
Octrooiraad



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **9001711**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Genetische manipulaties met recombinant DNA, dat van RNA virus afgeleide sequenties omvat.**
- ⑤1 Int.Cl.⁵: C12N 15/86, C12N 15/10.
- ⑦1 Aanvrager: Clovis Matton N.V. te Avelgem-Kerkhove, België.
- ⑦4 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 9001711.
- ②2 Ingediend 27 juli 1990.
- ③2 Voorrang vanaf 3 oktober 1989.
- ③3 Land van voorrang: Nederland (NL).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 8902452.
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 mei 1991.

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

Genetische manipulaties met recombinant DNA, dat van RNA virus afgeleide sequenties omvat

De uitvinding ligt op het gebied van de genetische manipulatie door middel van DNA-recombinant technieken, meer in het bijzonder op het gebied van de genetische manipulatie van eukaryotische organismen, zoals gisten, schimmels en vooral
5 planten.

Daarbij is de uitvinding in het bijzonder gericht op genetische manipulaties, die tot resistentie van het gastheer organisme tegen een of meerdere RNA virussen leiden, en op genetische manipulaties, welke het gastheer organisme in staat
10 stellen tot een induceerbare of weefsel-specifieke produktie van vreemde eiwitten/peptiden of RNAs.

Voor deze genetische manipulaties wordt recombinant DNA gebruikt, dat een of meerdere van RNA virus afgeleide sequenties omvat, of meer in het bijzonder ten minste één nucleotiden-
15 sequentie omvat die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase (d.w.z. een RNA-afhankelijk RNA polymerase, dat ook wel wordt aangeduid met de term replicase). Deze RNA virussen kunnen behoren tot de groep der dubbelstrengs RNA virussen (d.w.z. dat
20 het genoom van het virus uit dubbelstrengs RNA bestaat), tot de groep der positiefstrengs RNA virussen (d.w.z. dat het genoom van het virus uit 'sense' of boodschapper enkelstrengs RNA bestaat), of tot de groep der negatiefstrengs RNA virussen (d.w.z. dat het genoom van het virus uit 'antisense' enkel-
25 strengs RNA bestaat).

Niet alle RNA virussen zijn voor hun replicatie echter afhankelijk van een viraal RNA/RNA polymerase. Dit geldt met name voor de tot de familie der Retroviridae behorende virussen, die voor vermenigvuldiging afhankelijk zijn van DNA replicatie

nadat het genomische RNA door middel van reverse transcriptase in DNA is overgeschreven.

Voorbeelden van RNA virussen, die voor hun replicatie afhankelijk zijn van een viraal RNA/RNA polymerase, zijn dubbel-
5 strengsvirussen uit de families der Reoviridae en Birnaviridae, negatiefstrengsvirussen uit de families der Arenaviridae, Bunyaviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae en Rhabdoviridae, en positiefstrengsvirussen uit de families der Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Nodaviridae, Picornaviridae en Caliciviridae. Concrete voorbeelden van positiefstrengsvirussen met
10 een plantaardige gastheer zijn Tobacco Mosaic Virus, Tobacco Necrosis Virus, Brome Mosaic Virus, Cucumber Mosaic Virus, Tobacco Streak Virus, Tobacco Rattle Virus, Cowpea Mosaic Virus, Tomato Black Ring Virus, Potato Y Virus, Turnip Yellow Mosaic
15 Virus, Tomato Bushy Stunt Virus, Southern Bean Mosaic Virus, Barley Yellow Dwarf Virus, Potatovirus X, Sugar Beet Yellow Virus, Carnation Latent Virus, Carnation Ringspot Virus, Barley Stripe Mosaic Virus, Alfalfa Mosaic Virus, Pea Enation Mosaic Virus, en Tomato Spotted Wilt Virus.

20 Met in acht neming van de bovenstaand genoemde beperking tot RNA virussen die voor hun replicatie afhankelijk zijn van een viraal RNA/RNA polymerase, worden hier met de term 'RNA virus' ook virussen en virusoïden omvat, die voor hun replicatie aangewezen zijn op hulp van een ander (helper) virus. Zoals
25 algemeen bekend is, kunnen RNA virus infecties gepaard gaan met coïnfecties van bijvoorbeeld satellietvirussen met een eigen manteleiwit, satelliet RNA dat in gemengde partikels is verpakt, en virusoïden (een klein circulair RNA genoom, verpakt in gemengde partikels). Ook viroïden, d.w.z. autonome kleine naakte
30 RNA molekulen, worden hierin door de term 'RNA virus' omvat. De nadere toelichting van de uitvinding in het latere experimentele gedeelte zal geschieden aan de hand van een RNA satellietvirus, nl. het Satellite Tobacco Necrosis Virus (STNV), een klein plantevirus ($1,85 \times 10^3$ kD), dat voor zijn replicatie volledig
35 afhankelijk is van de aanwezigheid van het helper Tobacco

9001711

Necrosis Virus (TNV). Het RNA genoom van STNV bevat 1239 nucleotiden en codeert voor een manteleiwit van 195 aminozuren.

De uitvinding bestaat uit het door middel van genetische manipulatie inbouwen in het genoom van eukaryoten van genetische informatie, die noch als zodanig, noch door daarvan afgeleide transcriptieproducten voor de gastheer een belasting betekent, maar toch een zeer doelmatige bescherming van de gastheer tegen virale infecties realiseert, resp. een induceerbare of weefsel-specifieke, zeer efficiënte produktie van vreemde eiwitten (of peptiden) of RNAs mogelijk maakt. De volgens de uitvinding in te bouwen genetische informatie omvat een expressie-cassette voor de te transformeren gastheer met daarin opgenomen twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties met daartussen ten minste één nucleotidensequentie die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, omvat.

Het genoom van RNA virussen, die voor hun replicatie afhankelijk zijn van een viraal RNA/RNA polymerase, bevat verschillende cis-elementen, d.w.z. elementen of functies die alleen functioneren voor het nucleïnezuur waardoor ze gecodeerd worden, zoals struktuurelementen van het nucleïnezuur. Behalve cis-elementen voor replicatie (waartoe in elk geval de bindingsplaats voor een RNA/RNA polymerase behoort) bevat het genoom van RNA virussen veelal ook cis-elementen voor transport (de bindingsplaats van transporteiwitten), cis-elementen voor verpakking van het nucleïnezuur in faaghulzen tot viruspartikels, en cis-elementen voor translatie van boodschapper RNA in eiwit, in het bijzonder manteleiwit. Voorbeelden van trans-elementen van het genoom van RNA virussen zijn de genen, die coderen voor manteleiwit, transporteiwit en RNA/RNA polymerase.

Een essentieel element van de uitvinding is, dat de in het genoom van de gastheer ingebouwde expressie-cassette leidt tot transcriptie van de van RNA virus afgeleide sequentie onder

9001711

vorming van een boodschapper RNA molecuul met een steelpan
structuur. Aan de elementen van de expressie-cassette, die deze
transcriptie reguleren, zoals vooral de transcriptie promoter,
worden geen hoge eisen gesteld. De promoter mag, en zal in veel
5 gevallen zelfs bij voorkeur een relatief zwakke promoter zijn
zodat de gastheer nagenoeg niet door deze transcriptie en de
daarbij gevormde transcriptieproducten wordt belast. Voor veel
organismen zijn geschikte promoters bekend. Uiteraard dient de
expressie-cassette ook nog een geschikte polyadenylatie site te
10 omvatten, terwijl de expressie-cassette aan beide uiteinden
geflankeerd wordt door zg. integratie sites, die integratie in
het genoom van de beoogde gastheer mogelijk maken.

Uit verschillende experimenten is gebleken, dat voor een
succesvolle expressie in de gastheer van de in het genoom
15 ingebouwde genetische informatie de aanwezigheid noodzakelijk is
van twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde
nucleotidensequenties die het daartussen gelegen DNA flankeren.
Deze geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties kunnen
bijvoorbeeld bestaan uit dG-dC baseparen resp. dC-dG baseparen.
20 Het feit dat de aanwezigheid van geïnverteerd gerepeteerde
nucleotidensequenties tot zowel replicatie als expressie in
geïnfecteerde cellen van de gastheer leidt, wordt toegeschreven
aan de vorming van RNA molekulen met een stabiliserende steelpan
structuur (zie van Emmelo et al, Virology 157, 1987, 480-487).
25 Hiervoor is noodzakelijk, dat de geïnverteerd gerepeteerde
nucleotidensequenties een lengte hebben van ten minste 12 base-
paren. Bij voorkeur hebben de geïnverteerd gerepeteerde
nucleotidensequenties echter een lengte van ten minste 15 base-
paren. Geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties met een
30 lengte van meer dan 250 baseparen zijn niet erg praktisch. Bij
voorkeur zijn ze niet langer dan ongeveer 50 baseparen.

Wezenlijk is verder ook de afwezigheid van RNA/RNA
polymerase (of replicase), resp. het daarvoor coderende gen,
zodat de ten gevolge van transcriptie in de cellen van de
35 gastheer aanwezige hoeveelheid RNA virus-specifiek boodschapper
RNA niet verder wordt vermeerderd. Wanneer de in te bouwen, van

RNA virus afgeleide sequentie afgeleid is van een satelliet-virus, zoals STNV, wordt automatisch aan deze eis voldaan omdat het STNV genoom geen RNA/RNA polymerase gen bevat (daarom is het satellietvirus voor zijn replicatie afhankelijk van het helper virus, dat het benodigde RNA/RNA polymerase levert).

Volgens de uitvinding is verder van groot belang, dat geen viraal manteleiwit wordt aangemaakt en dat de van RNA virus afgeleide nucleotidensequentie geen gen bevat, dat voor viraal manteleiwit codeert.

Ten slotte is volgens de uitvinding ook essentieel, dat het van RNA virus afgeleide boodschapper RNA ten minste die elementen bevat die bij aanwezigheid van RNA/RNA polymerase replicatie mogelijk maken. Met andere woorden, dienen ten minste cis-elementen voor replicatie aanwezig te zijn. Afhankelijk van het beoogde doel, kan het gewenst zijn dat ook andere elementen van het virale genoom aanwezig zijn. Zo heeft het vooral in het geval van bescherming van de gastheer tegen virus infecties de voorkeur, dat de in het genoom van de gastheer ingebouwde genetische informatie tevens cis-elementen voor transport omvat.

Daarentegen is volgens de uitvinding niet nodig, dat de van RNA virus afgeleide sequentie in de sense oriëntatie in het genoom is ingebouwd. Hetzelfde geldt voor de oriëntatie van andere, tussen de geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties gelegen sequenties, zoals een voor een ribozym coderende sequentie en een voor een soortvreemd eiwit/peptide coderende sequentie. Doordat volgens de uitvinding zowel een sense oriëntatie als een anti-sense oriëntatie kan worden gekozen, is het mogelijk om zowel een maximale veiligheid onder normale, infectie-vrije omstandigheden als ook een adequate reactie bij infectie te realiseren.

De uitvinding verschaft derhalve op de eerste plaats een recombinant DNA, omvattende twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties met daartussen ten minste één nucleotidensequentie die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide

sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, omvat.

Om gebruikt te kunnen worden moet het recombinant DNA volgens de uitvinding worden opgenomen in een expressie-cassette voor een te transformeren gastheer waardoor in de gastheer transcriptie kan plaatsvinden onder vorming van een RNA molecuul met een steelpan-structuur.

Een recombinant DNA volgens de uitvinding, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie zowel cis-elementen voor replicatie als cis-elementen voor transport omvat, heeft de voorkeur.

De uitvinding strekt zich voorts uit over een dergelijk recombinant DNA, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie ook cis-elementen voor verpakking in manteleiwit omvat, en over een dergelijk recombinant DNA, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie tevens cis-elementen voor translatie omvat. In het geval van toepassingen, waarbij deze functies geen rol spelen, zijn ze echter bij voorkeur afwezig, omdat ze een nadelige invloed kunnen uitoefenen op de replicatie efficiency van het door transcriptie gevormde RNA. Dit geldt met name voor de toepassing van de uitvinding ten behoeve van virusprotectie. Dit is een van de redenen dat geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, aanwezig mag zijn. Evenzo zijn bij voorkeur geen andere onnodige trans-elementen aanwezig, zoals een gen, dat voor viraal transporteiwit codeert.

In de meest geprefereerde voorkeursuitvoeringsvormen van de uitvinding stemt de van RNA virus afgeleide sequentie, aanwezig in het recombinante DNA, derhalve overeen met een uitgekleed viraal replicon, dat zonder hulp van buitenaf (zoals infectie met een helper virus) niet in staat is om zich te vermenigvuldigen en actief naar andere cellen van de gastheer te verplaatsen, en dat voor geen enkel viraal eiwit codeert. Een dergelijk, in hoge mate uitgekleed viraal replicon vertoont echter bij aanwezigheid van RNA/RNA polymerase een veel efficiëntere replicatie dan het volledige virale genoom. Hieraan is de bruikbaarheid

9001711

van het recombinante DNA volgens de uitvinding voor de bescherming van de gastheer tegen virus infecties te danken. Wanneer namelijk een infectie van de genetisch gemodificeerde gastheer door een RNA virus met het desbetreffende RNA/RNA polymerase optreedt, zal het aantal van RNA virus afgeleide RNA molekulen, dat reeds in de cellen van de gastheer aanwezig is, zeer snel toenemen en daarbij in steeds sterkere mate beslag leggen op het RNA/RNA polymerase ten koste van de vermenigvuldiging van het infecterende virus. Het verregaand uitgeklede replicon heeft derhalve een belangrijk voordeel in de strijd om het beschikbare RNA/RNA polymerase boven het volledige virale genoom. Dit voordeel kan nog verder worden vergroot wanneer de in het genoom van de gastheer ingebouwde, van RNA virus afgeleide sequentie ook cis-elementen voor transport bevat, doordat dan tevens transport-eiwit van het infecterende virus, verantwoordelijk voor uitbreiding van de infectie naar andere cellen van de gastheer, in beslag wordt genomen door de snel in aantal toenemende, van RNA virus afgeleide RNA molekulen die afgeleid zijn van het ingebouwde DNA.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding, die deze toepassing voor bescherming van de gastheer tegen virale infecties betreft, bestaat uit recombinant DNA, waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens ten minste één nucleotidensequentie bevindt, die voor een ribozym codeert, dat viraal RNA of mRNA kan knippen.

