



**Küng – Biotech + Umwelt**

***Studie***

# **Molekulare Vektoren – Grundlagen für Recherchen zur Beurteilung der Biosicherheit**

*Elektronische Recherchierhilfe A*

zuhanden der  
**Fachstelle Biosicherheit des  
Bundesamtes für Gesundheit  
BAG**

Bern, Juli 2001

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>2 Grundlagen zu molekularen Vektorsystemen .....</b>	<b>7</b>
<b>3 Informationen zur Charakterisierung eines Vektors .....</b>	<b>11</b>
<b>4 Vorgehen zur effizienten Informationsbeschaffung .....</b>	<b>13</b>
<b>5 Recherchen zu konkretem Vektorbeispiel.....</b>	<b>15</b>
<b>6 Charakterisierung von Datenbanken und Literatur .....</b>	<b>17</b>
<b>7 Hintergrund und Erläuterungen.....</b>	<b>22</b>
<b>8 Schlussbemerkung.....</b>	<b>28</b>

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Ausgangslage.....	5
1.2 Zielsetzung .....	5
1.3 Inhalt.....	5
1.4 Verknüpfung zu elektronischen Datenbanken.....	6
<b>2 Grundlagen zu molekularen Vektorsystemen</b> .....	<b>7</b>
2.1 Begriffe: Ursprungsvektoren, Vektorsysteme, Vektoren und Plasmide .....	7
2.2 Nomenklatur .....	8
2.2.1 Anschauungsbeispiele .....	9
<b>3 Informationen zur Charakterisierung eines Vektors</b> .....	<b>11</b>
<b>4 Vorgehen zur effizienten Informationsbeschaffung</b> .....	<b>13</b>
<b>5 Recherchen zu konkretem Vektorbeispiel</b> .....	<b>15</b>
5.1 Detaillierte Recherche zu „RSF-1010“ .....	15
5.2 Zusammenstellung der Informationen zu RSF-1010 .....	15
<b>6 Charakterisierung von Datenbanken und Literatur</b> .....	<b>17</b>
6.1 Datenbanken für Primärliteratur und DNA-Sequenzen .....	17
6.2 Stammsammlungen .....	17
6.3 Hersteller und Firmen (Kataloge) .....	18
6.4 Staatliche Institutionen und Behörden .....	18
6.5 Datenbanken für Gentherapievektoren .....	19
6.6 Research-Tools für Sequenzvergleiche .....	19
6.7 Lehrbücher .....	19
6.8 Zeitschriften.....	21
<b>7 Hintergrund und Erläuterungen</b> .....	<b>22</b>

<b>7.1</b>	<b>Unterschiedliche Anwendungen und Typen von Vektoren</b> .....	<b>22</b>
<b>7.2</b>	<b>Definition und Kurzbeschreibung wichtiger Vektorsysteme</b> .....	<b>22</b>
7.2.1	Molekulare Vektoren .....	23
7.2.2	Plasmide.....	23
7.2.3	Phasmide („ <i>Phagemids</i> “) .....	23
7.2.4	Lambda-Phagen Vektoren .....	24
7.2.5	Cosmide .....	24
7.2.6	Shuttle Vektoren.....	24
7.2.7	Expressionsvektoren.....	24
<b>7.3</b>	<b>Glossar für ausgewählte Begriffe</b> .....	<b>24</b>
<b>7.4</b>	<b>Ausgewählte Abkürzungen</b> .....	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>Schlussbemerkung</b> .....	<b>28</b>
<b>8.1</b>	<b>Beurteilung der recherchierten Informationen und Risikobewertung</b> .....	<b>28</b>
<b>8.2</b>	<b>Weiterführende Schritte</b> .....	<b>28</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangslage

Bei der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) spielen die bei der Konstruktion von GVOs verwendeten Vektoren eine zentrale Rolle. In der molekularbiologischen Forschung ist die Herkunft eines Vektors dagegen oft nebensächlich, und die entsprechenden Kenntnisse sind nur lückenhaft vorhanden. Die Beschaffung von detaillierten Informationen zu einem bestimmten Vektor ist deshalb oft schwierig. Zudem besteht keine einheitliche Nomenklatur.

## 1.2 Zielsetzung

Diese Studie ist eine Recherchierhilfe für die Informationsbeschaffung zu molekularen Vektorsystemen und dient zur Unterstützung bei der Beurteilung von Projekten mit gentechnisch veränderten Organismen.

## 1.3 Inhalt

In dieser Studie werden die grundlegenden Eigenschaften von Vektoren charakterisiert und die eher begrenzt vorhandenen Fakten bezüglich Abkürzungen, Nomenklatur und Systematik aufgeführt. Es werden Wege aufgezeigt, wie in den einschlägigen Datenbanken und in der entsprechenden Literatur möglichst effizient weiterführende Informationen recherchiert werden können.

Diese Studie (Recherchierhilfe A) widmet sich in Kapitel 2 den Grundlagen von Vektorsystemen. Kapitel 3 zeigt auf, welche Informationen für die Charakterisierung und Risikobewertung eines Vektors notwendig sind, und Kapitel 4 legt die Vorgehensweise dar, wie diese Informationen zu unbekanntem Plasmiden und Vektorsystemen möglichst zielstrebig recherchiert werden können.

Im Kapitel 5 wird die beschriebene Vorgehensweise an konkreten Vektoren beispielhaft angewendet. In Kapitel 6 sind die wissenschaftlichen Datenbanken mit der Anzahl Vektoren, zu denen weiterführende Informationen abgerufen werden können, aufgelistet und mit der entsprechenden Internetadresse versehen. Kapitel 7 bietet Hintergrund, Definitionen und Erläuterungen zu Vektorsystemen. In Form eines Glossars werden die wichtigsten Funktionen oder Eigenschaften von Vektoren definiert.

In der Gentherapie werden vielfach virale Vektorsysteme verwendet. Die Grenzen zwischen Klonierungsvektoren und den Vektorsystemen für die Gentherapie sind fließend; spezielle Datenbanken für Gentherapievektoren sind im Kapitel 6.5 aufgeführt.

## 1.4 Verknüpfung zu elektronischen Datenbanken

Diese Studie ist als Recherchierhilfe auch zur direkten Verwendung am Computer konzipiert. Deshalb sind die Links in diesem Dokument aktivierbar, sodass im Internet direkt auf die einschlägigen Datenbanken zugegriffen werden kann.

Zweiter Bestandteil dieser Studie ist die elektronische Recherchierhilfe B<sup>1</sup>, die nicht ausgedruckt werden sollte, sondern nur zur Benutzung am Bildschirm vorgesehen ist. Recherchierhilfe B enthält die Vektorenlisten von 14 verschiedenen Datenbanken wie Stammsammlungen, Firmenkatalogen und molekularbiologischen Sammlungen. Die berücksichtigten Datenbanken sind in der vorliegenden Studie im Kapitel 6 aufgeführt.

In der Recherchierhilfe B kann elektronisch mit Hilfe der Suchfunktion des Word-Programms (Ctrl+F) in einem ersten Schritt recherchiert werden, ob in den zusammengeführten Datenbanken weiterführende Informationen zu einem unbekanntem Vektorsystem vorhanden sind. In einem zweiten Schritt kann mit Hilfe der im Inhaltsverzeichnis oder in der Kopfzeile aktivierbaren Links direkt auf die betreffende Webseite zu den Informationen für ein Vektorsystem bzw. für ein Plasmid zugegriffen werden.

