



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8300698**

Nederland

⑲ NL

⑤④ **Werkwijze voor het inbouwen van vreemd DNA in het genoom van tweezaadlobbige planten; Agrobacterium tumefaciens bacteriën en werkwijze voor het produceren daarvan; planten en plantecellen met gewijzigde genetische eigenschappen; werkwijze voor het bereiden van chemische en/of farmaceutische produkten.**

⑤① Int.CP.: C12N 15/00.

⑦① Aanvragers: Rijksuniversiteit Leiden te Leiden en Prof. Dr. Robbert Adriaan Schilperoort te Oegstgeest.

⑦④ Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.
Octroobureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

②① Aanvraag Nr. 8300698.

②② Ingediend 24 februari 1983.

③② --

③③ --

③① --

⑥② --

④③ Ter inzage gelegd 17 september 1984.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze voor het inbouwen van vreemd DNA in het genoom van tweezaadlobbige planten; Agrobacterium tumefaciens bacteriën en werkwijze voor het produceren daarvan; planten en plantecellen met gewijzigde genetische eigenschappen; werkwijze voor het bereiden van chemische en/of farmaceutische producten.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het inbouwen van vreemd DNA in het genoom van tweezaadlobbige planten door de planten te infecteren of planteprotoplasten te incuberen met Agrobacterium tumefaciens bacteriën, die een of meer plasmiden bevatten.

Het is bekend, dat het Ti-plasmide van A. tumefaciens essentieel is voor het vermogen van deze bacterie om de vorming van zogenaamde "Crown gall" tumoren (wortelknobbelziekte) op tweezaadlobbige planten te veroorzaken (van Larebeke et al, Nature (London) 252, 169-170 (1974); Watson et al, J. Bacteriol. 123, 255-264 (1975); Zaenen et al, J. Mol. Biol. 86, 109-127 (1974)). Een deel van dit plasmide, aangeduid als het T-DNA, wordt bij de tumorinductie in het plantengenoom (het chromosomale DNA) geïntegreerd (Chilton et al, Cell 11, 263-271 (1977); Chilton et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 4060-4064 (1980); Thomashow et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 6448-6452 (1980); Willmitzer et al, Nature (London) 287, 359-361 (1980)) en ondervindt tenminste gedeeltelijk transcriptie tot RNA (Drummond et al, Nature (London) 269, 535-536 (1977); Ledebouer, proefschrift Rijks Universiteit Leiden (1978); Gurley et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 2828-2832 (1979); Willmitzer et al, Mol. Gen. Genet. 182, 255-262 (1981)). De tumorcellen vertonen een fytohormoon onafhankelijke groei en bevatten een of meer ongewone aminozuurderivaten, bekend als opines, waarvan octopine en nopaline de meest bekende zijn. Het T-DNA van een octopine Ti-plasmide omvat een gen, dat codeert voor het enzym lysopinedehydrogenase (LpDH), dat de tumorcel nodig heeft voor de synthese van octopine (Schröder et al, FEBS Lett. 129, 166-168 (1981)). Het plasmide bevat verder genen voor het gebruik van deze opines door de bacterie (Bomhoff et al, Mol. Gen. Genet. 145, 177-181 (1976); Montoya et al, J. Bacteriol. 129, 101-107 (1977)). Indien het T-gebied op het plasmide ontbreekt, worden geen tumoren geïnduceerd (Koekman et al, Plasmid 2, 347-357 (1979)). Behalve het T-gebied, blijkt nog een ander

gebied op het Ti-plasmide essentieel te zijn voor het tumorinducerend vermogen van de bacterie (Garfinkel et al, J. Bacteriol. 144, 732-743 (1980); Ooms et al, J. Bacteriol. 144, 82-91 (1980)), welk deel echter niet in de plantetumorcellen is aangetroffen. Dit ongeveer 20 Md lange gebied, waarin mutaties complementeerbaar in trans blijken te zijn, wordt het vir (virulentie) gebied genoemd (Hille et al, Plasmid 6, 151-154 (1981); Hille et al, Plasmid 7, 107-118 (1982); Klee et al, J. Bacteriol. 150, 327-331 (1982)).

Uit het bovenstaande zal duidelijk zijn, dat de prokaryotische bacterie A. tumefaciens een in de natuur voorkomend systeem voor genetische manipulaties van eukaryotische planten heeft. Het T-DNA gebied van het Ti-plasmide lijkt zich te lenen voor het inbouwen van vreemd DNA, in het bijzonder genen die voor bepaalde gewenste eigenschappen coderen, in het genoom van plantecellen, te meer omdat het in beginsel mogelijk is om de genen die de tumor doen ontstaan, uit te schakelen zonder tegelijk de inbouw van de nieuwe genen te blokkeren. Een eerste mogelijkheid lijkt om plantecellen te transformeren door planten te infecteren met A. tumefaciens bacteriën die een of meer Ti-plasmiden bevatten, waarvan het T-gebied op de gewenste wijze is gemanipuleerd. Nog beter is om planteprotoplasten te incuberen met dergelijke A. tumefaciens bacteriën.