Wanneer in het geval van een virale infectie door een virus dat het desbetreffende RNA/RNA polymerase levert, verder aan te duiden als een compatibel virus, het in de cellen van de aangevallen gastheer aanwezige, van RNA virus afgeleide RNA snel wordt vermenigvuldigd, wordt in deze voorkeursuitvoeringsvorm tegelijkertijd ook de aanwezige hoeveelheid ribozym met specificiteit voor het infecterende virus vergroot. Dit ribozym zorgt voor een actieve vernietiging van het RNA van het infecterende virus, of van daarvan afgeleid boodschapper RNA.

9001711

Voor nadere informatie over de structuur en werking van ribozymen wordt verwezen naar Nature 334, blz. 197, 1988.

Voor nadere informatie over de vorming en eigenschappen van sterk uitgekleepte replicons wordt verwezen naar Perrault, 5
Current Topics in Microbiol. and Immunol. 93, 1981, 152-209; Lazzarini et al, Cell 26, 1981, 145-154; Nayak, Ann. Rev. Microbiol. 34, 1980, 619-644; Barrett en Dimmock, Current Topics in Microbiol. and Immunol. 128, 1986, 55-84; 'RNA genetics', 1989, E. Domingo et al, Eds., CRC Press, Boca Raton, Florida; 10
Strauss en Strauss, Current Topics in Microbiol. and Immunol. 105, 1983, 1-89. Ze worden daarin aangeduid als 'defective interfering viruses/particles/RNAs'. Een in hoge mate uitgekleept replicon van een RNA virus kan bijvoorbeeld worden verkregen door een geschikte gastheer te infecteren met naakt viraal RNA, 15
het gerepliceerde viraal RNA te isoleren en voor een volgende infectie te gebruiken. Aldus wordt de behoefte aan manteleiwit op een kunstmatige wijze uitgeschakeld, waardoor deletiemutanten ontstaan die geen manteleiwit gen meer bevatten. Door verdere herhalingen van deze procedure in tegenwoordigheid van telkens 20
een kleine hoeveelheid toegevoegd RNA van deze manteleiwit-deletiemutant kan ook RNA worden geïsoleerd, dat geen RNA/RNA polymerase gen meer bevat (doordat het toegevoegde RNA voor het benodigde RNA/RNA polymerase zorgt ondergaan ook RNA/RNA polymerase-deletiemutanten replicatie). Ook andere bereidings- 25
wijzen zijn echter mogelijk, zoals een werkwijze waarbij cellen of weefsels met een zeer hoge dosis viruspartikels (100 of meer per cel) worden geïnfecteerd en RNA-deletiemutanten worden geïsoleerd; of een werkwijze waarbij cellen of weefsels met virus-stocks, die satellietvirussen of virusoïden bevatten, 30
worden geïnfecteerd en RNA-deletiemutanten worden geïsoleerd; of een werkwijze waarbij een subgenoom wordt geïsoleerd van een RNA virus met een bipartiet of tripartiet (of, meer in het algemeen, polypartiet) genoom; of een werkwijze waarbij cellen of weefsels, die een passend RNA/RNA polymerase produceren, worden 35
geïnfecteerd met eventueel reeds partiëel gedeleteerde virale RNAs en verder gedeleteerde RNAs worden geïsoleerd; of een

9001711

werkwijze waarbij gerichte genetische manipulaties in het cDNA van een viraal, satelliet of virusoïde RNA worden uitgevoerd.

De uitvinding heeft belangrijke voordelen ten opzichte van de eerder voorgestelde methoden voor het beschermen van

5 eukaryotische gastheerorganismen tegen virusinfecties, zoals de vorming van antisense viraal RNA om viraal boodschapper RNA te blokkeren (zie bijvoorbeeld Cuzzo et al, Biotechnology 6, 1988, 549-557), de vorming van viraal manteleiwit (zie het genoemde artikel van Cuzzo et al, en Hoekema et al, Biotechnology 7,

10 1989, 273-279), of de vorming van viraal satelliet RNA (zie EP-A-0242016). De uitvinding is aan minder beperkingen onderhevig dan de bekende virusprotectie methoden. De uitvinding is bijv. niet beperkt tot virussen, waarvan een satellietvirus bekend is, en is niet beperkt tot het inbouwen van 'sense' of 'antisense'

15 DNA (het door transcriptie gevormde, van RNA virus afgeleide RNA kan zowel in de sense als in de antisense oriëntatie de transfuncties voor replicatie en eventueel transport van het infecterend virus in beslag nemen). De uitvinding biedt ook meer mogelijkheden voor het realiseren van een grotere effectiviteit,

20 zoals de mogelijkheid om een of meerdere ribozym sequenties in te bouwen. De uitvinding combineert een zo gering mogelijke belasting van en een zo hoog mogelijke veiligheid voor de gastheer onder infectie-vrije omstandigheden met een, zodra een infectie door een compatibel virus optreedt, buitengewoon snelle

25 en doeltreffende reactie die de gastheer uitsluitend op de plaatsen, waar dat nodig is, de vereiste bescherming tegen het virus biedt. De door de uitvinding geboden bescherming is van blijvende aard, omdat hij in het genoom van de gastheer is vastgelegd en dankzij zijn geringe belasting van de gastheer

30 nagenoeg geen selectiedruk uitoefent. Doordat de uitvinding vrijwel geen extra belasting voor de gastheer betekent, d.w.z. de gastheer vrijwel geen energie hoeft te verbruiken (voor de transcriptie van het ingebrachte DNA is maar heel weinig energie vereist, terwijl in de voorkeursuitvoeringsvormen geen sprake is

35 van translatie in eiwit), is een gelijktijdige protectie van de gastheer tegen meerdere verschillende virussen een reële

mogelijkheid van de uitvinding. Volgens de uitvinding kunnen binnen de geïnverteerd gerepeteerde sequenties meerdere verschillende RNA virus-specifieke sequenties (d.w.z. uitgeklee-
5 verschillende ribozym sequenties (een ribozym sequentie die specifiek is voor een eerste virus, een ribozym sequentie die specifiek is voor een tweede virus, enz.) zijn opgenomen. Uiteraard kunnen echter deze meerdere verschillende RNA virus-
10 sequenties ook elk binnen twee eigen geïnverteerd gerepeteerde sequenties zijn opgenomen. Bij de bekende methoden van virus protectie is een dergelijke gelijktijdige bescherming tegen verschillende virussen niet goed mogelijk, omdat de grote hoeveelheden van bescherming gevende entities, die continu in de
15 hele gastheer moeten worden geproduceerd om een effectieve bescherming te waarborgen, door hun belasting een selectief nadeel van de gastheer ten opzichte van zijn soortgenoten betekenen en/of schadelijk zijn voor zijn groei en ontwikkeling.

De bovengenoemde eigenschappen van het recombinante DNA
20 volgens de uitvinding zijn eveneens verantwoordelijk voor de bruikbaarheid daarvan in het kader van werkwijzen voor het produceren van vreemde eiwitten/peptiden en RNAs met behulp van genetisch gemodificeerde, prokaryotische en vooral eukaryotische organismen. Het gaat daarbij om recombinant DNA volgens de uit-
25 vinding, waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere RNAs codeert, en meer in het bijzonder om recombinant-DNA volgens de uitvinding, waarbij de van RNA
30 virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie en cis-elementen voor translatie omvat en zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere eiwitten/
35 peptiden codeert.

De eerder genoemde eigenschappen van het recombinante DNA volgens de uitvinding betekenen, dat de gastheer bij afwezigheid van RNA/RNA polymerase hooguit een verwaarloosbare hoeveelheid van de vreemde RNAs of eiwitten/peptiden produceert, 5 terwijl bij aanwezigheid van RNA/RNA polymerase een sterke vermeerdering van het boodschapper RNA optreedt, die in een aanzienlijke produktie van de gewenste RNAs of eiwitten/peptiden resulteert. Deze zeer sterke produktie kan bovendien op een gewenst moment worden geïnduceerd, of tot bepaalde weefsels van 10 de gastheer worden beperkt, door de aanwezigheid van het RNA/RNA polymerase op een overeenkomstige wijze te reguleren.

Een induceerbare produktie kan bijvoorbeeld worden gerealiseerd door de genetisch gemodificeerde gastheer (of gastheercellen in bijvoorbeeld een celkweek) op het gewenste 15 moment met een compatibel virus te infecteren. Deze methode zal doorgaans echter niet de voorkeur hebben, omdat hij omslachtig is, de efficiency van de infectie zeer variabel kan zijn, de infectie meestal ten koste van de gastheer zal gaan (met als mogelijk gevolg een afbraak van het gewenste produkt) en/of aan 20 het gebruik van het virus gevaren zijn verbonden. Een andere, aantrekkelijkere mogelijkheid, die ook gebruikt kan worden om een weefsel-specifieke produktie te realiseren, bestaat uit een dubbele transformatie van de gastheer, waarbij het genoom van de gastheer niet alleen van het bovenstaand beschreven recombinante 25 DNA volgens de uitvinding wordt voorzien, maar tevens van recombinant DNA, omvattende genetische informatie voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in een induceerbare of weefselspecifieke expressie-cassette. Hiervoor kan gebruik worden gemaakt van op zichzelf bekende, induceerbare 30 (bijvoorbeeld door warmte, UV straling, of chemicaliën zoals salicylzuur) of weefselspecifieke (bijvoorbeeld patatin voor expressie in de knollen van aardappelen) promoters.

Met de woorden "genetische informatie voor een RNA/RNA polymerase construct" wordt bedoeld op genconstructies, waardoor 35 al dan niet voor een ander RNA/RNA polymerase wordt gecodeerd. Een mogelijke genconstructie bestaat bijv. uit een mutatie,

. 9001711

waardoor een intern facultatief stopcodon, dat in genen die voor RNA/RNA polymerasen coderen kan voorkomen, wordt vervangen door een niet meer als stopcodon herkenbare sequentie. Een andere mogelijkheid is een genconstructie, die uit een fusie bestaat van verschillende RNA/RNA polymerase genen, waarbij uiteraard ook weer de bovenvermelde mogelijkheid van een mutatie van een intern stopcodon kan worden toegepast.

De uitvinding wordt mede belichaamd in eukaryotische of prokaryotische cellen of organismen, welke door genetische manipulatie voorzien zijn van recombinant DNA volgens de uitvinding, en desgewenst door genetische manipulatie tevens voorzien zijn van recombinant DNA, omvattende genetische informatie voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in een induceerbare of weefsel-specifieke expressie-cassette.

Voorts wordt de uitvinding belichaamd in een werkwijze voor het beschermen van eukaryotisch organismen, zoals in het bijzonder planten, gisten en schimmels, tegen een RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, door een genetische manipulatie van het te beschermen organisme uit te voeren waarbij in het genoom van dit organisme recombinant DNA wordt ingebouwd dat in een werkzame expressiecassette twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties met daartussen een van RNA virus afgeleide nucleotidensequentie omvat, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen gen, dat voor viraal RNA/RNA polymerase codeert, en geen gen, dat voor viraal manteleiwit codeert, omvat.

De voorkeur heeft een dergelijke werkwijze, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie zowel cis-elementen voor replicatie als cis-elementen voor transport omvat. De van RNA virus afgeleide sequentie kan verder tevens cis-elementen voor verpakking in manteleiwit en cis-elementen voor translatie omvatten.

De grootste voorkeur heeft een dergelijke werkwijze, waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleoti-

densequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens ten minste één nucleotidensequentie bevindt, die voor een ribozym codeert, dat viraal RNA of mRNA kan knippen.

De uitvinding wordt verder belichaamd in een werkwijze
5 voor het op een induceerbare wijze produceren van een of meerdere eiwitten/peptiden door een prokaryotisch of eukaryotisch organisme, of cellen van een prokaryotisch of eukaryotisch organisme, welk organisme door genetische manipulatie is voorzien van recombinant DNA dat in een werkzame expressie-
10 cassette twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties omvat met daartussen een nucleotidensequentie, die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-
15 elementen voor replicatie en cis-elementen voor translatie, maar geen gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-
20 virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere eiwitten/peptiden codeert, te kweken en met het virus te infecteren.

De voorkeur gaat echter uit naar een werkwijze voor het op een inducerbare wijze of op een weefsel-specifieke wijze
25 produceren van een of meerdere eiwitten/peptiden door een eukaryotisch organisme te kweken, in het genoom waarvan door genetische manipulatie zowel recombinant DNA is ingebouwd dat in een werkzame expressiecassette twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties omvat met
30 daartussen een nucleotidensequentie, die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie en cis-elementen voor translatie, maar geen gen, dat codeert voor
35 viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd

9001711

gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere eiwitten/peptiden codeert, als ook recombinant DNA is ingebouwd dat genetische informatie voor
5 een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in een induceerbare of weefsel-specifieke expressie-cassette omvat.