---

<sup>1</sup> Gesamtliste von Vektoren und Plasmiden; Elektronische Recherchierhilfe B; Küng – Biotech + Umwelt, Bern 6/2001

## 2 Grundlagen zu molekularen Vektorsystemen

### 2.1 Begriffe: Ursprungsvektoren, Vektorsysteme, Vektoren und Plasmide

In dieser Studie werden **molekulare Vektoren** betrachtet – im Unterschied beispielsweise zu tierischen Vektoren, welche in der Parasitologie von Bedeutung sind. Ein Vektor ist ein biologischer Träger, mit dessen Hilfe DNA-Segmente in eine andere Zelle eingeführt werden können.

Heute gibt es einige Tausend Vektoren, die auf **einige hundert ursprüngliche Vektorsysteme** zurückgeführt werden können. Diese **Ursprungsvektoren** (siehe Tabelle 1) stammen aus verschiedenen Mikroorganismen und sind dem molekularbiologischen Gebrauch angepasst worden.

Die Begriffe **Vektorsystem** und **Vektor** werden im sprachlichen Gebrauch nicht scharf gegeneinander abgegrenzt. Ein Vektorsystem umfasst im Gegensatz zum Vektor als „Klonierungsvehikel“ mehrere Komponenten: Neben dem eigentlichen Vektor (DNA) werden auch die genetisch passenden Empfängerzellen, Verpackungszellen oder Helfervektoren mit eingerechnet.

Der Begriff Vektor umfasst neben den vorwiegend bakteriellen Plasmiden auch virale Vektoren oder Kombinationen von beiden. **Plasmide** sind eine prominente Gruppe von Vektoren und haben eine doppelsträngige, zirkuläre DNA-Struktur. Sie sind vor allem bakteriellen Ursprungs. Es gibt aber auch Plasmide aus Hefezellen. Im Gegensatz zu bakteriellen Plasmiden sind die **viralen Vektoren** von Bakteriophagen und Viren abgeleitet, die teilweise als einzelsträngige Moleküle vorkommen.

Viele Vektoren sind Mischformen. Das heisst, dass sie bakterielle und virale Sequenzen enthalten. Als Beispiel sei das Vektorsystem *Bluescript*<sup>®</sup> erwähnt, welches als doppelsträngiges Plasmid, aber auch als einzelsträngiger Phage vermehrt werden kann.

Vektoren ohne Insert nennt man **parenterale Vektoren**; diejenigen mit Insert werden als **rekombinante Vektoren** bezeichnet. Parenterale Vektoren sind meist charakterisiert. Die verwendeten Bezeichnungen unterliegen nur einer sehr begrenzten und nur teilweise nachvollziehbaren Nomenklatur.

**Tabelle 1: Zur Illustration: Ursprungsvektor, parenteraler und rekombinanter Vektor**

Name / Bezeichnung	Begriff
pBR	Ursprungsvektor
pBR322	Parenteraler <b>Vektor</b> (Plasmidstamm)
pBR322- src1	rekombinanter Vektor mit src1-Insert

Detaillierte Einführungen in die vielfältigen Grundlagen der Vektorsysteme finden sich in den auf Seite 19 dieser Studie aufgeführten Lehr- und Laborhandbüchern, so in Ausubel F.M. (1987 bis 2001)<sup>2</sup> Section II, auf den Seiten 1.5.1 bis 1.5.17 und in Sambrook *et al.* (1989)<sup>3</sup> auf den Seiten 1.3 bis 1.19.

Hintergrundinformationen zu retroviralen Vektoren, insbesondere zur Sicherheitseinstufung, finden sich in der Stellungnahme der ZKBS zu "Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren"<sup>4</sup>.

## 2.2 Nomenklatur

In jedem molekularbiologischen Forschungsprojekt werden Vektoren (vor allem Plasmide) zur Klonierung von DNA verwendet. Das resultierende „Konstrukt“ ist ein rekombinanter Vektor, der meist mit einer laborinternen Bezeichnung versehen wird.

Allgemeingültige Regeln zur Nomenklatur gibt es kaum. Die Buchstaben in einer Plasmidbezeichnung haben eher den Stellenwert eines Namens als dass sie einen Hinweis auf die Eigenschaften des Plasmids geben. Manchmal – und nicht als Regel – lässt sich aufgrund der Buchstaben und Zahlenkombination noch auf die Verwendung bestimmter Gene, Promotoren oder Transposonsequenzen in einem Plasmidkonstrukt schliessen.

Zur Nomenklatur kann mit Gewissheit nur gesagt werden, dass **p** für Plasmid steht. Bezeichnungen, in denen das **p** fehlt, lassen auf einen Vektor viralen Ursprungs schliessen. Wo in der Bezeichnung ein  $\lambda$  vorkommt, wurden Sequenzen des Lambda-Phagen verwendet.

Als Recherchierhilfe für die Suche nach weiteren Fakten zu einem unbekanntem Vektor lassen sich die in Tabelle 2 festgehaltenen Regeln anwenden.

Wenn bei einer Datenbankrecherche gemäss den in Tabelle 2 dargelegten Regeln mit den ersten drei bis fünf Ziffern einer Plasmidbezeichnung kein Treffer in den zusammengefassten Datenbanken der elektronischen Recherchierhilfe B<sup>5</sup> erfolgt, können die Informationen zu Herkunft des Vektors und entsprechende Referenzliteratur beim Verfasser des Projektes eingeholt werden.

---

<sup>2</sup> Current protocols in molecular biology; ed. by Frederic M. Ausubel *et al.* (Loseblattsammlung, vierbändig) New York; Wiley, 1987 bis 2001, ISBN 0-471-50338-X

<sup>3</sup> Molecular cloning, A Laboratory Manual; Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1982-1989. 3 Bände; 28 cm dick; ISBN 0-87969-309-6

<sup>4</sup> "Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren" Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit; Juni 1996; Quelle: <http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/VERGLEICHBARKEIT/RETRVEKT.HTM>

<sup>5</sup> Gesamtliste von Vektoren und Plasmiden; Elektronische Recherchierhilfe B; KÜNG – Biotech + Umwelt, Bern 6/2001



**Tabelle 2: Grundregeln zur Nomenklatur und Benutzung für Recherchen**

Bezeichnung	Zum Beispiel: <b>pBR322-src1</b>			
	p	BR	322	scr1
Beschreibung	p	2 bis 4 Buchstaben	1 bis 4 Zahlen	zusätzliche Buchstaben und Zahlenkombination
Bedeutung	Plasmid	Name / Ursprungsvektor	Weiterentwicklung eines bestimmten Plasmidstammes	Bezeichnung eines bestimmten Klons bzw. Gens (ev. laborintern)
Recherche	Für Recherchen sind die Buchstaben und Ziffern nach dem p von abnehmender Bedeutung (links nach rechts).			© Küng – Biotech + Umwelt

### 2.2.1 Anschauungsbeispiele

Die folgenden Beispiele von Vektoren veranschaulichen, wie Bezeichnungen für Vektoren zustande kommen. Sie zeigen zugleich das Fehlen einer einheitlichen Nomenklatur auf.

#### **pEMBL**

pEMBL ist ein Klonierungssystem, das am *European Molecular Biology Laboratory (EMBL)* in Heidelberg entwickelt wurde. Der Name widerspiegelt die Institution, in der dieser Vektor entwickelt wurde.