Nu zal het introduceren van nieuwe genen in het T-DNA met behulp van recombinant-DNA technieken om praktische redenen bij voorkeur in Escherichia coli worden uitgevoerd. Het Ti-plasmide is echter normaliter niet te handhaven in E. coli (het replicateert niet in deze gastheer). Dus wordt in de bestaande procedures een zogenaamde "shuttle" vector gebruikt die in E. coli en A. tumefaciens replicateert en waarin het T-DNA wordt ingebracht. Vervolgens worden in dit T-DNA nieuwe genen ingebouwd. Het complete Ti-plasmide is echter noodzakelijk om via A. tumefaciens cellen te transformeren. Dit komt doordat het Ti-plasmide het essentiële vir-gebied bevat waarop genen liggen die zorgen voor selectie van T-DNA (vermoedelijk door herkenning van basesequenties aan de uiteinden van dit DNA) en de overdracht naar de plant.

Aangezien het Ti-plasmide zich niet handhaaft in E. coli wordt bij de bestaande procedures de shuttle-vector met het gemanipuleerde T-DNA overgebracht naar een A. tumefaciens die een compleet Ti-plasmide bevat dat kan voortbestaan naast de shuttle-vector. Aangezien

8300698

de shuttle vector T-DNA delen bevat die ook aanwezig zijn in het T-DNA van het Ti-plasmide wordt dubbele "crossing-over" tussen de homologe delen van beide T-DNA's geforceerd. Daarmee worden nu de nieuwe genen ingebouwd in het complete Ti-plasmide.

5 Bestaande procedures voor de plaatsgerichte mutatie van Ti-plasmiden worden beschreven door Leemans et al, The Embo Journal 1, 147-152 (1982); Matzke et al, J. Mol. Appl. Genet. 1, 39-49 (1981); zie voor het algemene principe, waarop deze technieken zijn gebaseerd, Ruvkun et al, Nature (London) 289, 85-88 (1981). Steeds wordt de laatste trap van de Ti-plasmide mutatie in Agrobacterium zelf uitgevoerd, omdat het gastheerbereik van Ti-plasmiden tot Rhizobiaceae beperkt is. Nadat een gekloneerd fragment van het Ti-plasmide in E. coli is gemuteerd door bijvoorbeeld invoeging (insertie) van een transposon, wordt het gemuteerde fragment gesubkloneerd op een vector met breed
10 gastheerbereik en overgebracht in een Ti-plasmide bevattende Agrobacterium stam. Hierin wordt het ingevoegde DNA door homologe re-combinatie via dubbele crossing-over in het Ti-plasmide opgenomen, waarna hetzij het plasmide met breed gastheerbereik met behulp van een onverenigbaar plasmide wordt vernietigd, hetzij het Ti-plasmide door conjugatie wordt overgebracht naar een andere Agrobacterium ontvangerbacterie. Door onderzoek van de transconjuganten wordt gecontroleerd of
15 de juiste mutatie van het Ti-plasmide heeft plaatsgevonden.

Deze bekende procedures zijn nogal omslachtig en geven technische problemen, hetgeen voorkomen zou worden indien de plaatsgerichte mutatie van het Ti-plasmide zelf direkt in E. coli kon worden
25 uitgevoerd. Het Ti-plasmide mist echter een replicator die in E. coli kan functioneren.

Verrassenderwijze is nu gevonden, dat de gewenste overdracht van DNA vanuit A. tumefaciens bacteriën naar plantecellen, waarin het overgebrachte DNA in het genoom wordt ingebouwd, ook kan worden
30 gerealiseerd indien de vereiste vir- en T-gebieden op twee verschillende plasmiden zijn gelegen.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat A. tumefaciens bacteriën worden gebruikt, welke ten minste één
35 plasmide, dat het vir-gebied van een Ti (tumor-inducerend)-plasmide maar geen T-gebied heeft, en ten minste één ander plasmide, dat een T-gebied met daarin ingebouwd vreemd DNA maar geen vir-gebied heeft,

8300698

bevatten.

De uitvinding presenteert nieuwe A. tumefaciens bacteriën, geschikt voor toepassing in de bovenvermelde werkwijze volgens de uitvinding, welke gekenmerkt zijn doordat ze ten minste één plasmide, dat
5 het vir-gebied van een Ti (tumor-inducerend)-plasmide maar geen T-gebied heeft, en ten minste één ander plasmide, dat een T-gebied met daarin ingebouwd vreemd DNA maar geen vir-gebied heeft, bevatten.

De nieuwe A. tumefaciens bacteriën volgens de uitvinding kunnen worden geproduceerd door in Escherichia coli bacteriën vreemd
10 DNA in te bouwen in het T-gebied van een plasmide, dat een T-gebied en een replicator met een breed gastheerbereik bevat, en het verkregen plasmide te introduceren in A. tumefaciens bacteriën, die ten minste één plasmide bevatten, dat het vir-gebied van een Ti-plasmide maar geen T-gebied heeft.

15 De uitvinding verschaft tevens planten en plantecellen, die verkregen zijn nadat onder toepassing van de werkwijze volgens de uitvinding de genetische eigenschappen van de oorspronkelijke planten c.q. plantecellen zijn gewijzigd.

Het nut van de werkwijze volgens de uitvinding, waarbij
20 planten of plantecellen met gewijzigde genetische informatie worden verkregen, kan gelegen zijn in het veredelen van de planten (kweken van een veredeld ras, dat bijv. beter bestand is tegen herbiciden), alsmede in het realiseren van een bioreactor, bestaande uit gefermenteerde en eventueel daarna geïmmobiliseerde plantecellen die in grote hoeveelheden een bepaald gewenst translatieproduct, bv. enzym, of een secundair
25 metaboliet van de plantecel produceren.