De uitvinding wordt ook belichaamd in een werkwijze voor het op een induceerbare wijze produceren van een of meerdere
10 RNAs, zoals ribozymen, antisense RNAs en dubbelstrengs RNAs, door een prokaryotisch of eukaryotisch organisme, of cellen van een prokaryotisch of eukaryotisch organisme, welk organisme door genetische manipulatie is voorzien van recombinant DNA dat in een werkzame expressiecassette twee, 12-250 baseparen lange,
15 geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties omvat met daartussen een nucleotidensequentie, die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen
20 gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere
25 RNAs codeert, te kweken en met het virus te infecteren.

De voorkeur heeft echter een werkwijze voor het op een induceerbare wijze of op een weefsel-specifieke wijze produceren van een of meerdere RNAs, zoals ribozymen, antisense RNAs en dubbelstrengs RNAs, door een eukaryotisch organisme te kweken,
30 in het genoom waarvan door genetische manipulatie zowel recombinant DNA is ingebouwd dat in een werkzame expressie-cassette twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties omvat met daartussen een nucleotidensequentie, die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn
35 replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-

elementen voor replicatie, maar geen gen, dat codeert voor
viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal
manteleiwit, omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd
gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus
5 afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie
bevindt, die voor een of meerdere RNAs codeert, als ook
recombinant DNA is ingebouwd dat genetische informatie voor een
viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in
een induceerbare of weefselspecifieke expressie-cassette omvat.

10 Aldus is de uitvinding in brede zin toepasbaar voor de
produktie in eukaryoten of cellen van eukaryoten van een of meer
produkten zoals eiwitten, oligo en polynucleotiden, oligo- en
polypeptiden, enzymen, antilichamen, antigene stoffen, anti-
virale verbindingen, anti-kankerstoffen, hormonen, vitaminen,
15 geneesmiddelen en farmaca, primaire en secundaire metabolieten.

Een verder aspect van de uitvinding is recombinant DNA,
omvattende een nucleotidensequentie die codeert voor een viraal
RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct.

Meer in het bijzonder verschaft de uitvinding volgens
20 een voorkeursuitvoeringsvorm een dergelijk recombinant DNA,
omvattende het voor een viraal RNA/RNA polymerase coderende deel
van de in fig.4 getoonde nucleotidensequentie, dan wel daarvan
afgeleide constructen, zoals een substitutiemutant die op de
plaatsen 656-658 volgens de in fig.4 gehanteerde nummering de
25 sequentie TAT heeft i.p.v. de sequentie TAG, en substitutie-
mutanten waarin een gedeelte van de in fig.4 getoonde sequentie
vervangen is door een overeenkomstig gedeelte van een ander gen,
dat voor een viraal RNA/RNA polymerase codeert.

Een dergelijk recombinant DNA, waarbij de nucleotiden-
30 sequentie, die voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA
polymerase construct codeert, gelegen is in een induceerbare of
weefselspecifieke expressie-cassette, vormt weer een verdere
voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding.

De uitvinding zal aan de hand van de hierna volgende
35 voorbeelden nader worden toegelicht.

9001711

Voorbeeld I illustreert hoe tabaksplanten door transformatie met een van STNV afgeleid replicon tegen infectie door TNV kunnen worden beschermd. Het van STNV afgeleide replicon is een verregaand uitgekleed replicon, dat niet voor
5 een eiwit codeert en onder infectie-vrije omstandigheden slechts in zeer beperkte mate wordt aangemaakt, d.w.z. er vindt slechts een zwakke transcriptie van het in het genoom ingebouwde DNA plaats. Wanneer de plant besmet wordt met TNV, dat codeert voor een RNA/RNA polymerase dat in staat is om het van STNV afgeleide
10 replicon te vermenigvuldigen, vindt daarentegen een massale reproductie van het van STNV afgeleide replicon plaats, ongeacht of de STNV informatie in sense dan wel anti-sense oriëntatie in het genoom is ingebouwd. Als gevolg wordt de plant tegen het infecterende virus beschermd. Deze bescherming is nog veel
15 effectiever, wanneer het in het genoom ingebouwde DNA tevens de informatie bevat voor een ribozym, dat gericht is tegen mRNA voor TNV manteleiwit.

Voorbeeld II illustreert hoe de uitvinding gebruikt kan worden om een induceerbare productie van een soortvreemd eiwit
20 te realiseren. Als model is hiervoor het beta-glucuronidase gen van E. coli gekozen, dat gefuseerd is met het initiaticodon van het STNV manteleiwit. In het gegeven voorbeeld werd de expressie geïnduceerd door de getransformeerde tabaksplanten met TNV te infecteren.

25 Voorbeeld III beschrijft de isolatie van het replicase gen van TNV en de constructie van een plasmide pSPTNV rep-1, dat dit replicase gen bevat.

Voorbeeld IV beschrijft expressie experimenten waarbij
30 amplificatie van het boodschapper RNA door contact met het TNV replicase plaats vond. Het virale replicon bevatte als vreemd DNA een fusie van een deel van het gen, dat voor het virale manteleiwit van STNV codeert, en het chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gen van E. coli.

Voorbeeld I

(a) Recombinante plasmiden

Uitgaande van het door van Emmelo et al in Virology 157,
5 480-487 (1987) beschreven plasmide pSTNV-413, werden een aantal
nieuwe insertiemutanten geconstrueerd. Het uitgangsplasmide werd
gelineariseerd met RsaI, dat 9 knipplaatsen heeft in het STNV
genoom, door 15 minuten te incuberen bij 28 °C met 0,1 ug enzym
per ug DNA. Ligatie met dezelfde 14-meer linker als beschreven
10 door van Emmelo et al: 5' TCCATGGGAATTCT 3' leidde o.a. tot de
insertiemutant pBR STNV N162, die de linker met de NcoI site aan
het 5' uiteinde bevat op positie 162 van het STNV genoom.

Uit deze insertiemutant en de reeds door van Emmelo et
al beschreven insertiemutanten pBR STNV N198, N322 en E531, die
15 alle de leesraam verstorende insertie van bovengenoemde 14-meer
linker in het voor manteleiwit coderende gen bevatten, werden
mutanten met een hersteld leesraam geconstrueerd. Daartoe werd
de 14-meer insertie omgezet in een 18-meer insertie door knippen
met NcoI, opvullen van de enkelstrengs-uiteinden met Klenow
20 enzym in tegenwoordigheid van de 4 dNTP's, en religatie van het
plasmide. Hierdoor wordt de 14-meer insertie omgezet in de
volgende 18-meer insertie: 5' TCCATGCATGGGAATTCT 3', waarin de
NcoI site (CCATGG) vervangen is door een NsiI site (ATGCAT).
Aldus werden de insertiemutanten pBR STNV N164, N200, N324 en
25 E533 verkregen, die theoretisch coderen voor een manteleiwit,
dat met 6 aminozuren is vergroot.

Verder werd de dubbele insertiemutant pBR STNV N164N843
geconstrueerd door uit pBR STNV N843 het EcoRV fragment van
basen 198 tot 962 in het STNV genoom te isoleren en in de plaats
30 te stellen van het overeenkomstige EcoRV fragment van pBR STNV
N164.

Uit de 18-meer insertiemutanten pBR STNV N164 en N200
werden de mutanten pBR STNV S164 en S200 geconstrueerd door de
insertie van een additionele linker van 18 basen als NsiI
35 fragment in de NsiI site van de 18-meer insertie:

9001711

in S164: 5' TCCATGCAATCGAGGGTAGGCATGCATGGGAATTCT 3'

in S200: 5' TCCATGCATGCCTACCCTCGATTGCATGGGAATTCT 3'

Deze mutanten hebben een insertie van 36 basen en coderen theoretisch voor een korter manteleiwit als gevolg van een leesraammutatie in het geval van S164, resp. voor een manteleiwit met 12
5 extra aminozuren in het geval van S200.

Door dezelfde 18-meer in de unieke NsiI site aan het einde van het manteleiwit-gen (base 613) in te brengen werd de mutant pBR STNV S613 verkregen.

10 Ter hoogte van de RsaI site op positie 162 werd op een zelfde manier als hierboven beschreven voor de 14-meer linker, een linker van 30 basen ingebracht. In het leesraam, dat hierbij ontstaat, codeert deze linker voor het neuropeptide bradykinine:
5' GCGGCCCGCCGGGTTTAGTCCTTTTAGGTT 3'

15 ArgProProGlyPheSerProPheArg

Deze insertiemutant werd pBR STNV Brad genoemd.

Uit pBR STNV N164 werd door een deletie van het NsiI fragment van 167 tot 631 de deletiemutant pBR STNV D1 gemaakt. Het genoom van deze mutant heeft een lengte van 793 basen tegen
20 1239 voor wild type STNV.

Voor expressiestudies in E. coli werden de verschillende STNV-constructies als PstI fragment overgekloneerd in pPLC 2820. Het restrictie-enzym PstI knipt juist aan het einde van de poly GC gebieden die de 5' en 3' uiteinden van STNV flankeren. Deze
25 constructies in pPLC2820 worden aangeduid als pPLC, gevolgd door de naam van de STNV mutant, verder gevolgd door .1 als het 5' uiteinde van het STNV genoom aansluit op de pL promoter van pPLC 2820, of door .2 als het 3' uiteinde op de promoter aansluit. Het plasmide pPLC STNV N164.1 is dus het plasmide met de STNV
30 mutant N164 gekloneerd in pPLC 2820, waarbij de STNV mutant zodanig in het plasmide is ingevoegd, dat bij transcriptie door pL het equivalent van het positiefstrengs genomisch RNA van STNV als mRNA gemaakt wordt.

De als PstI fragment in pPLC 2820 gekloneerde STNV
35 mutanten worden aan het 5' uiteinde voorafgegaan door een unieke BamHI site en aan het 3' uiteinde gevolgd door een SalI site.

9001711

Aangezien noch STNV, noch de daarvan afgeleide mutanten een BamHI of een SalI site bevatten, kunnen de verschillende constructies als BamHI/SalI fragment overgekloneerd worden in pPCV 520 (figuur 1) achter de plantepromoter pTR1'. De aldus
 5 verkregen plasmiden worden aangeduid als pPCV, gevolgd door de naam van de STNV mutant, verder gevolgd door .1 als het 5' uiteinde, en door .2 als het 3' uiteinde van STNV naar de promoter pTR1' is gekeerd. De pPCV derivaten werden gebruikt voor transformaties van tabaksplanten als onderdeel van een
 10 binair vectorsysteem, zoals beschreven door Hoekema et al in EMBO Journal 3, 2485 (1984) en door de Framond et al in Mol. Gen. Genet. 202, 125 (1986). De van pPCV 520 afgeleide plasmiden fungeerden als het T-plasmide (d.w.z. het plasmide, dat het T-DNA bevat, dat bij de transformatie in het genoom van de plant
 15 wordt geïntegreerd). De voornaamste eigenschappen van pPCV 520 (zie figuur 1) zijn:

- ColE1 replicatie in E. coli, waardoor het in alle courante E. coli stammen kan worden gebruikt en een multicopy plasmide is (efficiënte DNA bereiding en kloon analyse)
- 20 --- bacteriële resistenties tegen de antibiotica ampicilline en chlooramphenicol
- de P-type replicatieoorsprong van pRK2 is actief in E. coli en in Agrobacterium, op voorwaarde dat het RK2-gen trfa tot expressie komt (in Agrobacterium is bovendien selectie nodig
 25 voor stabiliteit)
- de P-type transferoorsprong van pRK2 laat een efficiënte transfer toe van het plasmide uit stammen waarin de pRK2-genen tral, tra2 en tra3 tot expressie komen (dit is voor E. coli het geval voor de stam SM10 en voor Agrobacterium voor stammen die
 30 het plasmide pMP90RK bevatten)
- de grenssequenties van het T-DNA flankeren alle elementen van de vector die in planten belangrijk zijn
- het NPT-II kanamycine resistentie gen onder controle van de plantepromoter pTR2' laat selectie van getransformeerde planten
 35 toe
- het octopine synthase gen in het T-DNA maakt het mogelijk om

9001711

de transformatie van kanamycine-resistente planten te bevestigen aan de hand van octopine synthese

--- de constitutieve plantepromoters pTR1' en pnos worden resp. gevolgd door de unieke restrictie sites voor SalI en BamHI en
5 voor BglII en BclI, en door de polyadenylatiesequenties van de T-DNA genen 7 en 4

--- terugkloneren van T-DNA sequenties uit getransformeerde planten wordt vereenvoudigd door de pBR322 oriV en ampicilline resistentie in het T-DNA.

10 Het T-plasmide pPCV 520 kan dus zowel in E. coli als in Agrobacterium repliceren. De kloneringsstappen voor het in deze vector introduceren van de STNV mutanten kunnen in E. coli plaats vinden. Daarna wordt de vector door conjugatie uit E. coli SM10 overgebracht in de Agrobacterium stam GV3100 (pMP90RK),
15 waarmee de plantentransformaties worden uitgevoerd. Het plasmide pMP90RK (figuur 2; zie Koncz en Schell, Mol. Gen. Genet. 204, 1986, 383-396) fungeert als virulentie plasmide. Het is afgeleid van het nopaline Ti-plasmide pGV3100 door (1) een gecombineerde deletie- en insertiemutagenese, leidende tot een volledige
20 deletie van het T-DNA en tot de inbouw van een gentamycine resistentie gen (de aldus verkregen constructie wordt aangeduid als pMP90), en (2) de insertie van een fragment van het P-type plasmide pRK2013 met daarop de genen voor kanamycine resistentie, de in trans werkende genen voor transfer en
25 replicatie van P-type plasmiden en de P-type oorsprong van transfer (Figurski en Helinski, PNAS USA 76, 1648 (1979)). De belangrijkste eigenschappen van dit plasmide pMP90RK (zie figuur 2) zijn:

--- een stabiele replicatie alleen in Agrobacterium

30 --- compatibiliteit met P-type plasmiden

--- het codeert voor alle Ti-virulentiefuncties die nodig en voldoende zijn voor de integratie van het T-DNA in het genoom van planten bij transformatie

--- het bevat gentamycine en kanamycine resistentie genen als
35 gemakkelijk te selecteren genetische merkers

--- het complementeert transfer en replicatie van P-type

mutanten door de expressie van de pRK2-genen tra1, tra2 en tra3 en trfa

--- het conjugeert zeer efficiënt dankzij de P-type oriT.