#### **pLNCX**

Die Bezeichnung für den retroviralen Vektor **pLNCX**<sup>6</sup> lässt auf die Reihenfolge der genetischen Elemente schliessen:

- **p** steht für Plasmid, also ein DNA-Element, welches in Bakterien repliziert werden kann;
- **L** bedeutet *long terminal repeat* (LTR-Sequenz);
- **N** bedeutet Neomycin-Phosphotransferase (Neomycin-Resistenz);
- **C** bedeutet *immediate early promotor* des menschlichen Cytomegalievirus (CMV);
- **X** bedeutet Klonierungsstelle (*multiple cloning site*).

<sup>6</sup> Nebenbemerkung: pLNCX findet man an drei Stellen in der "Gesamtliste von Vektoren und Plasmiden", Elektronische Recherchierhilfe B

Neben den retroviralen Sequenzen enthalten diese Vektoren Sequenzen des bakteriellen Plasmides pBR322, unter anderem dessen *ori*-Sequenz und das *amp*-Gen, was die Vermehrung und Selektion des Vektors in Bakterien erlaubt.

### **pBR322**

pBR322 ist der bekannteste Vertreter eines bakteriellen Plasmides (aus *Escherichia coli*). pBR322 wurde zum molekularen Ausgangspunkt für die Entwicklung unzähliger weiterer Vektorsysteme.

- **p** steht für Plasmid, also ein DNA-Element, welches in Bakterien repliziert werden kann;
- **B** bezieht sich auf den Erstautor Bolivar der Publikation von Bolivar F. *et. al.* (1977)<sup>7</sup>
- **R** bezieht sich auf den Zweitautor Rodriguez R.L. der Publikation von Bolivar *et. al.* (1977)
- **322** bezeichnet die laborinterne "Entwicklungsnummer" in der Konstruktion und Isolation von pBR 313, 322, 327, 328 etc.

### **pBluescript®**

pBluescript ist ein kommerziell erhältlicher Expressionsvektor. Der Name weist auf die Verwendung des X-Gal/lacYZ Systems hin, welches die Unterscheidung zwischen blauen und weissen Kolonien (d.h. insertpositiver und -negativer Bakterien) erlaubt.

---

<sup>7</sup> Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW. (1977); Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system; Gene 2(2):95-113

### 3 Informationen zur Charakterisierung eines Vektors

Die Art der Information, die für die Charakterisierung eines Vektors erwünscht ist bzw. zu recherchieren ist, hängt direkt davon ab, wie die Risikobewertung durchgeführt wird. Um einen Vektor ausreichend zu charakterisieren oder um die Eigenschaften eines Vektors zu beurteilen, können Informationen zu den folgenden Punkten – die Angaben zu den unterstrichenen Nummern sind speziell hilfreich – herangezogen werden {erweiterte Liste nach Adelman (1996)<sup>8</sup>, Seite 179}:

**Tabelle 3**

Nr.	Information	spezifisch für bestimmten Vektor
1.	Bezeichnung des Vektors	
<u>2.</u>	Klassierung (Biosafety-Level) des Vektorsystems*	
<u>3.</u>	Karte	
4.	Sequenz	
5.	Molekulargewicht	
6.	Name des Ursprungsvektors, von dem der bezeichnete Vektor hergeleitet wurde	z.B. pBR322
7.	Art und Anzahl der Replikons	z.B. pMB1 für pBR322
8.	Kopienzahl des Vektors in der Empfängerzelle	
<u>9.</u>	Regulatorische Sequenzen wie Promotoren, Enhancer u.a.	
<u>10.</u>	Wird das Insert exprimiert?	
<u>11.</u>	Selektionsgene, Markergene	z.B. <i>ampR</i> und <i>tetR</i> auf pBR-Plasiden
12.	Gibt es mehrere Leseraster?	
<u>13.</u>	Wirtsspezifität und Wirtsbereich	z.B. <i>Shuttle</i> Vektor zwischen ...
14.	Inkompatibilität	
<u>15.</u>	Mobilisierbarkeit, Co-Transfer	
<u>16.</u>	Besitzt der Vektor ein eigenes Transfersystem?	z.B. <i>tra<sup>+</sup>mob<sup>+</sup></i> -Plasmid
17.	Kommt der Vektor in der Empfängerzelle episomal vor oder ist er im Genom integriert?	
<u>18.</u>	Hat der Vektor eine eigenständige Infektiosität?	z.B. gilt dies bei Bakteriophagen und bestimmten viralen Vektoren
19.	Hat der Vektor ein tumorigenes Potenzial?	z.B. <i>Ti</i> -Plasmid von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
20.	Literaturhinweise	

\* Die American Type Culture Collection (ATCC) ordnet ihre Vektorsysteme einem Biosafety-Level zu.

Details dazu siehe unter <http://www.atcc.org/Order/BiosafetyLevels.cfm> .

<sup>8</sup> Adelman S. und Schulze-Halberg H. (Hrsg); Arbeitsschutz in Biotechnologie und Gentechnik; Springer 1996, ISBN 3-540-57978-8

Um einen unbekanntem Vektor aus Sicht der biologischen Sicherheit abschliessend beurteilen zu können, sind umfangreiche Informationen erforderlich, deren Auswertung komplex sein kann. Die ausführliche Risikobewertung, das heisst die Verarbeitung und die Interpretation der Informationen eines Vektorssystems gemäss obiger Liste, kann nur am konkreten Beispiel (*case-by-case*) ausgeführt werden und ist nicht Auftrag dieser Studie.

Um den Aufwand bei der Risikobewertung eines Vektors verhältnismässig gering zu halten, ist es in erster Linie angebracht, den Ursprungsvektor des rekombinanten Vektors herauszufinden und zu zeigen, dass er einer bestimmten Gruppe zugeteilt ist.

Die Beachtung des Vektorsystems als Ganzes – im Sinne von Vektor und entsprechender Empfängerzelle – ist zu unterstreichen, weil für die Klassierung der Biosicherheit die genetische Ausstattung der Empfängerzelle bezüglich Komplementierung von entscheidender Bedeutung sein kann.

## 4 Vorgehen zur effizienten Informationsbeschaffung

Das schrittweise Vorgehen zur Informationsbeschaffung ist in der nachfolgenden Tabelle ausgeführt.