De werkwijze volgens de uitvinding biedt dus de mogelijkheid, mutanten van hogere planten met genetisch verbeterde respectievelijk veranderde eigenschappen te vervaardigen. Dit is - zoals eerder
30 opgemerkt - van groot belang voor de plantenveredelingsindustrie, te meer daar uit de weefsellijnen welke onder toepassing van de werkwijze volgens de uitvinding worden verkregen, in een vroeg stadium na de DNA-transformatie regeneraten verkregen kunnen worden.

Verder hebben de cellen met autotrofe groei welke onder toepassing van
35 de werkwijze volgens de uitvinding worden verkregen, bijvoorbeeld de Crown gall cellen, voor een goede groei in een fermentator slechts een zeer eenvoudig synthetisch medium nodig, waaraan o.a. geen fyto-

hormonen behoeven te worden toegevoegd. Aldus verkregen cellen, waar-
bij vreemd DNA is ingebracht, kunnen op grote schaal worden gekweekt
voor de bereiding van die stoffen, waarvoor het vreemde DNA codeert,
zoals alkaloiden, aminozuren, koolwaterstoffen, eiwitten, enzymen,
5 steroiden enz. (vergelijk Impact of Applied Genetics, Micro Organisms,
Plants and Animals. OTA Report, Congress of the United States Office
of Technology Assessment, Washington, 1981).

Volgens de uitvinding worden A. tumefaciens bacteriën
gebruikt cq. geproduceerd, die twee verschillende compatibele plasmiden
10 bevatten. Het ene plasmide bevat het vir-gebied, maar mist een T-gebied
zodat het als zodanig geen tumor-inducerend vermogen heeft. Het andere
plasmide draagt het gemanipuleerde T-gebied op een replicon met breed
gastheerbereik, maar mist het vir-gebied, zodat ook dit plasmide als
zodanig geen tumor-inducerend vermogen bezit. Een A. tumefaciens stam,
15 die beide plasmiden herbergt, heeft daarentegen een normaal tumor-indu-
cerend vermogen of, meer algemeen, het vermogen om DNA in te bouwen in
het genoom van tweezaadlobbige planten, zoals tomaat, tabak, petunia,
aardappel, peulvruchten, e.d.

De uitvinding maakt het mogelijk dat het plasmide met
20 T-gebied maar zonder vir-gebied van een zodanige kleinere grootte wordt
gekozen, dat het gemakkelijk in E. coli als gastheer genetisch kan
worden gemanipuleerd. Wanneer het daarbij verkregen plasmide naar een
A. tumefaciens stam wordt overgebracht, die het plasmide met het vir-
gebied maar geen T-gebied herbergt, wordt de mogelijkheid geschapen
25 om het gemanipuleerde T-gebied in de plantecellen te introduceren.
Het binaire vectorsysteem volgens de uitvinding voor genetische manipu-
latie van plantecellen heft de noodzaak op om daarvoor een intact Ti-
plasmide te gebruiken, met alle daaraan verbonden nadelen. Tevens is
volgens de uitvinding een geforceerde "crossing-over" die aanleiding
30 tot complicaties kan geven, niet langer nodig.

Door het wegvallen van de noodzaak geforceerde "crossing-
over" toe te passen voor het opnemen van een nieuw gen of genen in het
T-DNA van het intacte Ti-plasmide heeft het binaire vectorsysteem
bovendien het voordeel dat het niet meer noodzakelijk is ongewenste
35 genen, waaronder bijvoorbeeld de onc-genen of delen daarvan, van het

T-DNA tezamen met het nieuwe gen of genen in de plantechromosomen in te bouwen. Met het binaire vectorsysteem is het nu mogelijk geworden volledig "kunstmatig" T-DNA, zoals bijvoorbeeld beschreven is in Fig. 5, te construeren en vervolgens in chromosomen in te bouwen.

5 De uitvinding wordt onderstaand aan de hand van de tekening, waarin

Fig. 1 schematisch de constructie van het plasmide pAL1050 toont;

Fig. 2 een fysische kaart van het plasmide pTiAch5 toont;

10 Fig. 3 een schematisch beeld van een octopine Ti-plasmide toont;

Fig. 4 schematisch de uitvinding in beeld brengt; en

Fig. 5 schematisch de structuur van normaal T-DNA en van gemanipuleerd, "kunstmatig" T-DNA, zoals ingebouwd in het plantengenoom, weergeeft;

15 alsmede aan een beschrijving van uitgevoerde experimenten nader toegelicht.

Tevens worden voorbeelden beschreven van experimenten waarbij met de aldus beschreven uitvinding daadwerkelijk zowel een
20 nieuw gen in het T-DNA is gemanipuleerd en overgebracht naar de plantecel als dat een geheel "kunstmatig" T-DNA werd gebruikt met hetzelfde doeleinde.

Teneinde een plasmide te verkrijgen, dat het gehele T-gebied van het octopine Ti-plasmide pTiAch5 bevat en zowel in A.tumefaciens als in E.coli in staat is tot autonome replicatie, is van
25 het recombinant plasmide POTY8 gebruik gemaakt. Dit plasmide is een derivaat van het plasmide pJDB207 (Beggs, Molec. Genet. in Yeast, Alfred Benson Symp. 16, 383-389 (1981)), verkregen door het T-gebied van pTiAch5 in te voegen in de locus voor tetracycline-resistentie.
30 Als genetische markers bevat dit plasmide POTY8 verder het ampicilline-resistentie gen (Ap) van het plasmide pAT153 (Twiggg et al, Nature 283, 216-218 (1980) alsmede een LEU-2 gen. Het plasmide POTY8 wordt schematisch weergegeven in Fig. 1. De herkenningsplaatsen voor de restrictie-enzymen PstI en BamHI zijn hierin aangegeven.

