



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.