**Tabelle 4**

Zeile Nr.	Suche in	Weiterführende Links	Kommentar / wie weiter?	Kein Treffer: Wie weiter?
1.	Angaben aus den Projektunterlagen	Die Projektunterlagen liefern möglicherweise genug Angaben zur Risikobeurteilung, allenfalls auch zum Ursprungsvektor und zur entsprechenden Primärliteratur.	Weiterführende Informationen in der wissenschaftlichen Primärliteratur (Schritt 4) oder Angaben zur Klassierung abrufen (bei Schritt 3 direkt in die Stammsammlung gehen). Die Suche nach Publikationen der entsprechenden Projektleiter (Schritt 4) liefert oft Hinweise auf Ursprungsvektoren.	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 2
2.	Gesamtliste* von Vektoren und Plasmiden – Elektronische Recherchierhilfe B; Küng – Biotech + Umwelt 6/2001	In der elektronischen Recherchierhilfe B kann gleichzeitig der Inhalt von 14 Datenbanken nach einer bestimmten Vektorbezeichnung durchsucht werden.	In der el. Recherchierhilfe B (Word-Dokument) kann via aktivierbaren Links in der Kopfzeile direkt auf die betreffende Internetseite zugegriffen werden. Die Informationen aus Stammsammlungen oder aus Herstellerkatalogen sind meist am brauchbarsten.	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 3 oder Zeile 4
3.	Google (advanced search) <a href="http://www.google.com/advanced_search.html">http://www.google.com/advanced_search.html</a>	Es ist möglich, direkt im Internet zu brauchbaren Links zu gelangen.	Verbindung zur entsprechenden Internetseite aktivieren	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 4
4.	Die Datenbank der (US-) National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine and National Institutes of Health) bietet Suchmöglichkeiten, um Primärliteratur, Sequenzen, Restriktionskarten und weitere Angaben zu einem Vektor herauszufinden. Von der Startseite <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a> her lassen sich folgende (siehe rechts) Informationen zu einem Vektor finden:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Literatur in <u>PubMed</u></li> <li>Sequenzen in <u>Nucleotide</u></li> <li>Sequenzen in <u>Genom</u></li> <li>Taxonomie und Verweis auf verwandte Vektoren: <u>Taxonomy</u></li> <li>Charakterisierung von Proteinen bzw. Teilssequenzen: <u>Protein</u></li> <li>Charakterisierte vektor-eigene Proteine: <u>Structure</u></li> <li>Charakterisierte Proteinstellen: <u>Domain</u></li> <li>Evolutionäre Verwandtschaft zu Populationen: <u>PopSet</u></li> <li>Mendel'sche Weitergabe menschl. Gene: <u>OMIM</u></li> </ul>	Bei vielen Treffern ist die Suche auf die Beschreibung (und nicht nur Verwendung in irgendeinem Forschungsprojekt) des Vektors einzuschränken. Die chronologisch früheste Publikation enthält in der Regel am meisten Informationen zu einem Vektor (Konstruktion und Erstbeschreibung).	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 5

5.		Die Vektorbezeichnung ist möglicherweise laborspezifisch und neu. Die Vektorbezeichnung kann von rechts nach links bis auf einen Rest von 3 Zeichen gekürzt (trunkiert) werden, in der Annahme, dass dieser Teil auf den Ursprungsvektor hinweist.	Wieder einsteigen mit reduzierter Vektorbezeichnung beim Arbeitsschritt der Zeile 2  Wenn auch mit geänderter Vektorbezeichnung keine brauchbaren Informationen auffindbar sind, ist mit dem Arbeitsschritt der Zeile 6 oder Zeile 7 weiterzufahren.	
6.	Researchtools z.B. <a href="http://www.nih.gov/~jun/research/">http://www.nih.gov/~jun/research/</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/BLAST/</a> <a href="http://medschool.wustl.edu/~ref/science/genetics.htm">http://medschool.wustl.edu/~ref/science/genetics.htm</a> <a href="http://www.expasy.ch/">http://www.expasy.ch/</a>	Mit diesen elektronischen Datenbanken kann ein Vektor weiter analysiert werden; beispielsweise die DNA-Sequenzen des Vektors (wie Randregionen des Inserts), einzelne Vektorgene, Bedeutung von Gen-Bezeichnungen (Abkürzungen) etc.	Zu beachten: Vektoren haben oft DNA-Sequenzen ganz unterschiedlichen Ursprungs. Sequenzvergleiche sind deshalb nur begrenzt sinnvoll und ausserdem aufwändig.	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 7
7.	Weitere Informationen Projektleiter	Wenn nach den Suchschritten 1 bis 8 keine Informationen zu einem Vektor gefunden werden, muss der Projektleiter die Angaben zum Ursprungsvektor und allenfalls weiterführender Literatur liefern.	Für spezifische Nachfragen beim Projektleiter können die Stichworte gemäss „Informationsraster zur Charakterisierung von Vektoren“ (Kap.3) zur Strukturierung verwendet werden	

© Küng –Biotech + Umwelt, Bern 2001

- \* Die elektronische Recherchierhilfe B enthält eine Gesamtliste von Vektoren und Plasmiden. In diesem Dokument sind sämtliche Vektorenlisten der in Kapitel 6 aufgeführten Datenbanken in einem einzigen (Word-) Dokument zusammengefasst. Dies erlaubt einen raschen Überblick, ob zu einem unbekanntem Vektor in einer dieser Datenbanken weiterführende Informationen erhältlich sind.

## 5 Recherchen zu konkretem Vektorbeispiel

### 5.1 Detaillierte Recherche zu „RSF-1010“

In der Tabelle 5 sind zur Illustration die Resultate der Recherche zu RSF-1010 zusammengestellt. Vorgegangen wurde wie in Tabelle 4, Kapitel 4, beschrieben.

Tabelle 5: Recherchen zum Vektor RSF-1010

Vektor RSF-1010 (RSF1010; alternative Schreibweise)				
Zeile Nr.	Suche in	Link zu weiteren Angaben	Anzahl Treffer / Kommentar	Wie weiter?
1.	Angaben aus den Projektunterlagen	Zitiert aus den Projektunterlagen: „ <i>Mutagenese von Bartonella spp. durch Transposon-Insertionen oder homologe Rekombination, Klonierung von unveränderten oder mutierten Genen oder Genfragmenten von Bartonella spp. in mobilisierbare Vektoren, die in Bartonella spp. bzw. E. coli replizieren.</i> “	Begrenzte Informationen: Offenbar handelt es sich bei RSF1010 um ein Plasmid, dass in <i>E. coli</i> und in <i>Bartonella spp</i> replizieren kann.	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 2
2.	Gesamtliste von Vektoren und Plasmiden – Elektronische Recherchierhilfe B; Küng – Biotech + Umwelt 6/2001	RSF1010 kommt zweimal vor, je im Dokument: „10 NCCB Vector database i.a. O.“ <a href="http://www.cbs.knaw.nl/htbin2/search_pdb2.com?Name:+RSF1010">http://www.cbs.knaw.nl/htbin2/search_pdb2.com?Name:+RSF1010</a> und „15 DSMZ - List of Pl Bearing“ <a href="http://www.dsmz.de/plasmids/pls05401.htm">http://www.dsmz.de/plasmids/pls05401.htm</a>	zwei Treffer für RSF1010: In der el. Recherchierhilfe B (Word-Dokument) kann via einem aktivierbaren Link in der Kopfzeile direkt auf die betreffende Internetseite zugegriffen werden.	Ausfüllen des Informationsrasters für Vektoren Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 3 oder Zeile 4
3.	Google (advanced search) <a href="http://www.google.com/advanced_search.html">http://www.google.com/advanced_search.html</a>	Vier spezifische Treffer (Links)	nicht ausgewertet	Weiter mit Arbeitsschritt der Zeile 4
4.	Die Datenbank der (US-) National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine and National Institutes of Health) bietet Suchmöglichkeiten, um Primärliteratur, Sequenzen, Restriktionskarten und weiterführende Angaben zu einem Vektor herauszufinden. Von der Startseite <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a> her lassen sich folgende Informationen zu einem Vektor finden:	Literatur in <u>PubMed</u> Sequenzen in <u>Nucleotide</u> Sequenzen in <u>Genom</u> Taxonomie und Verweis auf verwandte Vektoren: <u>Taxonomy</u> Charakterisierung von Proteinen bzw. Teilsequenzen: <u>Protein</u> Charakterisierte vektoreigene Proteine: <u>Structure</u> Charakterisierte Proteinstellen: <u>Domain</u> Evolutionäre Verwandtschaft zu Populationen: <u>PopSet</u> Mendel'sche Weitergabe menschl. Gene: <u>OMIM</u>	177 Treffer, d.h. Publikationen, in denen RSF1010 erwähnt ist. 38 Treffer 2 Treffer 1 Treffer 126 Treffer 1 Treffer 24 Treffer 0 Treffer 0 Treffer	Weiteres Vorgehen: In den 177 Publikationen mit RSF1010 kann die Suche differenziert werden, z.B. nach Stichworten gemäss „Informationsraster für Vektoren“  Ausfüllen des Informationsrasters für Vektoren