5 (b) Technieken

De transformatie van planten (tabak SR1) geschiedde volgens de bladschijfmethode, beschreven door de Block et al in EMBO Journal 3, 1681 (1984) en door Horsch et al in Science 223, 496 (1984). De procedure was als volgt:

10 --- door insnijdingen met een scalpel worden tabaksbladeren verwond en de vers verwonde bladeren worden gedurende 48 uur geïncubeerd met een 1/50 verdunning van een verse volgroeide cultuur van de transformerende Agrobacteria. Dit gebeurt in vloeibaar MS-plantenmedium (Murashige en Skoog medium, Gibco)

15 --- daarna worden de bladfragmenten 2 keer gedurende 12 uur gewassen in vloeibaar MS-medium waaraan claforan (500 ug/ml) is toegevoegd (claforan is een antibioticum dat alleen tegen bacteriën werkt)

--- vervolgens worden de bladfragmenten geïncubeerd op vast MS-medium (+ 0,8 % agar) waaraan cytokinine (6-benzyl-aminopurine of BAP, 1 mg/l) en auxine (α -naftaleenazijnzuur of NAA, 0,1 mg/l) zijn toegevoegd in een verhouding die scheutvorming ter hoogte van de wondvlakken stimuleert, kanamycine (100 ug/ml) voor de selectie van getransformeerde scheuten en claforan voor de verdere selectie tegen de transformerende Agrobacteria

25 --- na 4 tot 10 weken groeien dan getransformeerde scheuten uit op dit medium die, wanneer ze voldoende ontwikkeld zijn, overgezet kunnen worden op hormoonvrij medium waarop ze zich tot normale planten met wortels kunnen ontwikkelen.

30 Callusinductie werd uitgevoerd aan steriele blad- en stengelfragmenten. Daartoe werden de fragmenten geïncubeerd op vast MS-medium (+ 0,8 % agar) waaraan het cytokinine BAP (0,5 mg/l) en het auxine NAA (1,0 mg/l) zijn toegevoegd in een concentratie en verhouding die callusgroei stimuleert.

35 Voor octopinetesten werden kleine stukjes planteweefsel (ongeveer 50 mg) overnacht geïncubeerd in een oplossing van

100 mM L-arginine en 50 mM pyruvaat opgelost in vloeibaar MS-medium. Na incubatie werd de vloeistof verwijderd en werd het weefsel gewassen in MS-medium. Daarna werd het plantefragment verbrijzeld en afgecentrifugeerd, en werden 3 tot 5 ul van het
5 extract door papierelectroforese gescheiden. Dit vond plaats op Wattman 3MM papier, in een oplossing van 15 % HAC, 5 % HCOOH en 80 % H₂O. Octopine spots op het papier werden onder UV belichting zichtbaar gemaakt na een kleurreactie met een vers
10 mengsel van 1 deel 0,02 % phenanthrequinone in 95 % EtOH en 1 deel 10 % NaOH in 60 % EtOH.

Plasmide-infecties van cowpea werden uitgevoerd om de infectiviteit van de STNV mutanten te onderzoeken. Daartoe werd cowpea geïnoculeerd met een mengsel van TNV helpervirus en chimere plasmiden volgens de door van Emmelo beschreven methode.

15 Northern analyses werden in essentie op de door van Emmelo beschreven wijze uitgevoerd. Voor de analyses van de getransformeerde planten werden enkel- en dubbelstrengs RNA niet door LiCl-precipitatie gescheiden voor gelelectroforese. Naast denaturerende glyoxal agarose gels werden ook denaturerende
20 formamide agarose gels gebruikt, zoals beschreven door Lechrach et al in Biochemistry 16, 4743 (1977) en door Maniatis et al in Molecular Cloning: a laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA. Bij deze methode worden de RNA monsters eerst gedurende 15 minuten gedenu-
25 bij 55 °C in een mengsel van 50 % formamide, 17,5 % formaldehyde, 20 mM morfolinopropaansulfonzuur (MOPS) (pH 7,0), 5 mM NaAc en 1 mM EDTA (pH 8,0). Gelelectroforese gebeurde in een 1,2 % agarose gel in 20 mM MOPS (pH 7,0), 5 mM NaAc en 1 mM EDTA (pH 8,0) als loopbuffer. De verdere behandeling van de monsters
30 voor blotting en hybridisatie geschiedde op de door van Emmelo beschreven wijze.

Western analyses voor het detecteren van TNV en STNV manteleiwit werden als volgt uitgevoerd. Geïnfecteerde bladeren werden na twee dagen geogst en met behulp van een potter bij
35 4 °C gemalen in 1 volumehoeveelheid PBS (PBS= 0,13 M NaCl, 10 mM natriumfosfaat buffer pH 7,4) die 100 ug/ml PMSF bevatte.

9001711

Celrestanten werden door centrifugeren verwijderd en de eiwitten werden met trichloorazijnzuur (TCA, eindconcentratie 10 %) neergeslagen. Het neerslag werd gewassen in ethanol, ethanol-ether (1:1) en ether, gedroogd en opnieuw gesuspendeerd in 1x Laemmli-buffer (Nature 227, 680-685, 1970). Fracties daarvan werden door electroforese op een 10 % PAG gescheiden en via electrotransfer gedurende anderhalf uur bij 0,5 A overgebracht op Pall-biodyne filter in een transfer buffer (1 mM natrium-acetaat, 5 mM MOPS pH 7,5 in 20 % ethanol). Het filter werd gedurende een nacht geblokkeerd in PBS dat 10 % magere melkpoeder bevatte en geïncubeerd met anti-STNV manteleiwit serum van konijnen, verdund 1:200 in PBS, 2 % magere melkpoeder gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. Het filter werd vier keer gewassen met PBS, 0,1 % Triton-X-100 en geïncubeerd met anti-konijn alkalisch fosfatase gelabelde antilichamen uit geiten, verdund 1:250 in PBS, 2 % magere melkpoeder. Na wegwassen van niet gebonden antilichamen werd een kleurreactie uitgevoerd onder toepassing van Nitro Blue Tetrazolium (NBT) en 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfaat (BCIP), waarbij de condities van de producent (Promega Biotec) werden aangehouden.

(c) Experimenten en de resultaten daarvan

(c1) expressiestudies in E. coli NF1

Een aantal pPLC STNV plasmiden met het gemodificeerde STNV genoom in de sense oriëntatie (de .1 constructies) alsmede de plasmiden pPLC STNV N164.2 en Brad.2 (met de antisense oriëntatie) werden in E. coli NF1 getransformeerd. Deze stam bezit een ts (temperatuurgevoelige) mutatie van het c1 repressor gen van pL, waardoor de pL promoter gerepresseerd wordt wanneer de bacteriën bij 28 °C worden gegroeid. Bij een temperatuur van 42 °C is de repressor instabiel en geeft de promoter pL transcriptie.

Met behulp van Western blotting werd de synthese van manteleiwit onderzocht, d.w.z. de aan- of afwezigheid van manteleiwit alsmede het verschil in grootte van de door de

9001711

verschillende STNV mutanten gecodeerde eiwitten. De resultaten zijn samengevat in Tabel 1. Daaruit blijkt, dat

--- de STNV mutanten met een leesraam mutatie (+14 of +36 basen) een verkort manteleiwit geven waarvan de lengte groter is

5 naarmate de insertie verder naar het 3' uiteinde ligt

--- de insertie mutanten met een hersteld leesraam (+18, +30 of +36 basen) een groter manteleiwit geven dan het wild type,

terwijl de onderlinge mobiliteit (+18 > +30 > +36) overeenkomt

10 met het hogere molekuulgewicht, dat verwacht wordt op grond van het aantal toegevoegde aminozuren (+6, +10 en +12)

--- alleen de plasmiden, waarbij het gemodificeerde STNV in de .1 oriëntatie ten opzichte van de promoter is ingevoegd, manteleiwit geven.

(c2) plasmide infecties

15 Voor de plasmide infecties werden, tenzij anders is aangegeven, pBR STNV plasmiden gebruikt. Het plasmide pSTNV 413 werd bij de infecties als positieve controle gebruikt om de verschillende experimenten te kunnen correleren. Als negatieve controle werd pBR STNV N843 toegepast, die reeds eerder als
20 replicatie-deficiënt was vastgesteld. Wanneer de signalen na de primaire infectie zeer zwak of afwezig waren, werden op cowpea secundaire infecties met RNA-extracten uitgevoerd om duidelijker RNA en eiwit signalen te verkrijgen.

Bij de analyse van het geïnoculeerde bladmateriaal
25 werden de synthese van manteleiwit door Western blotting en die van RNA door Northern blotting bepaald. Voor het RNA werden enkel- en dubbelstrengs RNA gescheiden en de aanwezigheid ervan afzonderlijk bepaald. De resultaten zijn eveneens in Tabel 1 samengevat. Daaruit blijkt, dat

30 --- dsRNA (dubbelstrengs RNA) aanwezig is bij alle mutanten met een insertie in het manteleiwitgen en alleen ontbreekt bij de mutanten met een insertie op positie 843

--- manteleiwit en normale hoeveelheden ssRNA (enkelstrengs RNA) alleen gevonden worden bij de mutanten N164, N200 en Brad

35 --- bij de insertie mutanten waarbij geen manteleiwit wordt gevonden, de planten ook veel minder ssRNA bevatten

9001711

--- de lengte van het manteleiwit dat voor de mutanten N164, N200 en Brad in de planten en in E. coli NF1 gemaakt wordt, gelijk is.

Door hybridisatie met een strengspecifieke probe (met
 5 een SP6 RNA transcript van STNV of met de geschikte enkelstrengs linker voor de verschillende mutanten) werd vastgesteld dat het bij de verschillende infecties geïsoleerde ssRNA positiefstrengs is en derhalve overeenkomt met het genomisch RNA (ook wanneer geen manteleiwit, geen partikels en slechts kleine hoeveelheden
 10 ssRNA aanwezig zijn).

Naast de verschillende pBR STNV plasmiden werden voor de mutanten N164.1, N164.2, Brad.1 en Brad.2 ook de pPLC en pPCV plasmiden voor plasmide infecties gebruikt, met gelijke
 15 resultaten.

(c3) expressie van STNV mutanten in getransformeerde planten

Transformaties van tabak SR1 werden uitgevoerd met de volgende T-plasmiden:

pPCV 520

20 pPCV STNV N164.1 en .2

pPCV STNV N164N843.1 en .2

pPCV STNV Brad.1 en .2

Transformatie met pPCV 520 werd uitgevoerd als controle op het transformatie experiment zelf. Door het gebruik van de
 25 infectieve STNV mutant N164 met een linker insertie in het manteleiwitgen kan bij de analyse van de resultaten zowel het manteleiwit (+6 aminozuren) van de mutant als het RNA (door hybridisatie met de specifieke linker) van het wild type worden onderscheiden. De mutant N164N843 werd gekozen als replicatie-
 30 deficiënt genoom. Bij deze mutant wordt de insertie N164 gebruikt om het manteleiwit te kunnen identificeren en te onderscheiden van het wild type, terwijl de twee ingebrachte linkers identificatie van het RNA mogelijk maken. De mutant STNV Brad werd gebruikt voor transformatie om vast te stellen of de
 35 expressie van het fusie-eiwit tussen het STNV manteleiwit en het bradykinine geamplificeerd wordt door een infectie van de

transformanten met het helpervirus TNV. De getransformeerde planten worden aangeduid met SR1, gevolgd door de identificatie van de STNV mutant en verder gevolgd door een nummer waarmee de onafhankelijke transformanten met dezelfde mutant geïdentificeerd worden.

De kanamycine resistente planten die na transfer op hormoonvrij medium met kanamycine normaal wortels ontwikkelden, werden vermeerderd voor verder onderzoek. Van deze planten werden ook callusculturen aangelegd om de transformatie van de kanamycine resistente planten te kunnen bevestigen door octopine tests. Het octopine synthase gen in het T-DNA van pPCV 520 staat namelijk onder controle van een weefsel-specifieke promotor van T-DNA gen5, die alleen in stengelfragmenten (erg zwak) en in callusweefsel tot expressie komt, zodat de octopine tests bij voorkeur op callusweefsel worden uitgevoerd. Meer dan 90 % van de kanamycine resistente planten bleek inderdaad getransformeerd te zijn.

Getransformeerde planten werden onder steriele groei-condities verkregen. Voor TNV infectie werden kleine topscheuten eerst in vitro beworteld en daarna overgezet in potgrond om onder serre condities verder gekweekt te worden. De planten werden verder opgegroeid en, wanneer ze voldoende groot waren, geïnfecteerd met TNV. De mechanische infectie geschiedde met een vers TNV-inoculum, geïsoleerd uit tabak SR1. Na 72 uur werden de geïnfecteerde bladeren geoogst, ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -70 °C. Naast de met TNV geïnfecteerde bladeren werden ook niet-geïnfecteerde bladeren van dezelfde planten geoogst en geanalyseerd.