Aangezien dit plasmide niet kan repliceren in A.tumefaciens bacteriën, is het plasmide omgezet in een plasmide met breed gastheerbereik door fusie met het IncP plasmide R772. Hiertoe werd R772 door conjugatie in de stam HB101 (met plasmide POTY8) geïntro-
5 ceerd, waarna transconjuganten van deze kruising als donors werden ge-
bruikt in verdere kruisingen met de A.tumefaciens stam LBA202. Hier-
van werden transconjuganten geselecteerd op de aanwezigheid van de am-
picilline-resistentie marker van POTY8. Naar verwacht werd, zouden deze
10 stammen een coïntegraat plasmide van POTY8 en R772 bevatten, omdat
POTY8 zelf niet conjugatief is en in Agrobacterium niet kan repliceren.
De opname van R772 zou in hetzij het vectorgedeelte, hetzij het T-
gebied deel van POTY8 kunnen hebben plaatsgevonden. Om complementatie
experimenten te kunnen uitvoeren is alleen een coïntegraat van belang,
dat een intact T-gebied bevat. Daarom werden vervolgens 30 transconju-
15 ganten geconjugerd met de E. coli stam JA221 (C600 trpE leu B, zie
Beggs, Nature 275, 104-109 (1978)), waarna de nakomelingschap op leu-
cine auxotrofie werd onderzocht. Eén van de 30 transconjugant stammen
bleek niet te groeien op een minimaal medium zonder toegevoegd leucine.
Waarschijnlijk bevatte deze stam een R772::POTY8 coïntegraat plasmide,
20 waarin de expressie van het gen LEU-2 door de opname van R772 was ge-
inactiveerd. Analyse van restrictie endonuclease patronen van dit
R772::POTY8 plasmide, dat pAL1050 werd genoemd, liet zien dat het plas-
mide pAL1050 een invoeging van R772 in het pJDB207 deel van POTY8 had,
terwijl het T-gebied ongewijzigd was gebleven. De structurele orga-
25 nisatie werd verder bevestigd door hybridisatie experimenten aan
Southern blots (Southern, J. Mol.Biol. 98, 503-518 (1975)) met behulp
van gelabeld plasmide DNA van R772 en POTY8. Het plasmide pAL1050 en
de wijze waarop het vervaardigd is, zijn schematisch in Fig. 1 weerge-
30 geven. Hierin is het T-gebied gearceerd. Eén van de twee kopieën van
de insertie-sequentie IS70 is gedeeltelijk verloren gegaan, hetwelk de gewon-
den stabiliteit van het coïntegraat plasmide pAL1050 verklaart.

Het plasmide pAL1050 werd in een niet-oncogene A.tumefaciens stam (ontdaan van zijn Ti-plasmide) geïntroduceerd, waarna on-
35 derzocht werd of door deze introductie van pAL1050 het tumor-inducerend
vermogen van de stam kon worden hersteld. Dit bleek conform de verwach-
tingen (het vir-gebied ontbreekt!) niet het geval te zijn, zoals uit de

verderop geplaatste tabel moge blijken.

Vervolgens werd pAL1050 door conjugatie overgebracht in de niet-oncogene A.tumefaciens stam LBA4404 (Ooms et al, Gene 14, 33-50 (1981)), die een sterk verkleind Ti-plasmide bevatte, dat het gehele T-gebied miste, maar nog wel een intact vir-gebied bezat (zie Fig. 2). Fig. 2 toont een kaart van het plasmide pTiAch5, waarin het op pAL1050 aanwezige T-gebied zwart is gemaakt en het op pAL4404 aanwezige gedeelte, dat het vir-gebied omvat, gearceerd is weergegeven.

Het vermogen tot tumor inductie van de transconjugant stam LBA4434, die zowel het plasmide pAL1050 met T-gebied als het plasmide pAL4404 met vir-gebied bevatte, werd bij verscheidene plantensoorten getest. Hierbij bleek, dat de stam LBA4434 op alle onderzochte planten normale tumoren induceerde, waarin octopine kon worden gedetecteerd. (Zie de tabel).

15

T A B E L
plantentumorinductie proeven

stam	plasmiden	tomaat		kalanchoë		tabak		erwt	
		tumor	ocs*	tumor	ocs	tumor	ocs	tumor	ocs
20 LBA4001	Cr**, pTiAch5	+	+	+	+	+	+	+	+
LBA4404	Cr, pAL4404	-		-		-		-	
LBA1050	Cr, pAL1050	-		-		-		-	
LBA4434	Cr, pAL1050, pAL4404	+	+	+	+	+	+	+	+

25 *) ocs = octopine synthese in de tumor, gedetecteerd volgens Otten en Schilperoort, Biochem. Biophys. Acta 527, 497-500 (1978)

***) Cr = het grote cryptische plasmide van A. tumefaciens stam Ach5.

Deze experimenten tonen dat het vir-gebied en het T-gebied van het octopine Ti-plasmide fysisch gescheiden kunnen worden op verschillende plasmiden, zonder dat daardoor het tumor-inducerend vermogen van de bacterie wordt aangetast. Aangezien A. tumefaciens bacteriën met alleen het plasmide pAL1050 geen tumoren kunnen induceren, tonen de gevonden resultaten aan dat genen in het vir-gebied werkzaam zijn bij de overbrenging van het T-gebied naar de plantecel.