### 5.2 Zusammenstellung der Informationen zu RSF-1010

**Tabelle 6: Informationen zu RSF1010**

Nr.	Information zu	Vektor
1.	Bezeichnung des Vektors	RSF1010
2.	Klassierung (Biosafety-Level) des Vektorsystems	nicht abgeklärt
3.	Karte	Vierzehn Publikationen zu „map RSF1010“ im PubMed; nicht weiter ausgewertet
4.	Sequenz	Elf Verweise zu Sequenzangaben siehe: Scholz,P., Haring,V., Wittmann-Liebold,B., Ashman,K., Bagdasarian,M. and Scherzinger,E.; (1989) <i>Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010</i> ; Gene 75, 271-288 siehe auch: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/cgi-bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=11553">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/cgi-bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=11553</a>
5.	Molekulargewicht	8,9 kb
6.	Name des Ursprungsvektors, von dem der bezeichnete Vektor hergeleitet wurde	RSF1010 ist ein ursprünglicher Vektor; 1974 durch Guerry P, van Embden J, Falkow S. (1974) <i>Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes</i> ; J Bacteriol Feb;117(2):619-30 beschrieben
7.	Art und Anzahl der Replikons	RSF1010
8.	Kopienzahl des Vektors in der Empfängerzelle	hoch
9.	Regulatorische Sequenzen wie Promotoren, Enhancer u.a.	nicht ausgewertet
10.	Wird der Insert exprimiert?	nein, kein Expressionsvektor
11.	Selektionsgene, Markergene	Sm <sup>r</sup> , Su <sup>r</sup> (Streptomycin- und Sulfonamid-Resistenz)
12.	Gibt es weitere (andere) Leseraster?	nein
13.	Wirtsspezifität und Wirtsbereich	breit innerhalb der Gramnegativen; wird zur Klonierung in <i>Pseudomonas</i> verwendet
14.	Inkompatibilität	Inkompatibilitäts-Gruppe <i>IncQ</i> (von <i>E.coli</i> ) nach Scholz <i>et al.</i> 1989
15.	Mobilisierbarkeit, Co-Transfer	mobilisierbar
16.	Besitzt der Vektor ein eigenes Transfersystem?	nicht abgeklärt
17.	Kommt der Vektor in der Empfängerzelle episomal vor oder ist er im Genom integriert?	episomal
18.	Hat der Vektor eine eigenständige Infektiosität?	nein
19.	Hat der Vektor ein tumorigenes Potenzial?	nein
20.	Literaturhinweise	Guerry P, van Embden J, Falkow S. (1974) <i>Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes</i> ; J Bacteriol Feb;117(2):619-30 Bagdasarian M, Lurz R, Ruckert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN. (1981) „ <i>Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in Pseudomonas</i> “ Gene Dec;16(1-3):237-47



## 6 Charakterisierung von Datenbanken und Literatur

Weiterführende Informationen zu einem unbekanntem Vektor finden sich am effizientesten in den einschlägigen wissenschaftlichen Datenbanken und der entsprechenden Primärliteratur. Zur Auswahl stehen die in den folgenden Kapiteln aufgeführten Datenbanken. Der Zusammenhang der in diesen Datenbanken aufgeführten Vektoren findet sich in der elektronischen Recherchierhilfe B.

### 6.1 Datenbanken für Primärliteratur und DNA-Sequenzen

*(US-) National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine and National Institutes of Health)*

Erfasst sind ca. **1265 Vektoren**.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?mode=Undef&id=29278&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&ln=f>

*(US-) National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine and National Institutes of Health)*

Erfasst sind ca. **293 Plasmide**.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg> (suche nach „plasmids“)

### 6.2 Stammsammlungen

*American Type Culture Collection ATCC*

Liste mit ca. **400 Vektoren**

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/vectors.cfm>

*DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany*

Liste mit ca. **200 Vektoren** für diverse Mikroorganismen

<http://www.dsmz.de/plasmids/plasmids.htm#Streptococcus>

Liste mit ca. **100 Phagen** für diverse Mikroorganismen

<http://www.dsmz.de/phages/phages.htm>

*The Netherlands Culture Collection of Bacteria NCCB:*

Allgemeine Suchmaske für die NCCB Datenbank:

[http://www.cbs.knaw.nl/Nccb/search\\_pdb.html](http://www.cbs.knaw.nl/Nccb/search_pdb.html)

Liste mit **364 Vektoren** in der NCCB Datenbank

[http://www.cbs.knaw.nl/Nccb/search\\_lst.html](http://www.cbs.knaw.nl/Nccb/search_lst.html)

### 6.3 Hersteller und Firmen (Kataloge)

#### *Clontech*

Zur Übersicht zu allen Vektoren siehe:

<http://www.clontech.com/clontech/Vectors/Vectors.html>

Eine Liste aller Vektoren findet sich auf den zwei nachfolgenden Sites.

<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/catabc.html>

#### *Promega*

<http://www.promega.com/clonmut/clonvec.html>

#### *Stratagene*

<http://www.stratagene.com/vectors/index3.htm>

#### *Invitrogen*

Auf dieser Website gibt es eine Suchmaske, um Vektoren nach Name, Eigenschaften u.a. zu suchen.

<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=3478&cfid=1404534&cftoken=19133243>

#### *GOLD<sup>TM</sup>: Genomes OnLine Database Home Page*

Vollständige Sequenz von ca. **55 pro- und eukaryotischen Plasmiden**

<http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/Plasmids.html>

### 6.4 Staatliche Institutionen und Behörden

Die ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit, Robert Koch Institut, Deutschland) hat im Jahre 1995 eine Liste mit ca. **250 Vektoren** herausgegeben, zu denen bei der Eingabe von Gesuchen keine weiteren Unterlagen mitzuliefern sind, weil die entsprechenden Kenntnisse und Informationen in der Geschäftsstelle vorhanden sind.

<http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ORGLISTE/VEKTORLI.HTM>

Verschiedene Stellungnahmen zu Vektoren (anklicken) durch die deutsche ZKBS (Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit, Robert Koch Institut, Deutschland).

[http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ZKBS\\_SEL.HTM](http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ZKBS_SEL.HTM)

GUIDELINES FOR RESEARCH INVOLVING RECOMBINANT DNA MOLECULES (NIH-GUIDELINES) May 1999.

In den NIH-Guidelines finden sich eine **Liste von zugelassenen Sicherheitsvektoren** mit den entsprechenden Empfängerstämmen sowie eine Auflistung bewilligter Gentherapieversuche mit den entsprechenden Vektorbezeichnungen.

<http://www.orcbs.msu.edu/biological/pdf/NIH-rDNA-99.pdf>

## 6.5 Datenbanken für Gentherapievektoren

Die Vektoren zur Gentherapie stammen aus einigen wenigen Virenklassen. Eine Datenbank, die nur diesen Gentherapievektoren gewidmet ist, stammt aus dem Jahre 1996:

<http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/viral.htm>

Eine aktuellere, lehrbuchmässige Zusammenstellung „MBChB Special Study Module Project Report“ von David Peel, Department of Microbiology & Immunology, University of Leicester. Diese Seite enthält weiterführende Links zu wissenschaftlicher Primärliteratur.