De aanwezigheid van STNV RNA en manteleiwit in de verschillende monsters werden resp. bepaald door Northern en Western blotting, waarvan de resultaten in Tabel 2 zijn samengevat. Uit de tabel blijkt, dat --- TNV infectie van planten, die getransformeerd zijn met STNV onder controle van een constitutieve plantepromoter en geflankeerd door geïnverteerde poly-GC-gebieden, leidt tot de replicatie en expressie van het STNV genoom en tot de vorming

9001711

van STNV partikels

--- de als replicatie-deficiënt gekarakteriseerde insertiemutant N164N843 normaal in getransformeerde planten repliceert

5 --- de STNV constructie met een fusie tussen het manteleiwit en het bradykinine na infectie met TNV replicatie van het mRNA en geamplificeerde synthese van het fusie-eiwit geeft

--- het gedetecteerde STNV RNA volgens de hybridisaties met de verschillende linkers overeenkomt met het mutante genoom waarmee de planten waren getransformeerd

10 --- de planten met het STNV genoom in de .2 oriëntatie, die dus het anti-sense mRNA aanmaken, na infectie met TNV eveneens STNV replicatie en expressie geven, zonder waarneembare verschillen met de .1 planten

15 --- de verschillen in de sterkte van de RNA en eiwit signalen niet gecorreleerd zijn met het type of de oriëntatie van de mutante STNV genomen, maar typisch zijn voor het individuele karakter van onafhankelijke transformanten met hetzelfde genoom.

Doordat slechts 10 mg plantenmateriaal werd gebruikt voor de bepalingen, kon in de getransformeerde planten zonder
20 TNV infectie noch RNA, noch manteleiwit worden gedetecteerd.

Bij herhaling van de experimenten werden telkens kwalitatief en kwantitatief dezelfde resultaten verkregen. Significante variaties werden alleen voor de efficiëncy van de TNV infectie waargenomen, in afhankelijkheid van diverse
25 factoren zoals de ouderdom en het differentiatieniveau van de geïnfecteerde planten, de kwaliteit van het inoculum, de temperatuur, de vochtigheid, enz. Wanneer de TNV infectie onvoldoende sterk was, werden alleen zwakke RNA signalen en geen eiwit signalen verkregen. Bij een goede TNV infectie werden
30 daarentegen veel sterkere STNV signalen verkregen dan in het geval van de plasmide infecties. Op basis van de intensiteit van de bij Western analyse verkregen signalen kon de hoeveelheid manteleiwit worden geschat op ongeveer 100 ng in een uit 10 mg bladmateriaal bereid monster. Rekening houdende met de beperking
35 van de synthese van het STNV manteleiwit tot het gebied van de necrotische lesies waar ook TNV aanwezig is, welke lesies

9001711

slechts ongeveer 5 % van het totale blad uitmaken, kan hieruit worden berekend dat het STNV signaal ongeveer 0,02 % van het totale, natte bladgewicht of ongeveer 0,5 % van het drooggewicht uitmaakt. Deze relatief grote hoeveelheid eiwit wordt in slechts
5 3 dagen gevormd, nadat expressie door TNV infectie is geïnduceerd.

Uit de resultaten met de STNV N164 en Brad mutanten blijkt, dat de 18-meer insertie en de fusie met bradykinine geen invloed op de repliceerbaarheid en de expressie van het STNV-RNA
10 hebben. Dit bewijst dat het manteleiwit geheel of gedeeltelijk kan worden vervangen zonder nadelige gevolgen voor repliceerbaarheid en expressie van het STNV-RNA. Zie ook het hierna volgende voorbeeld 2.

Geheel onverwacht bleek dat de mutant N164N843, anders
15 dan in het geval van de plasmide infecties, in getransformeerde planten normaal replicateerde (door linker hybridisatie werd bewezen dat de 14-meer insertie op positie N843 inderdaad aanwezig was in het gedetecteerde en gerepliceerde RNA). De afwezigheid van ssRNA en dsRNA bij plasmide infecties met STNV
20 N843 is dus kennelijk niet het gevolg van een deficiënte replicatie. Verder is gebleken dat replicatie van het STNV-RNA niet afhankelijk is van de aan- of afwezigheid van STNV manteleiwit of STNV partikels. Aangezien bij deze mutanten de
25 spreiding van STNV infectie van cel tot cel normaal plaats vindt, kan hiervoor alleen het virale RNA (ds of ss) verantwoordelijk zijn. Het verschillend gedrag van de mutant N843 bij plasmide infecties en in getransformeerde planten kan echter worden verklaard door aan te nemen dat deze mutatie de normale cel tot cel verspreiding van de STNV infectie door RNA
30 verhindert. Bij plasmide infecties is deze mutant niet infectief. In getransformeerde planten komt het STNV-mRNA echter in alle cellen voor en is verspreiding niet nodig om normale replicatie te krijgen. Het STNV-RNA bezit derhalve naast structurele elementen voor replicatie ook structurele elementen
35 die nodig zijn voor cel tot cel transport. Waarschijnlijk zal daarbij een TNV-gecodeerd eiwit een actieve rol spelen.

9001711

In de transformanten waar STNV in de .2 oriëntatie ten opzichte van de plantepromoter is ingevoegd, wordt het anti-sense of negatiefstrengs RNA als boodschapper RNA gevormd. Eerdere pogingen om met behulp van SP6-transcripten een STNV infectie te initiëren met het negatiefstrengs RNA waren mislukt. In getransformeerde planten blijkt dit na inductie wel te gaan, en wel even efficiënt als met de STNV .1-transformanten. Het is derhalve mogelijk om de expressie van een gen gedurende de gehele groeifase van de plant volledig te onderdrukken doordat alleen het anti-sense boodschapper RNA van een eiwit wordt geproduceerd, en om expressie te beperken tot de periode dat de helper functies voor replicatie aanwezig zijn, waarbij in een korte tijd door replicatie en amplificatie van het anti-sense tot coderend sense-RNA een sterke expressie kan worden verkregen. Vooral voor de synthese van toxische produkten kan het van groot belang zijn om de expressie daarvan gedurende de groeiperiode volledig te onderdrukken om een negatieve invloed op de ontwikkeling van de planten te vermijden.

20 (c4) In vivo deleties

Bij plasmide infecties met STNV, wild type en mutanten, werden vaak secundaire infecties uitgevoerd om bij de analyse van de mutanten duidelijker signalen voor RNA en eiwit te krijgen. Deze infecties gebeurden met totaal RNA (ds en ss) uit deze planten, waarbij zowel de STNV als de TNV infectie werden overgedragen. Door aldus dezelfde infectie drie tot vier maal na elkaar voort te zetten konden deletiemutanten van het STNV worden geïsoleerd. Bij Northern blotting was het RNA van deze mutanten zichtbaar als duidelijke, sneller migrerende discrete banden. In verschillende infectielijnen ontstonden onafhankelijk van elkaar verschillende mutanten, waarbij de lengte van het replicerende RNA variëerde van ongeveer 600 tot 900 basen. Wanneer in een infectielijn dergelijke deletiemutanten van STNV ontstonden, bleek het oorspronkelijke wild type genoom na 1 of 2 verdere infecties te verdwijnen. Ook konden bij bestaande en vrij grote deletiemutanten bijkomende deleties leiden tot de

9001711

vorming van kleinere derivaten. Bij voortzetting van een dergelijke infectielijn verdween dan de grotere mutant. Algemeen werd vastgesteld, dat bij voldoende herhaling van deze infecties STNV deletiemutanten ontstonden met een genoom van ongeveer 600
5 basen. Door Western blotting werd aangetoond, dat de STNV deletiemutanten niet meer coderen voor het manteleiwit. Door hybridisaties met verschillende fragmenten van het STNV genoom werd bepaald dat de deletie aan het 5' uiteinde van het genoom ligt.

10 Elementen die een rol lijken te spelen bij het ontstaan van deze deletiemutanten zijn:
--- het ontbreken van een manteleiwit waardoor de mutanten niet meer ingekapseld worden en al het positiefstrengs RNA in de geïnfekteerde cellen beschikbaar blijft voor replicatie en
15 eventueel voor verspreiding van de infectie
--- aangezien grotere deleties (zonder manteleiwitgen) verder evolueren naar nog kleinere genomen, kan worden aangenomen dat de mutanten sneller repliceren en een meer efficiënte infectie doormaken naarmate ze kleiner zijn (bij de deletiemutanten wordt
20 in de planten steeds meer STNV-RNA aangetroffen dan bij het wild type, en de hoeveelheid stijgt naarmate de mutanten kleiner worden).

De belangrijkste waarneming bij het optreden van deze deletiemutanten is echter hun sterke interferentie met het TNV
25 helpervirus. Wanneer in een RNA infectielijn STNV deletiemutanten ontstaan, neemt de hoeveelheid TNV zeer sterk af. Deze afname is na 1 of 2 verdere infecties zo sterk, dat zonder toevoeging van vers TNV of TNV-RNA aan het RNA-inoculum geen nieuwe infecties meer uitgevoerd kunnen worden. De STNV mutanten
30 die hier door de onnatuurlijke RNA-inoculaties ontstaan, blijken derhalve een zeer efficiënte onderdrukking van de TNV infectie te geven.

De in vitro geconstrueerde deletiemutant STNV D1 werd ter vergelijking door plasmide infectie op cowpea geïnfecteerd.
35 Wanneer deze mutant overeenkomstig de in vivo deleties door RNA inoculatie werd gepropageerd, bleek zijn replicatie efficiënter

dan van de oorspronkelijke N164 mutant. Evenals de mutanten die in vivo ontstaan, onderdrukt STNV D1 de TNV replicatie. Dit komt tot uiting in een geringe infectiviteit van een RNA inoculum uit deze planten.

5 De in vitro geconstrueerde deletiemutant STNV D1 werd ook naar tabak SR1 getransformeerd om te onderzoeken of de invloed op TNV replicatie tot bescherming van de getransformeerde planten tegen TNV infectie zou leiden. Om het effect van de expressie van het RNA van de STNV deletiemutant op de
10 ontwikkeling en het verloop van de infectie met TNV te bepalen, werden ter vergelijking de volgende planten onder zoveel mogelijk gelijke omstandigheden gegroeid, geïnfecteerd en verder geobserveerd:

--- SR1

15 --- SR1 STNV N164N843.1/1 en /2, met resp. sterke en zwakke expressie van STNV

--- SR1 STNV D1.1/1

Bij elk van deze planten werden 4 bladeren geïnfecteerd die een gelijkaardige ontwikkeling en differentiatie hadden.
20 Voor de infectie werden een vers inoculum, bereid uit TNV-geïnfecteerde cowpea, en een ingevroren inoculum uit geïnfecteerde tabak gebruikt, beide 1/1 (resp. inoculum 1 en 3 genoemd) en 1/10 (inoculums 2 en 4) verdund. Met elk van de 4 inoculums werden 2 halve bladeren op gelijksoortige plaatsen bij
25 de verschillende planten geïnfecteerd; deze bladeren werden van onder naar boven a tot en met d genoemd. Op deze manier ontstonden de volgende combinaties: a1 en a2, b3 en b4, c2 en c4, en d1 en d3.

Na 72, -96 en 170 uur werd de ontwikkeling van de
30 infectie geobserveerd en fotografisch vastgelegd. Na 96 uur werden eveneens deeltjes van elk blad genomen en onder UV belichting gefotografeerd om de hypersensitiviteitsrespons van de planten te onderzoeken. Na 96 uur werd het halve blad van elke plant met de best ontwikkelde lesies (b3) geoogst. Een deel
35 hiervan werd ingevroren en bewaard voor verdere analyse op RNA en eiwit samenstelling. Het andere deel werd gebruikt voor de

bereiding van een inoculum om cowpea bladeren te infecteren. Voor elk van de tabaksplanten werden 4 cowpea bladeren geïnfecteerd:

- met een extract uit één enkele lesie (1 blad)
- 5 --- met een extract uit 200 mg bladweefsel (2 bladeren)
- met een 1/5 verdunning hiervan (1 blad)

Uit de foto's (niet getoond) bleek dat er een groot verschil optrad in de ontwikkeling van de TNV infectie bij de verschillende tabaksplanten. De belangrijkste verschillen waren:

- 10 --- het aantal lesies op de verschillende bladeren verschilde volgens het gebruikte inoculum (3 > 4 > 1 > 2), met een gering onderscheid tussen de planten (SR1 > SR1 N164N843.1/1 en /2 > SR1 D1.1/1)
- de lesies bij SR1 D1.1/1 zijn duidelijk kleiner dan bij de
15 andere planten; het grootste verschil is er met tabak SR1 en N164N843.1/1, terwijl N164N843.1/2 tussen beide in ligt. De grootteverschillen van de lesies op 1 plant afhankelijk van het blad (a > b > c > d) zijn normaal en hangen samen met het ontwikkelingsniveau van de bladeren
- 20 --- vooral na 170 uur is het duidelijk dat vrij grote delen van de geïnfecteerde bladeren van SR1 en SR1 N164N843.1/1 volledig necrotiseren, terwijl de overeenkomstige bladeren van D1/1 weliswaar lesies vertonen maar verder normaal groen blijven
- bij UV belichting worden fluorescerende ringen en vlekken
25 zichtbaar die een gevolg zijn van de hypersensitiviteitsreactie van de plant. Hierdoor worden aangetaste delen van de plant door een ring van weefsel afgesloten, leidende tot het afsterven van deze delen. Voor SR1 D1.1/1 zijn deze veel kleiner dan voor de andere planten. Dit wijst op een minder vergaande aantasting van
30 het blad.

Na 96 uur werd van elke plant een deel van het halve blad b3 gebruikt om een inoculum te bereiden, waarmee dan cowpea bladeren werden geïnfecteerd. Na 72 uur waren er zeer duidelijke verschillen in het niveau van infectie van de cowpea bladeren te
35 zien. De plant, die geïnfecteerd was met de uit de deletieplant bereide inoculums, gaf lesies maar elk van de bladeren was nog

9001711

groen. De andere planten hadden na 72 uur veel verder gevorderde necrotisering en verschillende van de bladeren waren zo ver aangetast dat ze reeds volledig verdroogd waren en er bijna afvielen.