35

Men zou kunnen denken dat de oncogeniteit van de Agrobacterium stam LBA4434 veroorzaakt kan zijn door de vorming van

8300698

een coïntegraat plasmide tussen pAL4404 en pAL1050 in een klein deel van de bacteriën. Dit is echter om de volgende redenen niet erg waarschijnlijk. Op de eerste plaats werd door hybridisatie experimenten aan Southern blots aangetoond dat er tussen de twee plasmiden geen ho-

5 mologie bestaat. Hierdoor is uitgesloten, dat door homologe recombina-
tie tussen beide plasmiden een coïntegraat is gevormd.

Op de tweede plaats werd bij kruising van LBA4434 (met de plasmiden pAL1050 en pAL4404) met LBA4078, een van het Ti-plasmide ontdane, erythromycine-resistente A. tumefaciens stam als ontvangende bacterie,

10 geen co-transfer van het niet-conjugatieve plasmide pAL4404 met het Inc-P plasmide pAL1050 gedetecteerd (frequentie lager dan 10^{-4}), waaruit volgt, dat geen of hooguit met zeer lage frequentie coïntegraatvorming door niet-legitieme recombina-
tie had plaatsgevonden. Dit impli-
ceert dat door eventuele coïntegraatvorming geen significante bijdrage

15 aan de tumor-inductie kan zijn geleverd. Immers, wondinfecties met mengsels van oncogene en niet-oncogene A. tumefaciens stammen in lage verhoudingen, leiden niet tot tumorvorming (Lippincott et al, J. Bact. 97, 620-628 (1969)) als gevolg van competitie tussen de bacteriën voor een beperkt aantal bindingsplaatsen op de plantecellen. De door LBA4434 ge-

20 induceerde tumoren zijn echter even groot als die, welke door de wild type stam Ach5 worden geïnduceerd. Dit maakt het uiterst onwaarschijnlijk, dat de tumor-inductie door LBA4434 veroorzaakt wordt door een gemengde celpopulatie, die voornamelijk bestaat uit niet-oncogene cellen en slechts een zeer beperkt aantal cellen met een coïntegraat plasmide

25 bevat.

Fig. 3 geeft een beeld van een octopine Ti-plasmide, on-
derverdeeld in een voor tumor-inductie verantwoordelijk deel en een voor de afbraak van octopine (octopine catabolisme gen Occ) en arginine (arginine catabolisme gen Arc) verantwoordelijk deel. Tra, Inc en Rep zijn functies voor respectievelijk conjugatie, incompatibiliteit en

30 replicatie. Aux, Cyt en Ocs zijn loci voor respectievelijk auxine- en cytokinine-achtige effecten en voor octopine synthese in de tumorcel.

Fig. 4a toont schematisch de tumor-inductie, die veroorzaakt wordt bij infectie van planten of incubatie van planteprotoplasten met A. tumefaciens bacteriën, die een intact Ti-plasmide bevatten.

35

Fig. 4b en Fig. 4c tonen, dat zowel A. tumefaciens bac-

teriën die alleen een plasmide A zonder T-gebied (Fig. 4b), als A.tumefaciens bacteriën, die alleen een plasmide B zonder vir-gebied (Fig. 4c) bevatten, geen tumor-inducerend vermogen bezitten.

5 Fig. 4d toont, dat tumor-inductie wel mogelijk is, indien de bacteriën beide plasmiden tegelijk bevatten.

Fig. 4e toont de werkwijze volgens de uitvinding, waarbij gebruik wordt gemaakt van A.tumefaciens bacteriën, die zowel een plasmide A met vir-gebied maar zonder T-gebied, als een plasmide B met genetisch gemanipuleerd T-gebied maar zonder vir-gebied bevatten; het
10 genetisch gemanipuleerde T-gebied wordt in het genoom van de behandelde plantecellen ingebouwd.

Fig. 5 toont in groter detail de structuur van het T-gebied van octopine Ti-plasmiden, na inbouw in het plantegenoom. Aan de uiteinden van het T-gebied bevindt zich een speciale basevolg-
15 orde van ongeveer 23 baseparen (bp), die betrokken zijn bij de integratie van het T-DNA in het plantegenoom. Tevens wordt een "kunstmatig" T-gebied, ingebouwd in het plantegenoom, getoond, dat één of meer gewenste genen en een marker gen voor de selectie van transformanten bevat. Om expressie van deze genen in de plantecel mogelijk te maken zijn
20 speciale basevolgorden aanwezig, waaronder een plantepromotor (Pp) als startplaats voor de transcriptie in RNA (→), die de regulatie van de genexpressie in eukaryoten verzorgen.