<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/peel/peel1.htm>

## 6.6 Research-Tools für Sequenzvergleiche

Die folgenden Internetseiten enthalten Hinweise auf Datenbanken und Programme, welche die Analyse von DNA und Protein-Sequenzen ermöglichen. Sie sind nützlich für vertiefende Recherchen.

<http://www.nih.go.jp/~jun/research/>

<http://medschool.wustl.edu/~ref/science/genetics.htm>

<http://www.ebi.ac.uk/Databases/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>

<http://www.expasy.ch/>

## 6.7 Lehrbücher

Zu Plasmiden und Vektoren werden alle paar Jahre umfassende Standardwerke veröffentlicht. Da die neuen Vektoren und Plasmide auf den älteren aufbauen, sind auch die älteren Publikationen als Nachschlagewerke geeignet.

Im schweizerischen Bibliothekenverbund NEBIS (Netzwerk von Bibliotheken und Informationsstellen in der Schweiz) [http://aleph.unibas.ch:4505/ALEPH/-/start/ids\\_suchmaschine](http://aleph.unibas.ch:4505/ALEPH/-/start/ids_suchmaschine) lassen sich diese Publikationen unter den Suchbegriffen „plasmids“ und „vectors“ leicht auffinden.

*Molecular cloning, A Laboratory Manual*

Sambrook J., Fritsch E.F., **Maniatis T.** Cold Spring Harbor Laboratory Press 1982-1989.  
3 Bände; Dicke **28 cm**  
ISBN 0-87969-309-6

*Current protocols in molecular biology*

ed. by Frederic M. Ausubel *et al.* (**Loseblattsammlung, vierbändig**)  
New York [etc.] : Wiley, 1987 bis 2000,  
ISBN 0-471-50338-X

**Sehr nützlich!** In diesem vierteljährlich aufdatierten und sehr umfangreichen Werk finden sich auch Angaben zu neueren Vektorsystemen mit Karten sowie allen Angaben für die experimentelle Anwendung.

*Vectors : a survey of molecular cloning vectors and their uses*

ed. by Rodriguez Raymond L., Denhardt David T.;  
Boston: Butterworths, cop. 1988; **578 S.**  
ISBN 0-409-90042-7

*Plasmids*

ed. by Peter Bennett and John Grinstead  
Harlow, Essex : Longman, 1996  
ISBN 0-582-10125-5

*Plasmids : a practical approach*

ed. by K. G. Hardy  
[Second ed.] Oxford [etc.] : IRL Press, cop. 1993; **252 S.**  
ISBN 0-19-963445-9 h/b; ISBN 0-19-963444-0 p/b  
Mehrere Publikationen in der Reihe: „The practical approach series“

*Vectors : cloning applications: essential techniques*

ed. by P. Jones  
Chichester [etc.] : Wiley [etc.], cop. 1998; **157 S.**  
ISBN 0-471-96266-X

## 6.8 Zeitschriften

Neben dem Zugang zur wissenschaftlichen Primärliteratur via die Datenbanken von *National Center for Biotechnology Information*, *National Library of Medicine* und *National Institutes of Health* kann direkt auf Zeitschriften zugegriffen werden.

Von Interesse ist die Zeitschrift:

*Plasmid*:

<http://www.academicpress.com/plasmid>

Gezielter Zugriff auf **diverse Zeitschriften** ist möglich via:

*Microbiology and Molecular Biology Reviews*

<http://mibr.asm.org/searchall/>

Harcourt: *ideal on line library*

<http://www.idealibrary.com/servlet/useragent?func=showHome>

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1999, 2000

<http://link.springer.de/search.htm>

## 7 Hintergrund und Erläuterungen

### 7.1 Unterschiedliche Anwendungen und Typen von Vektoren

Die ursprünglichen Vektoren wurden in den letzten 25 Jahren laufend an die Erfordernisse der Molekularbiologie angepasst. Für die unterschiedlichen Anwendungen wurden spezielle Typen von Vektoren konstruiert, was sich in den folgenden Bezeichnungen für Vektoren widerspiegelt:

- Klonierungsvektor (DNA-Amplifikation), Selektionsvektor
- Shuttle-Vektor (amplifizierbar in verschiedenen Spezies)
- Vektoren für eine generelle Verwendung (multipurpose/ multipurpose cloning)
- Sequenzierungsvektor
- Vektor mit hoher Kopienzahl
- Vektor mit induzierbarer (hoher) Kopienzahl
- Vektor mit erhöhter Stabilität
- Vektor für Mutagenese
- Expressionsvektor
- Vektor zur Proteinsekretion
- Vektor zur Proteinreinigung
- Plasmidretentionsvektor
- Gentherapievektor (ins Genom integrierender Vektor)
- Cosmid: lässt die Klonierung besonders langer DNA-Sequenzen zu (Liste nach BG Chemie, Merkblatt 008,4/93<sup>9</sup>, Seite 94)

Die unterschiedlichen Eigenschaften von Vektorsystemen widerspiegeln sich auch in der Grösse bzw. Länge des entsprechenden DNA-Moleküls. Die Grösse kann zwischen einigen wenigen Tausenden bis Millionen von Basenpaaren variieren.

### 7.2 Definition und Kurzbeschreibung wichtiger Vektorsysteme

Bei den nachfolgenden Definitionen und Beschreibungen handelt es sich zum grossen Teil um Grundlagenwissen der Molekularbiologie. Nur bei sehr spezifischen, wörtlich übernommenen Definitionen sind die Quellenangaben vermerkt.

---

<sup>9</sup> BG Chemie Merkblatt B 008 4/93 ZH 1/348; „Gentechnisch veränderte Organismen“ in der Reihe „Sichere Biotechnologie“

### 7.2.1 Molekulare Vektoren

Molekulare Vektoren sind biologische Träger (meist DNA-Moleküle), mit deren Hilfe Nukleinsäuren-Segmente in eine neue Zelle (Empfänger-/Wirtszelle) eingefügt werden können (Definition nach BG Chemie, Merkblatt 008,4/93<sup>10</sup>, Seite 112).

Die einfachsten Vektoren sind Plasmide; weitere Vektoren sind Phagen, Phasmide, Viren, Cosmide, yeast artificial chromosomes (YACs) oder bacterial artificial chromosomes (BACs).

### 7.2.2 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, ringförmige DNA-Moleküle, die bei Bakterien und Hefen vorkommen und sich unabhängig vom Hauptchromosom vermehren (replizieren) können. Sie tragen dazu notwendigerweise einen Replikationsursprung (Ori = *origin of replication*). Plasmide, welche sogenannte Transferegene (*tra*-Gene) besitzen, können von einem Bakterium auf ein anderes übertragen werden.

Häufig tragen Plasmide Gene für Resistenzfaktoren (z.B. gegen Antibiotika), die den Trägern einen Selektionsvorteil vermitteln. Manche natürliche Plasmide, wie das (Pflanzen-) tumor-induzierende *Ti*-Plasmid aus *Agrobacterium tumefaciens*, können sehr gross sein. Das *Ti*-Plasmid hat in seiner ursprünglichen Form über 200 kb (Kilobasen). Wenn das Vorhandensein eines Plasmids für ein Bakterium keinen Überlebensvorteil bietet, dann verliert es dieses mit der Zeit.