5 Om de hoeveelheid TNV-RNA in de verschillende planten te vergelijken werd getracht om de aanwezigheid van TNV ds en ssRNA aan te tonen in EtBr-gekleurde agarose gels. De hoeveelheid TNV-manteleiwit werd door Western blotting bepaald. Gevonden werd, dat de hoeveelheid TNV-RNA in SR1 D1.1/1 minder was dan bij de
10 andere planten. De hoeveelheid manteleiwit was in SR1 D1.1/1 ongeveer 20 keer lager dan in tabak SR1, terwijl de hoeveelheid in SR1 N164N843.1/1 en /2 tussen beide in lag. Ook de secundair geïnfecteerde cowpea bladeren werden onderzocht op de aanwezigheid van TNV-RNA en dit gaf hetzelfde beeld als bij de
15 tabaksplanten.

De aanwezigheid van RNA van STNV deletiemutanten leidt er bij massale infectie van de plant of delen daarvan toe, dat geen, minder of pas later volledige necrotisering en verlies van de aangetaste delen optreedt. In aangetaste maar beschermde
20 planten wordt veel minder TNV geproduceerd, wat remmend werkt op de verspreiding van de infectie naar andere planten. Het gehele beschermende effect wordt gerealiseerd met de synthese van een verwaarloosbare hoeveelheid RNA. Pas wanneer inderdaad infectie optreedt, worden door de viraal gecodeerde replicatiefuncties
25 hoge en beschermend werkende concentraties deletie-RNA gemaakt. Dit geschiedt bovendien alleen in de geïnfecteerde cellen, waardoor de energiebelasting voor de plant verwaarloosbaar is.

Voorbeeld II

30 In de hierin beschreven experimenten werd gebruik gemaakt van het glucuronidase gen van *E. coli*, omdat het enzym glucuronidase zijn activiteit behoudt als fusie-eiwit, geen plantaardige glucuronidase activiteit bekend is en de enzym-activiteit op een kwantitatieve en zeer gevoelige wijze kan
35 worden gedetecteerd. Het in de verschillende constructies gebruikte glucuronidase (GUS) gen (*uidA*) werd als PstI-EcoRI

9001711

fragment geïsoleerd uit het plasmide pRAJ255, beschreven door Jefferson et al in PNAS 83, 8447-8451 (1986). Om het GUS gen op de gewenste positie en in het juiste leesraam in het STNV-cDNA te kunnen invoegen, werden de volgende aanpassingen uitgevoerd:

5 --- door substitutie van het 1549 bp ScaI-NdeI fragment van het plasmide pPLC 321 door het overeenkomstige fragment van plasmide pPLC 2820 (hetgeen leidt tot verwijdering van de PstI site in het ampicilline gen) werd het plasmide pPLC 322 geconstrueerd --- door insertie in de unieke NcoI site van pPLC 322 van een
10 synthetische linker met de structuur:

```
CATGGCTAGCAGCTGCAGGAATTCATGCATC
      CGATCGTCGACGTCCTTAAGTACGTAGGTAC
```

werd het plasmide pPLC 323 verkregen

--- door het GUS gen bevattende PstI-EcoRI fragment van pRAJ255
15 in pPLC 323 te kloneren werd het plasmide pPLC GUS1 verkregen, waarin het GUS gen door twee NcoI knipplaatsen wordt geflankeerd --- in pPLC GUS1 bevindt zich juist voor het coderende gedeelte van het GUS gen een unieke PstI knipplaats; door het plasmide met PstI te knippen en de 4 basen lange 3'-overhangende
20 uiteinden met behulp van T4-polymerase te verwijderen werd het plasmide pPLC GUS dPst1.1 verkregen, dat nog steeds de twee NcoI sites bevat.

De inserties van het GUS gen werden uitgevoerd in de volgende STNV-plasmiden:

25 --- pPLC STNV N160.1 en .2 (de sense en de anti-sense oriëntatie ten opzichte van de pL promotor), met een volledig STNV genoom, voorzien van een 14 bp linker insertie op positie 160. De ingevoegde linker bevat een unieke NcoI knipplaats --- door linker mutagenese werd op positie 28 van het STNV genoom
30 de base A vervangen door de base C, hetgeen leidt tot het ontstaan van een NcoI knipplaats die overlapt met het startcodon van het manteleiwit gen. De introductie van deze mutatie in STNV N160 gaf de plasmiden pPLC STNV N160Nco1.1 en .2. Na knippen met NcoI en ligeren kan het 134 bp grote NcoI fragment van deze
35 plasmiden worden gedeleteerd, leidende tot de plasmiden pPLC STNV dNco1.1 en .2.

9001711

De inserties van het GUS gen in STNV werden als volgt tot stand gebracht:

- het GUS gen werd als NcoI fragment uit pPLC GUS1 gekloneerd in pPLC STNV N160.1 en .2. In de goede oriëntatie gaf dit de
- 5 plasmiden pPLC STNV GUS.1 en .2, waarbij het GUS gen in het juiste leesraam is gefuseerd met het 5'-gedeelte van het STNV manteleiwit. Translatie van het fusie-eiwit stopt ter hoogte van het stopcodon van het GUS gen, het 3'-gedeelte van het mantel-
- 10 eiwit wordt niet vertaald. Deze constructies vertegenwoordigen in feite de zuivere insertie van het GUS gen in STNV
- het GUS gen werd als NcoI fragment uit pPLC GUS dPst1.1 gekloneerd in de NcoI knipplaats van pPLC STNV dNco1.1 en .2, waarbij de plasmiden pPLC STNV GUS dNco1.1 en .2 werden
- 15 verkregen. De insertie was zodanig, dat het AUG startcodon van STNV bewaard bleef, gevolgd door 7 codons uit de synthetische linker en in het juiste leesraam aansluitend op het startcodon van het GUS gen. Translatie stopt eveneens ter hoogte van het stopcodon van het GUS gen en levert dus het glucuronidase met
- 20 8 extra aminozuren aan het aminotermine uiteinde
- de plasmiden pPLC STNV GUS.1 en .2 en pPLC STNV GUS dNco1.1 en .2 werden geknipt met NsiI (dit restrictie-enzym knipt juist achter het GUS gen en precies aan het einde van het manteleiwit
- 25 gen) en geligeerd. Aldus werd een NsiI fragment van 468 bp gedeleteerd en werden resp. de plasmiden pPLC STNV GUS dNsi1.1 en .2, en pPLC STGUS.1 en .2 verkregen. Deze laatste plasmiden pPLC STGUS.1 en .2 bevatten de constructies, waarin het manteleiwit gen volledig is vervangen door het GUS gen.

Uitgaande van de pPLC plasmiden werden de constructies STNV GUS en STGUS als BamHI-SalI fragment overgekloneerd in de

30 plantevector pPCV 520, achter de pTR1' promoter. Hierbij draait de oriëntatie ten opzichte van de promoter om, zodat bijv. uit pPLC STGUS.1 het plasmide pPCV STGUS.2 ontstaat.

Expressie in planten werd getest door plasmide infecties van cowpea met de verschillende STNV-GUS constructies. Daarvoor

35 werden de plasmiden pPLC STNV GUS.1 en .2, en pPCV STNV GUS.1 en .2 gebruikt. Cowpea bladeren werden geïnfecteerd met plasmide en

helpervirus en 3 dagen na inoculatie geoogst. Een vers geoogst
blad werd een nacht geïncubeerd in een 2 mM oplossing van X-Gluc
(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronzuur) in 40 mM
fosfaatbuffer, pH 7,4, bij 37 °C. Daarna werden de bladeren
5 gefixeerd in glutaraaldehyde (6 uur) en ontkleurd met een
ethanol reeks (van 30 tot 95 %). Omzetting van het X-Gluc door
het glucuronidase leidt tot de vorming van een onoplosbaar
blauwgekleurd neerslag.

Met de vier bovenstaand genoemde plasmiden werden vier
10 onafhankelijke infectiereeksen uitgevoerd op cowpea, waarbij in
twee gevallen bij de geïncubeerde bladeren een gelocaliseerde
blauwe reactie werd waargenomen. Met pPLC STNV GUS.1 werd ter
hoogte van een lesie een blauwe rand waargenomen. Na een
microscopisch onderzoek van het gefixeerde materiaal bleek de
15 kleurreactie gelocaliseerd in de plantecellen die juist aan de
rand van de lesie lagen. Met pPLC STNV GUS.2 was de reactie
zichtbaar in de vorm van een 0,3 mm grote vlek. Bij een
microscopisch onderzoek kon niet worden vastgesteld of de
reactie intracellulair was, omdat de plantecellen gedurende de
20 incubatie met het substraat te sterk beschadigd waren door
aantasting door bacteriële contaminatie. Omdat de blauwe kleur
tijdens fixatie, ontkleuring, inbedding en snijden bewaard
bleef, kan echter met vrij grote zekerheid worden aangenomen dat
de reactie plant-specifiek was.

25 Voorts werd ook een transformatie van tabak uitgevoerd,
waarbij de T-plasmiden pPCV STNV GUS.1 en .2 werden gebruikt.
Voor beide constructies werden transformanten verkregen. GUS
tests vóór en na TNV infecties van de opgegroeide transformanten
bleken aan de verwachtingen te voldoen.

30

Voorbeeld III

Isolatie van het gen voor replicase van Tobacco Necrosis Virus

Als startmateriaal werd Tobacco Necrosis Virus (TNV)
35 Kassanis stam A en serotype A, dat Satellite Tobacco Necrosis
Virus (STNV) SV-1 (SV-A serotype) kan vermenigvuldigen,

9001711

gebruikt. Deze stam werd verkregen van Dr. Wieringa Brants, Phytopathologisch Laboratorium, Baarn, Nederland. TNV, vrij van STNV, werd verkregen zoals beschreven door van Emmelo et al., Virology 157, 480-487 (1987).

5 TNV virus werd vermeerderd in Phaseolus bladeren (*Vigna unguiculata*, cowpea), door infectie met virus en carborundum. Genomisch RNA werd bereid uit gezuiverde TNV-partikels en met AMV reverse transcriptase (Boehringer) onder toepassing van random primers omgezet in cDNA. De tweede streng synthese werd
10 verricht door *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) en RNAaseH (Boehringer) volgens de methode van Gubler en Hoffman (Gene 25, 263-269, 1983). Hierna werd T4 DNA polymerase toegevoegd om de einden blunt te maken. Na klonering in plasmide pSP64 (Promega), geknipt met *Sma*I waarbij tevens de uiteinden
15 met phosphatase werden behandeld, werden de kloons door transformatie naar *E. coli* MC1061 overgebracht en de kolonies getest door kolonie-hybridisatie met gefragmenteerd ³²P ds TNV RNA.

Subgenomisch ssRNA bereid uit met TNV geïnfecteerde
20 Phaseolus bladeren werd gebruikt voor Northern hybridisatie met de geselecteerde TNV kloons. Deze subgenomische RNAs waren resp. 1,25 kb, 1,5 kb en 3,8 kb lang. Het subgenomische RNA werd na agarosegel-electroforese geïmmobiliseerd op een nylon membraan filter (Fall Biotec) en gehybridiseerd met ³²P gemerkt kloon
25 DNA. Geselecteerd werd een kloon (pSPTNV127), die hybridiseerde met de twee 3' subgenomische TNV RNAs en een fragment, gelegen tussen positie 1900 en 2300 van het TNV RNA, bevatte. Restrictie-analyse toonde aan dat dit fragment een intern *Hpa*II fragment bevatte dat gebruikt kon worden als primer voor de cDNA
30 synthese van het replicase gen dat 5' terminaal gelegen is op het TNV RNA. Voor de preparatieve cDNA klonering werd echter gebruik gemaakt van een synthetisch oligonucleotide, afgeleid uit de sequentie van pSPTNV127: 5' GCTTGTGAGTATCA 3'. Deze sequentie is complementair aan het genomisch RNA.

35 De synthese van het cDNA werd uitgevoerd zoals hierboven beschreven maar in aanwezigheid van methyl-kwik-hydroxide om het

RNA beter kopieerbaar te maken (Lenstra et al., Gen. Anal. Techn. 5, 57-61, 1988). Men verkreeg aldus een 2,2 kb streng die overeenkomt met het gebied van het replicase gen van TNV. Na klonering in pSP64 werden uit 1500 kloons, drie kloons
5 geselecteerd die een 2,2 kb fragment in de sense oriëntatie ten opzichte van de SP6 promoter bevatten.

Met behulp van SP6 polymerase en uitgaande van de kloon pSPTNV94 werd RNA bereid dat in een tarwekiem extract onder andere aanleiding gaf tot synthese van een 73 kD eiwit, wat het
10 verwachte molecuulgewicht is van de TNV replicase.

Bij dit experiment werd ³⁵S methionine gebruikt tijdens de proteïne synthese en het 73 kD eiwit werd gedetecteerd na SDS PAGE en autoradiografie.

De sequentie van pSPTNV94 werd bepaald door de dideoxy
15 methode van Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, 1977) na klonering van fragmenten in pUC18 plasmide. De strategie voor het bepalen van de nucleotidensequentie is weergegeven in fig.3 en de sequentie in fig.4.

Het fragment in pSPTNV127 bleek het 3' uiteinde van het
20 replicase gen te bevatten. Om een volledige kloon van het replicase gen van TNV te verkrijgen werd gebruik gemaakt van een unieke XmaI site in pSPTNV94 en pSPTNV127 DNA en een unieke SacI site in de polylinker van pSP64. Door een ligatie van het kleine XmaI-SacI fragment van pSPTNV127 in het grote pSPTNV94 fragment
25 met XmaI en SacI uiteinden werd pSPTNV rep-1 verkregen. De kloon is 2236 basen lang, waarbij het langste open leesraam te vinden is van base 50 tot base 2221 (absoluut leesraam t.o.v. de eerste base: 2) met een intern stopcodon op positie 656. Dit open leesraam, na vertaling en gebruik van een suppressor tRNA op
30 positie 656-658, codeert voor een replicase van 724 aminozuren. Voor verdere toepassingen werd het interne stopcodon TAG, d.m.v. specifieke mutagenese, veranderd in een codon TAT, coderend voor Tyr.