VOORBEELD

Om de bruikbaarheid van de beschreven uitvinding te toetsen aan de praktijk werd een experiment uitgevoerd, waarbij een bacterieel gen met het binaire vectorsysteem naar de plantecel werd overgebracht. Gekozen werd voor het gen dat codeert voor het enzym chloramphenicol transacetylase, dat binnen de bacterie tot expressie komt en zorgt voor resistentie van de gastheer tegen het antibioticum chloramphenicol.
30 Dit resistentie-gen ligt op een DNA fragment dat werd gemanipuleerd in het plasmide pAL1050, welke bewerking binnen de gastheer Escherichia coli werd uitgevoerd. Vervolgens werd het aldus verkregen, van pAL1050 afgeleide plasmide, dat nu de genetische informatie voor chloramphenicol resistentie draagt, overgedragen d.m.v. conjugatie (paring) naar de
35 Agrobacterium tumefaciens stam LBA4404, die een sterk verkleind Ti-

plasmide bevatte, dat het gehele T-gebied miste, maar nog wel een intact vir-gebied bezat (zie Fig. 2). De aldus verkregen A. tumefaciens, met het gemanipuleerde T-gebied en het vir-gebied op gescheiden plasmiden, werd gebruikt voor de infectie van een plant, waardoor kon worden na-
5 gegaan of cellen dusdanig werden getransformeerd dat een tumor ontstaat met de karakteristieken die kenmerkend zijn voor de aanwezigheid van tumorcellen met een T-DNA, waarin op een bekende plaats een vreemd stuk DNA is gemanipuleerd. De plaats op het T-gebied van het plasmide pAL1050, waarin het eerder genoemde DNA fragment was ingebouwd, was zo-
10 danig gekozen, dat op grond van reeds bekende gegevens, van de aangebrachte mutatie bij overdracht van het gemanipuleerde T-gebied naar plantecellen verwacht kon worden dat de aldus ontstane tumor de karakteristieke morfologie van extreme adventief wortelontwikkeling zou vertonen op Kalanchoë daigremontiana en Nicotiana tabacum. Het resultaat
15 van de uitgevoerde infectieproef gaf inderdaad de verwachte tumormorfologie te zien, waaruit derhalve geconcludeerd mag worden dat met de beschreven uitvinding het genoemde vreemde DNA fragment in het plantegenoom werd ingebouwd.

Ook zijn reeds meerdere "kunstmatige" T-DNA's geconstrueerd zoals is
20 aangegeven in Fig. 5, waarbij als plantenmarker het gen werd gebruikt dat codeert voor een enzym genaamd lysopinedehydrogenase of octopine synthase. Dit enzym katalyseert in plantecellen o.a. de synthese van octopine door reductieve condensatie van arginine en pyrodruivenzuur. Door infectie van planten overeenkomstig de werkwijze volgens de uit-
25 vinding werden tumoren geïnduceerd, die inderdaad octopine konden synthetiseren.

De Agrobacterium tumefaciens stammen LBA 4404 en LBA 1050 zijn gedeponerd en verkrijgbaar bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) te Baarn, Nederland.

* C O N C L U S I E S *

1. Werkwijze voor het inbouwen van vreemd DNA in het
genoom van tweezaadlobbige planten door de planten te infecteren of
planteprotoplasten te incuberen met Agrobacterium tumefaciens bacte-
riën, die een of meer plasmiden bevatten,
5 met het kenmerk, dat A. tumefaciens bacteriën worden gebruikt, welke
ten minste één plasmide, dat het vir-gebied van een Ti (tumor-induce-
rend)-plasmide maar geen T-gebied heeft, en ten minste één ander plas-
mide, dat een T-gebied met daarin ingebouwd vreemd DNA maar geen vir-
gebied heeft, bevatten.
- 10 2. Agrobacterium tumefaciens bacteriën, geschikt voor
toepassing in de werkwijze volgens conclusie 1,
met het kenmerk, dat ze ten minste één plasmide, dat het vir-gebied
van een Ti (tumor-inducerend)-plasmide maar geen T-gebied heeft, en
ten minste één ander plasmide, dat een T-gebied met daarin ingebouwd
15 vreemd DNA maar geen vir-gebied heeft, bevatten.
3. Werkwijze voor het produceren van Agrobacterium tume-
faciens bacteriën, die een of meer plasmiden bevatten,
met het kenmerk, dat A. tumefaciens bacteriën volgens conclusie 2 wor-
den geproduceerd door in Escherichia coli bacteriën vreemd DNA in te
20 bouwen in het T-gebied van een plasmide, dat een T-gebied en een repli-
cator met een breed gastheerbereik bevat, en het verkregen plasmide te
introduceren in A. tumefaciens bacteriën, die ten minste één plasmide
bevatten, dat het vir-gebied van een Ti-plasmide maar geen T-gebied
heeft.
- 25 4. Planten en plantecellen, verkregen nadat onder toepas-
sing van de werkwijze volgens conclusie 1 de genetische eigenschappen
van de oorspronkelijke planten cq. plantecellen zijn gewijzigd.
5. Werkwijze voor de bereiding van chemische en/of farma-
ceutische producten, met het kenmerk, dat onder toepassing van de werk-
30 wijze volgens één of meer van de conclusies 1 - 3 verkregen cellen
worden gekweekt en de gewenste stof wordt geïsoleerd.

8300698

6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het kweken door middel van fermentatie en eventueel daarop volgende immobilisatie wordt uitgevoerd.

