV-1 LTR ist, mit dem Promotor des Bakteriophagen T7 verbunden.

Eine Gefährdung durch die Verwendung dieser Nukleinsäuresequenzen des HIV-1 ist nicht erkennbar, da gemäß der Einstufungspraxis der ZKBS regulatorische Nukleinsäuresequenzen wie der LTR des HIV-1 (Spenderorganismus der Risikogruppe 3) nach deren Übertragung auf einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 keine Höherstufung des gentechnisch veränderten Organismus bewirken. Es handelt sich um subgenische Nukleinsäure-Abschnitte, die kein Gefährdungspotential besitzen.

Gleichzeitig sei darauf verwiesen, daß der Vektor pCDM8 gemeinsam mit Empfängerorganismen wie *E. coli* K12 (zur Amplifikation) oder etablierten Zelllinien als Vektor-Empfänger-System den Anforderungen einer Biologischen Sicherheitsmaßnahme entspricht.