Een E. coli stam MC1061 [pSPTNV rep-1], die het plasmide
35 pSPTNV rep-1 bevat, is op 26 juli 1990 bij het Centraalbureau

voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Nederland, gedeponeerd onder nummer CBS90.

Voorbeeld IV

5 Expressie, met amplificatie van het boodschapper RNA door TNV replicase, van een chloramphenicol-acetyl-transferase gen, gefuseerd met een deel van het STNV manteleiwit gen

1. Constructie van een DNA sequentie, waarin een deel van
10 het STNV manteleiwit gen gefuseerd is met het chloramphenicol-acetyl-transferase gen

Het plasmide pSTNV N198 werd beschreven door Van Emmelo et al. (Virology 157, 480-487, 1987). Het bevat een 14 bp NcoI
15 linker in de EcoRV site van het manteleiwit gen van STNV. Door knippen met NcoI, invullen van de uiteinden met E. coli polymerase en terug liggeren werd het leesraam weer hersteld: Asp(56)/Ser-Met-His-Gly-Asn-Ser/Ile(57).

Het verkregen plasmide geeft aanleiding tot vorming van
20 STNV infectieve partikels in coïnfecties met TNV van Phaseolus bladeren (*Vigna unguiculata*, cowpea). Dit plasmide werd pSTNV N202 genoemd. Het PstI fragment, bevattende het STNV cDNA N202, werd overgekloneerd in pSP65 (Promega). Het verkregen plasmide werd pSPSTNV N 202 genoemd (fig.5). Uit pBR325 werd het
25 chloramphenicol-acetyl-transferase gen (CAT gen) gehaald als een TaqI fragment, dat vervolgens blunt end werd gemaakt met het Klenow fragment van E. coli DNA polymerase. pSPSTNV N202 werd geknipt met NsiI en blunt end gemaakt. Vervolgens werd het TaqI fragment gekloneerd in het NsiI gedeleteerde pSPSTNV N202
30 plasmide.

De sense oriëntatie t.o.v. de SP6 promoter werd pSPSTNV CAT-1 en de non-sense oriëntatie pSPSTNV CAT-2 genoemd (zie fig.5).

35 2. Expressie van het chimeer CAT gen met behulp van TNV virus in bladeren van Phaseolus (*Vigna unguiculata*)

9001711

Bladeren van cow pea werden geïnfecteerd met hetzij TNV en STNV-plasmide, hetzij TNV en pSPSTNV CAT-1. Veertig uur na inoculatie werden de bladeren geextraheerd met PBS buffer met
 5 0,1% Triton X100 en werd het extract behandeld met anti-STNV manteleiwit serum. Immunoprecipitatie met proteïne A-sepharose werd gevolgd door veelvuldig wassen.

De chloramphenicol-acetyl-transferase activiteit werd op de complexen bepaald met 1-¹⁴C-acetyl-coenzyme A en
 10 chloramphenicol zoals beschreven door Gorman et al. (Molec. Cell. Biol. 2, 1044-1081, 1982) en door De Block et al. (EMBO J. 3, 1681-1689, 1984).

CAT activiteit kon alleen aangetoond worden in de bladeren die met TNV en pSPSTNV CAT-1 werden geïnfecteerd en
 15 waarvan het extract met STNV antiserum werd behandeld (de resultaten worden hier niet getoond).

3. Vermenigvuldiging van het STNV-CAT RNA

20 Twee dagen na inoculatie van cow pea bladeren met TNV en pSPSTNV CAT-1 DNA werden de bladeren geoogst en de nucleinezuurfractie geïsoleerd. DNA werd verwijderd met RNAase-vrije DNAase I en het RNA werd geanalyseerd door Northern hybridisatie met CAT specifiek, ³²P gemerkt DNA (TaqI fragment uit pBR325).
 25 Zowel in de ss RNA als de ds RNA fractie werd een band van ca. 1750 nucleotiden gedetecteerd (de resultaten worden hier niet getoond). Hieruit blijkt dus duidelijk dat het pSPSTNV CAT-1 plasmide DNA door TNV omgezet wordt in ss en ds STNV CAT-1 RNA.

30 Figuurbespreking

Figuur 1 toont de kaart van het plasmide pPCV 520. Het T-DNA van dit plasmide is aangeduid met een dikke lijn en wordt begrensd door linker (LB) en rechter (RB) grenssequenties; de unieke restrictiesites voor SalI en BamHI kunnen worden gebruikt
 35 voor klonering van fragmenten tussen de plantepromoter pTR1' en het polyadenylatiesignaal pAg7, en de restrictiesites BglII en

BclI voor klonering tussen pnos en pAg4. Het kanamycine resistentie gen NPT-II wordt tot expressie gebracht door pTR2' en pAocs. Het octopine gen wordt tot expressie gebracht met de weefsel-specifieke promoter pg5 en pAocs. De pBR322-sequenties met de replicatie-oorsprong (oriV, colE1) en de ampicilline resistentie (Ap) liggen in het T-DNA. De pRK2 oorsprong van replicatie (ori V) en transfer (ori T), het chlooramphenicol resistentie gen (Cm) en de cohesieve uiteinden van lambda (cos) liggen buiten het T-DNA.

10 Figuur 2 toont de kaart van het plasmide pMP90RK. Op de plaats waar de KpnI fragmenten 9 en 12 van pGV 3100 elkaar raken werd het T-DNA inclusief de grenssequenties gedeleteerd. Het virulentiegebied is volledig intact. Door uitwisselings-recombinatie werden het gen voor gentamycine resistentie (Gm) en
15 een fragment van pRK 2013, dat de genen voor transfer (tra1, tra2 en tra3), replicatie (trfa) en kanamycine resistentie (Km) draagt, ingebracht.

 Figuur 3 toont schematisch de restrictiekaart van het gebied van het TNV replicase gen en de voor de sequentie bepaling gebruikte fragmenten. De fragmenten werden na klonering in pUC18
20 in beide richtingen of twee keer geanalyseerd volgens de dideoxy methode van Sanger teneinde de nucleotidensequentie te bepalen.

 Figuur 4 toont de volledige sequentie van het replicase gen van TNV. De aminozuursequentie vertoont homologie met de
25 replicase genen van CarMV (Carnation Mottle Virus) en TuCV (Turnip Crinkle Virus). Het amber stopcodon op positie 656 is in het natuurlijke genoom aanwezig. Voor verdere toepassingen werd dit stopcodon vervangen door TAT dat codeert voor het aminozuur Tyr. De start- en stopcodons zijn resp. met ▲ en ▼ aangegeven.
30 De aminozuursequentie start op nucleotide positie 50 en stopt op positie 2221.

 Figuur 5 toont schematisch de constructie van de plasmiden pSPSTNVCAT1 en pSPSTNVCAT2. Details over deze constructie zijn beschreven in voorbeeld IV.

9001711

Tabel 1

	STNV mutant	<u>E. coli</u> NF1 manteleiwit	cowpea manteleiwit	ssRNA	dsRNA
5	wild type	+	+	++	++
	N162	+ (kort)	-	+	++
	N164	+ (+6 a.z.)	+ (+6 a.z.)	++	++
	S164	+ (kort)	-	+	++
10	Brad	+ (+10 a.z.)	+ (+10 a.z.)	++	++
	N198	+ (kort)	-	+	++
	N200	+ (+6 a.z.)	+ (+6 a.z.)	++	++
	S200	+ (+12 a.z.)	-	+	++
	N320	+ (kort)	-	+	++
15	N322	+ (+6 a.z.)	-	+	++
	N531	+ (kort)	-	+	++
	N533	+ (+6 a.z.)	-	+	++
	S613	+ (+6 a.z.)	-	+	++
	N843	+	-	-	-
20	N164N843	+ (+6 a.z.)	-	-	-

Met "a.z." wordt aminozuren bedoeld; "kort" duidt op een verkort manteleiwit. De aanwezigheid en grootte van het manteleiwit werd door Western blotting bepaald. RNA werd gehybridiseerd met een
 25 STNV-DNA probe, die gemerkt was met ³²P.

Tabel 2

30	STNV en controle planten	STNV manteleiwit		STNV RNA (ds en ss)				
		- TNV	+ TNV	- TNV met STNV DNA	+ TNV	14	18	30
	N164.1	-	+ tot +++	-	+ tot +++	-	+	-
	N164.2	-	+ tot +++	-	+ tot +++	-	+	-
35	N164N843.1	-	++ tot +++	-	++ tot +++	+	+	-
	N164N843.2	-	+ tot +++	-	+ tot +++	+	+	-
	Brad.1	-	+ tot +++	-	+ tot +++	-	-	+
	Brad.2	-	++	-	++	-	-	+
	tabak SR1	-	-	-	-			
40	520	-	-	-	-			

Van de getransformeerde planten werden per STNV mutant meerdere onafhankelijk geïsoleerde planten getest. STNV manteleiwit (+6 en +10 aminozuren) werd door Western blotting, RNA door Northern
 45 hybridisatie met ³²P-gemerkt STNV-DNA bepaald. Onafhankelijke transformanten met hetzelfde mutante genoom gaven verschillend sterke signalen, wat met het aantal + tekens wordt aangegeven. Voor de Western en Northern blottings werd per monster 10 mg

9001711

bladmateriaal gebruikt. Door hybridisatie met de verschillende linkers (14-, 18- en 30-meer) werd de identiteit van de STNV genomen bevestigd.

CONCLUSIES

1. Recombinant DNA, omvattende twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties met daartussen ten minste één nucleotidensequentie die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een
5 viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen gen, dat voor viraal RNA/RNA polymerase codeert, en geen gen, dat voor viraal manteleiwit codeert, omvat.
2. Recombinant DNA volgens conclusie 1, waarbij de van RNA
10 virus afgeleide sequentie zowel cis-elementen voor replicatie als cis-elementen voor transport omvat.
3. Recombinant DNA volgens conclusie 1 of 2, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie ook cis-elementen voor verpakking in manteleiwit omvat.
- 15 4. Recombinant DNA volgens een der conclusies 1-3, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie tevens cis-elementen voor translatie omvat.
5. Recombinant DNA volgens een der conclusies 1-4, waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotiden-
20 sequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens ten minste één nucleotidensequentie bevindt, die codeert voor een ribozym, dat viraal RNA of mRNA kan knippen.
6. Recombinant DNA volgens conclusie 1, waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve
25 de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere RNAs codeert.
7. Recombinant DNA volgens conclusie 6, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor
30 replicatie en cis-elementen voor translatie omvat en zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale

nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere eiwitten/peptiden codeert.

8. Recombinant DNA volgens een van de conclusies 1-7, opgenomen in een expressie-cassette voor een te transformeren gastheercel waardoor in de gastheercel transcriptie kan plaatsvinden onder vorming van een RNA molecuul met een steelpanstructuur.

9. Eukaryotische of prokaryotische cellen of organismen, welke door genetische manipulatie voorzien zijn van recombinant DNA volgens conclusie 8.

10. Eukaryotische of prokaryotische cellen of organismen volgens conclusie 9, welke door genetische manipulatie tevens voorzien zijn van recombinant DNA, omvattende genetische informatie voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in een induceerbare of weefselspecifieke expressie-cassette.

11. Werkwijze voor het beschermen van eukaryotische organismen, zoals in het bijzonder planten, gisten en schimmels, tegen een RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, door een genetische manipulatie van het te beschermen organisme uit te voeren waarbij in het genoom van dit organisme recombinant DNA wordt ingebouwd dat in een werkzame expressiecassette twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties met daartussen een van RNA virus afgeleide nucleotidensequentie omvat, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen gen, dat voor viraal RNA/RNA polymerase codeert, en geen gen, dat voor viraal manteleiwit codeert, omvat:

12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie zowel cis-elementen voor replicatie als cis-elementen voor transport omvat.

13. Werkwijze volgens conclusie 11 of 12, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie tevens cis-elementen voor verpakking in manteleiwit omvat.

9001711

14. Werkwijze volgens een van de conclusies 11-13, waarbij de van RNA virus afgeleide sequentie tevens cis-elementen voor translatie omvat.

15. Werkwijze volgens een van de conclusies 11-14, waarbij
5 zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotiden-
sequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens
ten minste één nucleotidensequentie bevindt, die voor een
ribozym codeert, dat viraal RNA of mRNA kan knippen.

16. Werkwijze voor het op een induceerbare wijze produceren
10 van een of meerdere eiwitten/peptiden door een prokaryotisch of
eukaryotisch organisme, of cellen van een prokaryotisch of
eukaryotisch organisme, welk organisme door genetische
manipulatie is voorzien van recombinant DNA dat in een werkzame
expressiecassette twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd
15 gerepeteerde nucleotidensequenties omvat met daartussen een
nucleotidensequentie, die afgeleid is van RNA virus, dat voor
zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA
polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten
minste cis-elementen voor replicatie en cis-elementen voor
20 translatie, maar geen gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA
polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit,
omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde
nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide
sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt,
25 die voor een of meerdere eiwitten/peptiden codeert, in sense dan
wel in anti-sense oriëntatie, te kweken en met het virus te
infecteren.