8300698

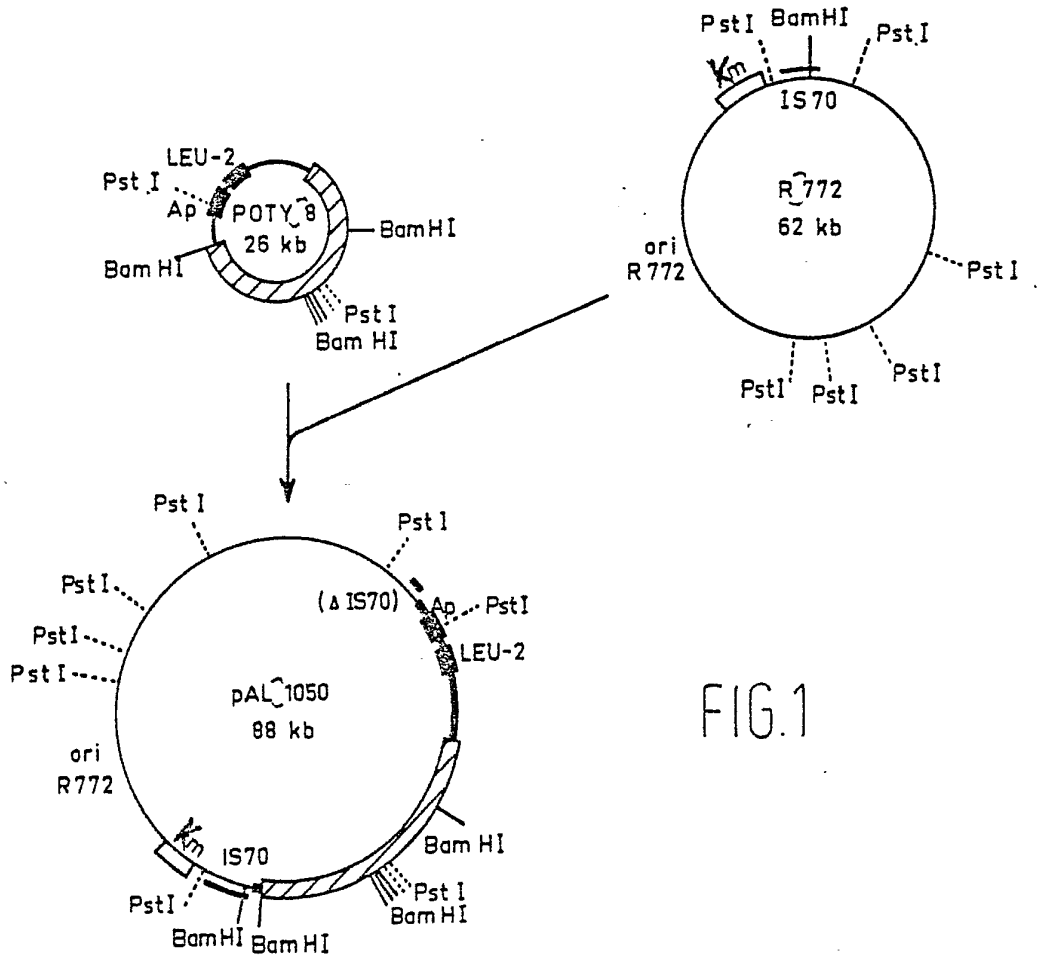


FIG. 1

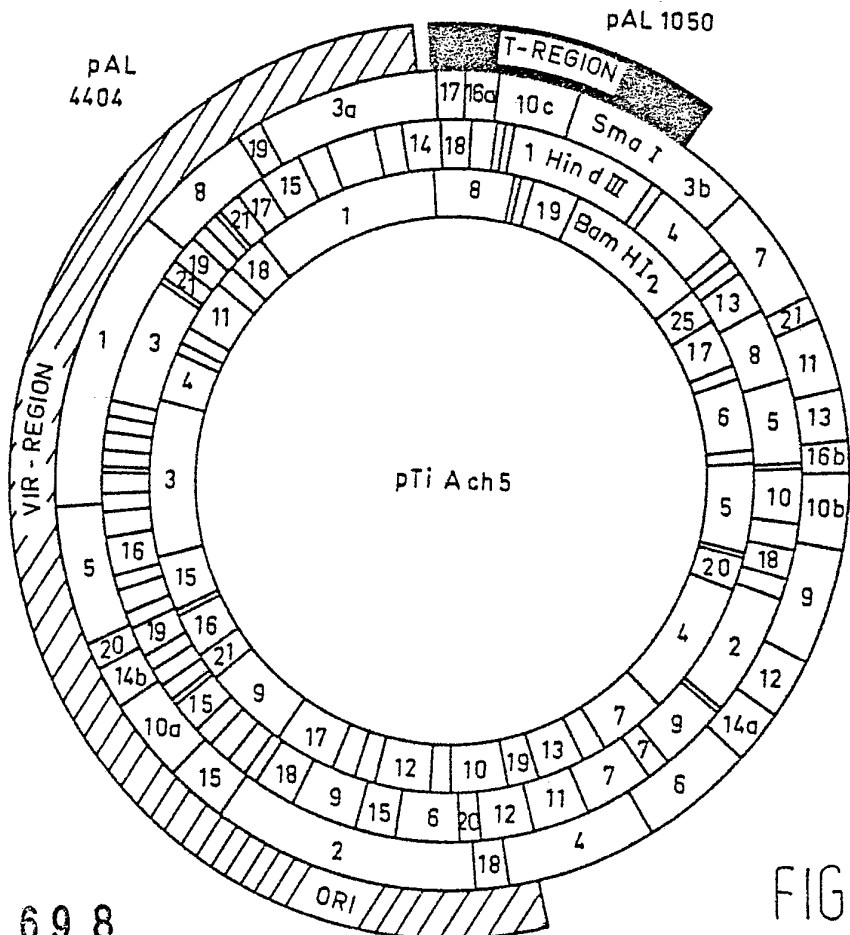
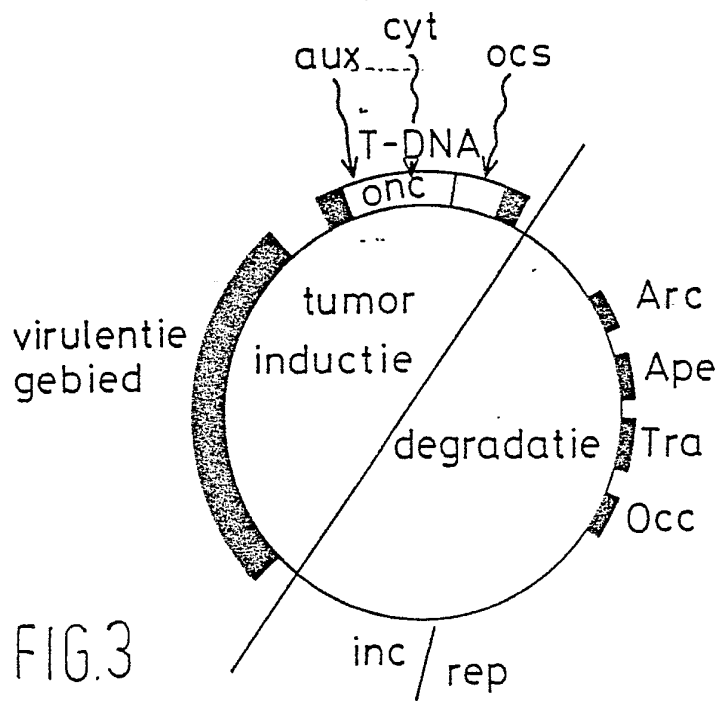