In Kapitel 7.3 wird auf zwei klassische Klonierungsvektoren, pBR322 und das *Bluescript*-Plasmid der Firma *Stratagene*, etwas näher eingegangen.

**Replikation** Die Replikation eines Plasmids beginnt am Replikationsursprung Ori (Ori = *origin of replication*). In der unmittelbaren Nachbarschaft des Ori liegen Gene für Proteine, die die Replikation des Plasmids regulieren (Induktion).

**Wirtsbereich** Man unterscheidet sogenannte „*broad-host-range*“ Plasmide und „*narrow-host-range*“ Plasmide. Man unterscheidet auch zwischen „*low copy number*“ Plasmiden (1-2 Kopien pro Zelle) und „*high copy number*“ Plasmiden (16 bis mehrere 100 Kopien pro Zelle).

### 7.2.3 Phasmide („*Phagemids*“)

Phasmide sind Klonierungsvektoren, die aus Anteilen von Plasmid- und Phagen-DNA zusammengesetzt sind. Sie können als Plasmid vermehrt und in Phagenpartikel verpackt werden (Definition nach BG Chemie, Merkblatt 008,4/93, Seite 110). Als typische Beispiele gelten die Vektorstrukturen mit dem Bakteriophagen Lambda.

---

<sup>10</sup> BG Chemie Merkblatt B 008 4/93 ZH 1/348; „Gentechnisch veränderte Organismen“ in der Reihe „Sichere Biotechnologie“

### 7.2.4 Lambda-Phagen Vektoren

Der Bakteriophage Lambda kann als Klonierungsvektor verwendet werden, indem seine nicht essenziellen Sequenzen durch die neu zu klonierenden Genabschnitte ersetzt werden (*Replacement*-Vektor). Der EMBL3 Vektor ist ein typisches Beispiel für einen Lambda-Phagen Vektor.

### 7.2.5 Cosmide

Ein Plasmidvektor, der durch ein cos-DNA-Segment des Bakteriophagen Lambda in Phagenhüllen verpackt werden kann und dadurch fähig ist, Fremd-DNA in einer Länge von 30- 50 kb aufzunehmen. Cosmide sind wichtige Klonierungsvektoren für genomische Genbanken. Ein Beispiel ist das pWE15 oder das *SuperCos*-Cosmid.

### 7.2.6 Shuttle Vektoren

Als Shuttle-Vektoren bezeichnet man solche, die sich in zwei stark unterschiedlichen Organismen (z.B. in Pro- und Eukaryonten) replizieren können. Ein solcher Vektor kann zwei „*origin of replication*“ haben; beispielsweise einer für gram-negative Bakterien und einer für Hefe.

### 7.2.7 Expressionsvektoren

Die bakteriellen oder viralen Vektoren (oder Mischformen davon) enthalten eine Expressionskassette mit allen notwendigen Regulationssequenzen, welche die (Protein-) Expression des integrierten Fremdgens erlauben. Je nach Regulationssequenzen kann das Fremdgen in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen exprimiert werden.

## 7.3 Glossar für ausgewählte Begriffe

<b>amphotrop</b>	Ein amphotroper Virusvektor kann murine (Maus), aber auch nicht-murine wie beispielsweise bovine oder humane Zellen infizieren. Dies ist deshalb möglich, weil die Verpackungszelllinie die virale RNA mit Hüllproteinen umgibt, welche die Zellen mit dem entsprechenden Rezeptor infizieren können. (siehe ecotrop). Detaillierte Ausführungen dazu finden sich in der ZKBS-Stellungnahme (1997) <sup>11</sup>
<b>ecotrop</b>	Im Gegensatz zum amphotropen Vektor hat der ecotrope Vektor ein enges Wirtsspektrum, das oft nur auf eine Spezies (Maus) begrenzt ist.

---

<sup>11</sup> „Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren“ Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit; Juni 1996; Quelle: <http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/VERGLEICHBARKEIT/RETRVEKT.HTM>



<b>Co-Transfer</b>	Zeitlich parallele Transformation mit zwei oder mehreren Vektoren, die sich in ihren Eigenschaften so ergänzen (komplementieren) können, dass ein Vektor mobilisierbar wird, ohne die entsprechenden Gene selber zu besitzen.
<b>episomal</b>	Ein Vektor ist episomal, wenn er als eigenständiges (extrachromosomales) Element in der Zelle existieren kann und nicht in deren Genom integriert ist. Das bedingt einen eigenen Replikationsursprung.
<b>Helferplasmide und Helferviren bzw. Helferphagen</b>	Helferplasmide können analog wie das Genom von Verpackungszellen die fehlenden Gene auf einem Vektor „ <i>in trans</i> “ ergänzen (komplementieren) und diesem so zeitlich vorübergehend ein grösseres Spektrum an Eigenschaften (Mobilisierbarkeit, Infektiosität u.a.) verleihen.
<b>„in cis“</b>	Die für eine bestimmte Eigenschaft notwendigen Gene ergänzen (komplementieren) sich „ <i>in cis</i> “, wenn die zwei Gene auf demselben DNA-Molekül liegen, beispielsweise auf demselben Plasmid oder Chromosom.
<b>„in trans“</b>	Die für eine bestimmte Eigenschaft notwendigen Gene ergänzen (komplementieren) sich „ <i>in trans</i> “, wenn die zwei Gene auf verschiedenen DNA-Molekülen liegen, also beispielsweise das eine Gen auf dem Vektor und das andere im Genom einer Empfängerzelle.
<b>Inkompatibilitätsgruppe</b>	Plasmide derselben Inkompatibilitäts-Gruppe werden nicht gleichzeitig in derselben Zelle repliziert; das heisst sie können nicht stabil miteinander existieren. Der Grund dafür ist das Vorhandensein gemeinsamer oder ähnlicher Regulationsmechanismen. Beispiel: ColE1 und pMB1 Plasmidabkömmlinge sind inkompatibel miteinander und gehören deshalb derselben Inkompatibilitäts-Gruppe an. {nach Aushubel <i>et al.</i> (1987 bis 2001; Seite 1.5.4.) <sup>12</sup> .
<b>Komplementierung</b>	Erweiterung der Eigenschaften eines Vektors durch ergänzende Gene, welche sich auf Helferplasmiden oder Helferviren oder im Genom der Wirtszelle befinden.
<b>Mobilisierbarkeit</b>	Nicht-konjugative Plasmide, denen die <i>tra</i> -Gene fehlen, können durch andere, gleichzeitig in der Zelle vorkommende, konjugative Plasmide mit <i>tra</i> -Funktion zum Übergang in andere Zellen mobilisiert werden. Die <i>tra</i> <sup>-</sup> -Plas

<sup>12</sup> Current protocols in molecular biology; ed. by Frederic M. Ausubel *et al.* (Loseblattsammlung, vierbändig) New York; Wiley, 1987 bis 2001, ISBN 0-471-50338-X

mide werde wiederum unterteilt in  $mob^-$ -Plasmide (keine direkte Mobilisierung) und  $mob^+$ -Plasmide (direkte Mobilisierung). Allerdings können auch  $tra^- mob^-$ -Plasmide übertragen werden, entweder durch Co-Transduktion oder nach Rekombination zu  $mob^+$  durch Co-Transfer. Siehe dazu auch Adelman (1996)<sup>13</sup>, Seiten 175 bis 180.

<b>Polylinker</b>	DNA-Abschnitt in einem Vektor mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme). Der Vektor wird nur einmal und nur im Polylinker aufgeschnitten und eignet sich deshalb für die Klonierung von Inserts.
<b>Verpackungszelllinien</b>	Verpackungszellen komplementieren die deletierten Gene eines Vektors „in trans“. Mit Hilfe der Verpackungszellen kann ein (viraler) Vektor in infektiöse virale Partikel verpackt werden. In Bezug auf die Biosicherheit ist zu beachten, dass die Wahrscheinlichkeit für die zufällige Rekombination zwischen Vektor und viralen Genen der Verpackungszelllinie sehr stark reduziert werden kann, wenn die viralen Gene im Genom der Zelllinie gezielt in mehrere Teile zerstückelt worden sind. Von der Zelllinie hängt die Breite des Infektionsspektrums eines viralen Vektors ab; also, ob ein Vektor $\rightarrow$ <i>ecotop</i> oder $\rightarrow$ <i>amphotrop</i> wird.

## 7.4 Ausgewählte Abkürzungen

<b>ampR</b>	Ampicillin-Resistenz (siehe bla-Gen)
<b>BAC</b>	<i>Bacteria artificial chromosome</i>
<b>bla</b>	Gen für die $\beta$ -Lactamase, welche die Ampicillin-Resistenz vermittelt (etwas weniger korrekt auch als <i>ampR</i> -Gen bezeichnet).
<b>bom</b>	Diese Region ist notwendig für den DNA-Transfer und enthält die <i>nic</i> -Stelle (BG Chemie, B 008 4/93).
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein: Fluoreszenzmarker, der in Expressionsvektoren integriert ist und als Abkürzung GFP oder auch nur in Form eines G's in der Plasmidbezeichnung Platz findet.
<b>MCS</b>	<i>Multiple cloning site</i> (siehe Polylinker)

<sup>13</sup> Adelman S. und Schulze-Halberg H. (Hrsg); Arbeitsschutz in Biotechnologie und Gentechnik; Springer 1996, ISBN 3-540-57978-8

<b>mob</b>	Die mob-Gene sind die Mobilisierungsgene und Bestandteil des gesamten Transfersystems.
<b>nic</b>	Der für den Transfer erforderliche DNA-Strangbruch erfolgt an dieser spezifischen Spaltstelle (BG Chemie, B 008 4/93).
<b>ori</b>	<i>Origin of replication</i> = Replikationsursprung
<b>rop</b>	„ <i>repression of plasmid</i> “: Ist dieser Genabschnitt deletiert, führt das zu einer erhöhten Zahl (bis zu 100 je Zelle) an Plasmid-Kopien (BG Chemie, B 008 4/93).
<b>tetR</b>	Tetracyclin-Resistenz
<b>tra</b>	tra-Gene bilden einen Satz von Genen, welche für die (natürliche) Übertragbarkeit von Plasmiden von Zelle zu Zelle verantwortlich sind. Dieses Transfersystem besteht aus Transfer- und Mobilisierungsgenen.
<b>YAC</b>	<i>Yeast artificial chromosome</i>

## 8 Schlussbemerkung

### 8.1 Beurteilung der recherchierten Informationen und Risikobewertung

Die Risikobewertung eines (rekombinanten) Vektors bedingt die Interpretation von Informationen, die aus den in dieser Studie zusammengestellten Quellen stammen können. Weil die meisten Vektorsysteme heute ein Puzzle von Sequenzen ganz unterschiedlicher viraler, pro- und eukaryontischer Herkunft bilden, ist die Risikobewertung – insbesondere bei der parallelen Verwendung mehrerer Vektorsysteme – äusserst anspruchsvoll. Es gibt keine einfache methodische Anleitung für die Risikobewertung; nicht von ungefähr spricht man in diesem Zusammenhang von einem „*step-by-step*“ und „*case-by-case*“ Vorgehen.

Für die Risikobewertung von Vektoren ist die Beurteilung der Mobilisierbarkeit ein zentraler Aspekt. Es gibt sogenannte Sicherheitsplasmide oder Sicherheitsvektoren, bei denen die Mobilisierungssequenzen deletiert sind. Bei Gentherapievektoren ist zusätzlich die Fähigkeit zur Replikation eliminiert. Für die biologische Sicherheit ist entscheidend, wie schnell und unter welchen Umständen ein Vektor die fehlenden Sequenzen für seine Mobilisierbarkeit, Replizierbarkeit oder Infektiosität wieder erlangen kann. Dies kann geschehen durch Rekombination mit Wildtypen, durch Ergänzung (Komplementierung) mit Genen von der Insert-DNA oder durch Verunreinigungen mit Helferplasmiden oder Helferviren.

In der Einschliessungsverordnung ist in Anhang 2.2 (nach Art. 22 Abs. 1 Bst. b) ausgeführt, welche Anforderungen an einen Vektor und an die Empfängerzelle gestellt werden, um als biologisches Sicherheitssystem anerkannt zu werden.

Bei der Risikobewertung von Vektoren gilt es auch, die Möglichkeit der („*in trans*“) Komplementierung von Eigenschaften zu berücksichtigen und deren Wahrscheinlichkeit und Konsequenzen abzuschätzen. Es ist möglich, dass durch Rekombination unter bestimmten Umständen (wie Verwendung von Helfersystemen oder bei Kontaminationen) Vektoren entstehen können, die von ihren Eigenschaften her näher beim ursprünglichen Wildtyp liegen als beim anfänglich eingesetzten Sicherheitsvektor. Wenn mit Vektoren unterschiedlicher Herkunft experimentiert wird, können sich Vektorsequenzen oder auch Insertsequenzen in dem Sinne ergänzen, als daraus rekombinante Vektoren mit Eigenschaften entstehen, welche für das Experiment oder aus Sicht des biologischen Sicherheit unerwünscht sind.

### 8.2 Weiterführende Schritte

Mit dem vorliegenden Projekt werden zwei Recherchierhilfen vorgestellt, welche die Informationsbeschaffung zu einzelnen, unbekanntem Vektoren erleichtern. Als Weiterführung dieses Projekts kann in der gleichen Vorgehensweise wie für die „Informationsbeschaffung für Vektorsysteme“ auch die „biologische Sicherheit ausgewählter Vektorsysteme“ beurteilt werden.

Davon ausgehend lassen sich bis zu einem gewissen Grad methodische Gesetzmässigkeiten und Vorgehensweisen ableiten.

Langfristiges Ziel wäre eine Liste mit Vektorsystemen, die von den behördlichen Fachstellen abschliessend bewertet wurden, und für die ein Gesuchsteller keine ausführlichen Unterlagen mehr einzureichen hat. Die deutschen Bewilligungsbehörden führen eine solche Liste (siehe dazu Kapitel 6.4). Diese Liste würde die Arbeit der Gesuchsteller und die behördliche Risikobewertung gleichermassen vereinfachen.

## Danksagung

Mein spezieller Dank geht an Frau Dr. Kathrin Bernard-Summermatter und Herrn Dr. Thomas Binz von der Fachstelle Biosicherheit des Bundesamtes für Gesundheit BAG, welche diese Studie finanziert und fachlich begleitet haben.

Mein Dank gilt zudem PD Dr. Richard Felleisen, Abteilung Umweltschutz und Gifte des Kantonalen Laboratoriums Bern, für seine wertvollen Kommentare und Ergänzungen zu dieser Studie.