FIG. 2

8300698

octopine Ti-plasmide



Ti-plasmide gescheiden
in
vir-en onc-plasmide

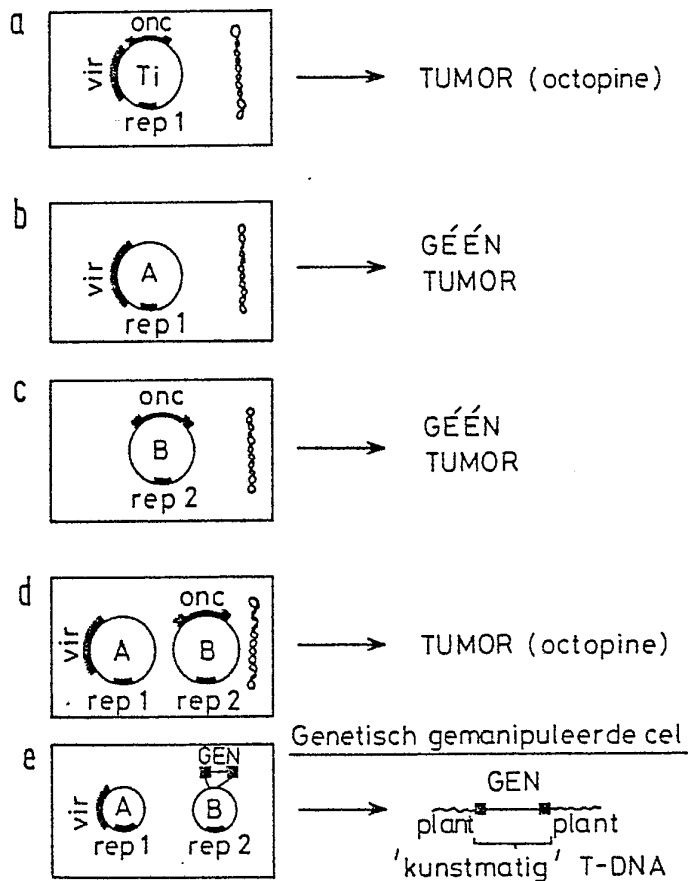
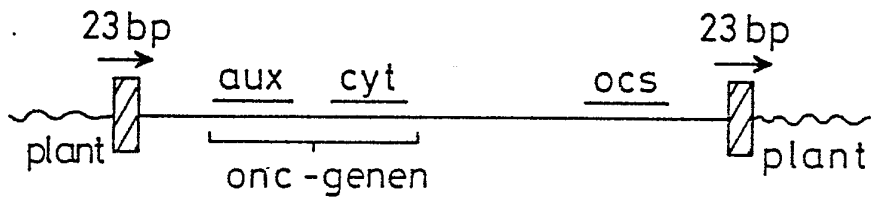


FIG.4

8300698

T-DNA structuur



'kunstmatig' T-DNA

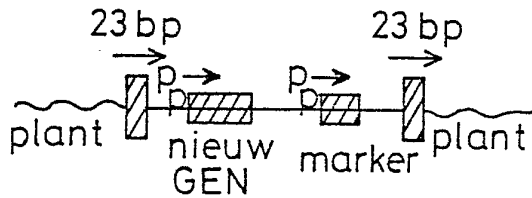


FIG.5

8300698