17. Werkwijze voor het op een induceerbare wijze of op een
weefsel-specifieke wijze produceren van een of meerdere
30 eiwitten/peptiden door een eukaryotisch organisme te kweken, in
het genoom waarvan door genetische manipulatie zowel recombinant
DNA is ingebouwd dat in een werkzame expressiecassette twee,
12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleotiden-
sequenties omvat met daartussen een nucleotidensequentie, die
35 afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk
is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus

9001711

afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie en
cis-elementen voor translatie, maar geen gen, dat codeert voor
viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal
manteleiwit, omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd
5 gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus
afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie
bevindt, die voor een of meerdere eiwitten/peptiden codeert, in
sense dan wel in anti-sense oriëntatie, als ook recombinant DNA
is ingebouwd dat genetische informatie voor een viraal RNA/RNA
10 polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in een
induceerbare of weefsel-specifieke expressie-cassette omvat.

18. Werkwijze voor het op een induceerbare wijze produceren
van een of meerdere RNAs, zoals ribozymen, antisense RNAs en
dubbelstrengs RNAs, door een prokaryotisch of eukaryotisch
15 organisme, of cellen van een prokaryotisch of eukaryotisch
organisme, welk organisme door genetische manipulatie is voor-
zien van recombinant DNA dat in een werkzame expressiecassette
twee, 12-250 baseparen lange, geïnverteerd gerepeteerde nucleo-
tidensequenties omvat met daartussen een nucleotidensequentie,
20 die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie
afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze
van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor
replicatie, maar geen gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA
polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit,
25 omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde
nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide
sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt,
die voor een of meerdere RNAs codeert, in sense dan wel in anti-
sense oriëntatie, te kweken en met het virus te infecteren.

30 19. Werkwijze voor het op een induceerbare wijze of op een
weefsel-specifieke wijze produceren van een of meerdere RNAs,
zoals ribozymen, antisense RNAs en dubbelstrengs RNAs, door een
eukaryotisch organisme te kweken, in het genoom waarvan door
genetische manipulatie zowel recombinant DNA is ingebouwd dat in
35 een werkzame expressiecassette twee, 12-250 baseparen lange,
geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties omvat met

9001711

daartussen een nucleotidensequentie, die afgeleid is van RNA virus, dat voor zijn replicatie afhankelijk is van een viraal RNA/RNA polymerase, waarbij deze van RNA virus afgeleide sequentie ten minste cis-elementen voor replicatie, maar geen gen, dat codeert voor viraal RNA/RNA polymerase, en geen gen, dat codeert voor viraal manteleiwit, omvat, en waarbij zich tussen de twee geïnverteerd gerepeteerde nucleotidensequenties behalve de van RNA virus afgeleide sequentie tevens een niet-virale nucleotidensequentie bevindt, die voor een of meerdere RNAs codeert, in sense dan wel in anti-sense oriëntatie, als ook recombinant DNA is ingebouwd dat genetische informatie voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct in een induceerbare of weefsel specifieke expressie-cassette omvat.

20. Recombinant DNA, omvattende een nucleotidensequentie die codeert voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct.

21. Recombinant DNA volgens conclusie 20, omvattende het voor een viraal RNA/RNA polymerase coderende deel van de in fig.4 getoonde nucleotidensequentie, dan wel daarvan afgeleide constructen, zoals een substitutiemutant die op de plaatsen 656-658 volgens de in fig.4 gehanteerde nummering de sequentie TAT heeft i.p.v. de sequentie TAG, en substitutiemutanten waarin een gedeelte van de in fig.4 getoonde sequentie vervangen is door een overeenkomstig gedeelte van een ander gen, dat voor een viraal RNA/RNA polymerase codeert.

22. Recombinant DNA volgens conclusie 20 of 21, waarbij de nucleotidensequentie, die voor een viraal RNA/RNA polymerase of een RNA/RNA polymerase construct codeert, gelegen is in een induceerbare of weefsel specifieke expressie-cassette.

30

9001711

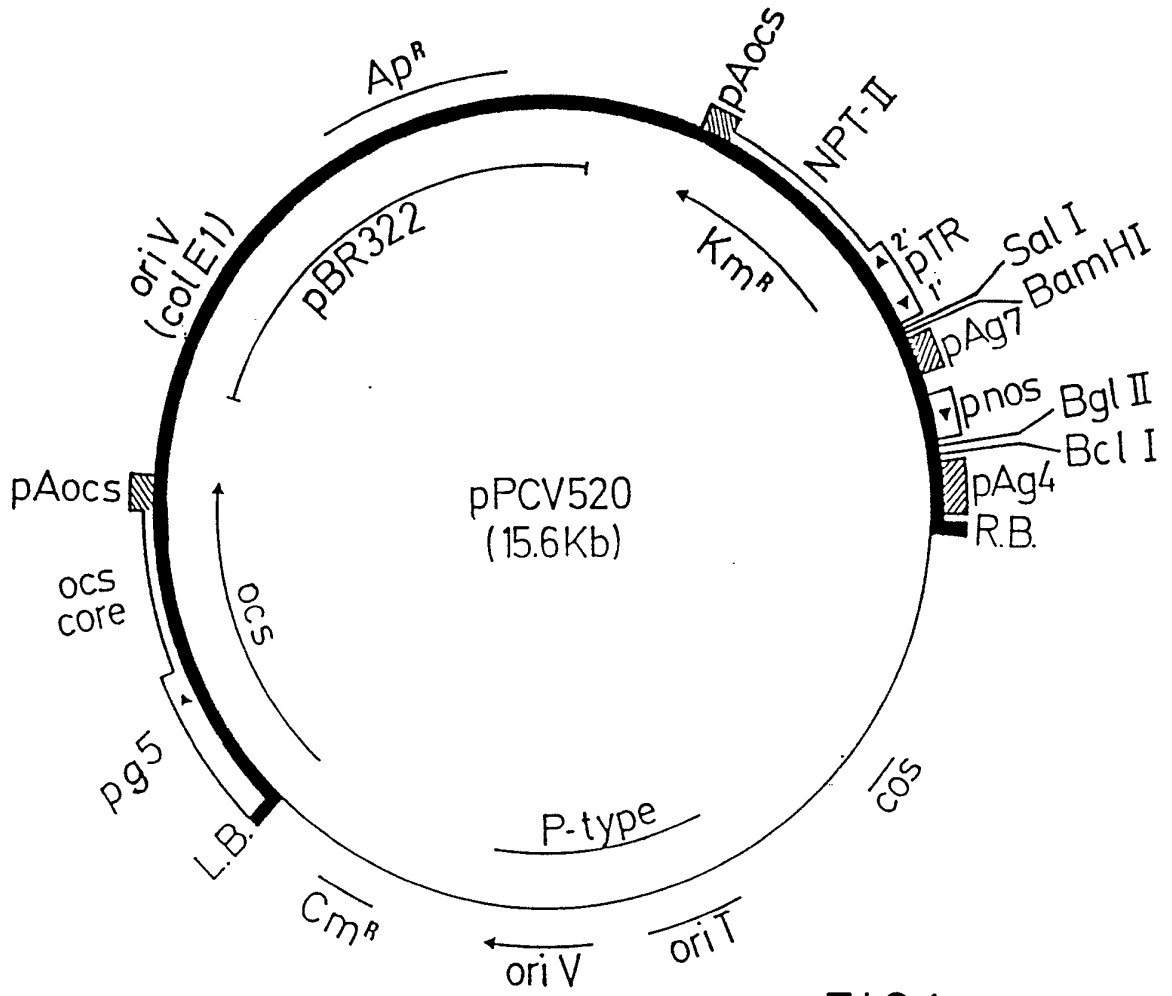


FIG.1

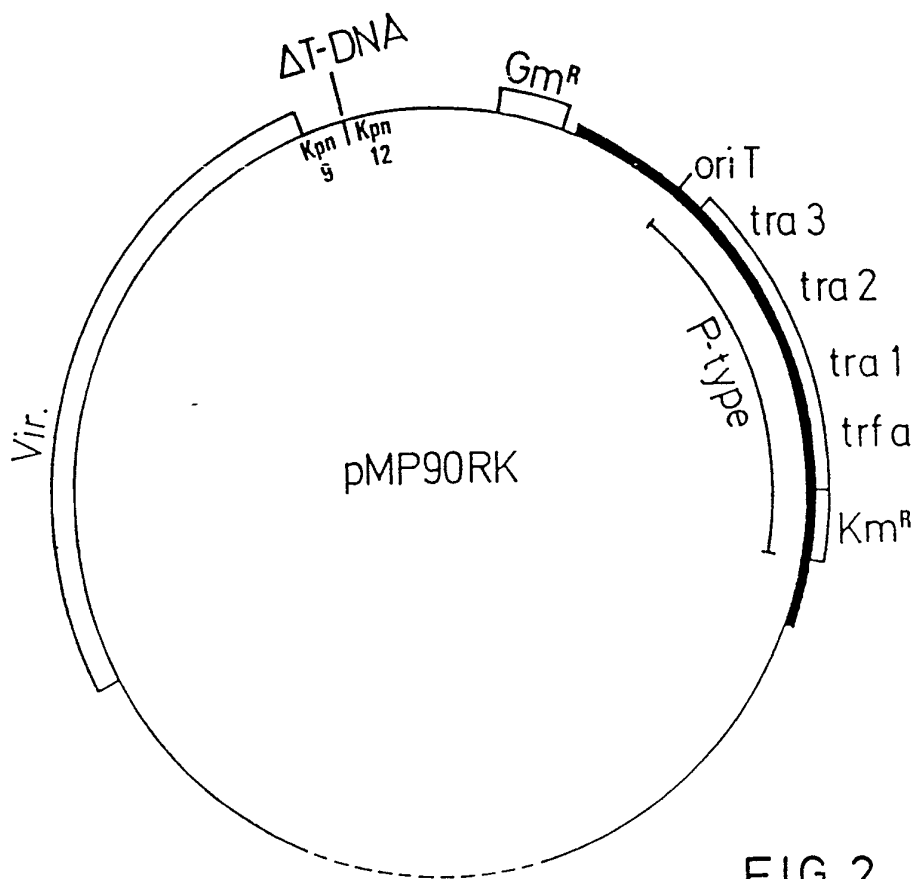


FIG.2

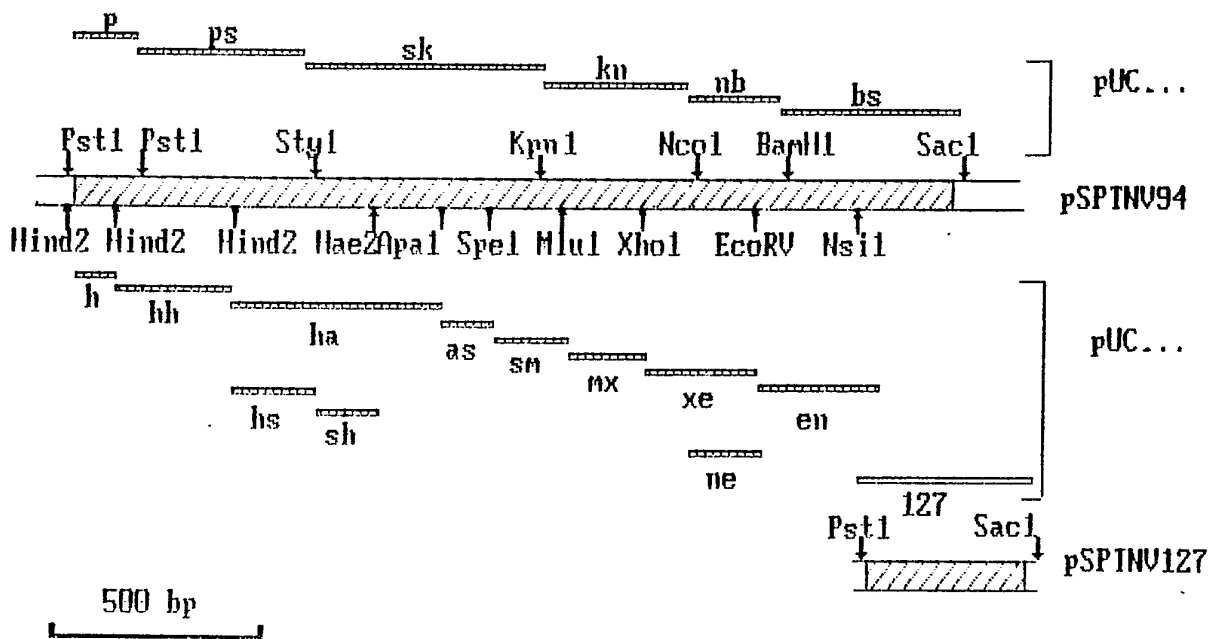


FIG.3

10	20	30	40	50	60
CCAAGAAATACCAAAIAGGTGCAAGGCCTTACTCAGCTAAAGAGTCTAAAATGGAGCTACC					
GlnGluTyrGlnIleGlyAlaArgProTyrSerAlaLysGluSerLys <u>MET</u> GluLeuPro					
▲					
70	80	90	100	110	120
AAACCAACACAAGCAATCAGCCGCCGAGGGTTTTGTATCTTTCCTAAACTGGCTATGCAA					
AsnGlnHisLysGlnSerAlaAlaGluGlyPheValSerPheLeuAsnTrpLeuCysAsn					
130	140	150	160	170	180
CCCATGGAGACGACAGCGAACAGTCAACGCTGCAGTTGTGTTCCAAAAAGATCTTCTAGC					
ProTrpArgArgGlnArgThrValAsnAlaAlaValValPheGlnLysAspLeuLeuAla					
190	200	210	220	230	240
CATTGAGGATTCGAGCATTIGGATGATATCAATGAGTGTTTCGAAGAATCTGCTGGGGC					
IleGluAspSerGluHisLeuAspAspIleAsnGluCysPheGluGluSerAlaGlyAla					
250	260	270	280	290	300
ACAATCCCAGCGAACTAAGGTTGTCGCCGACGGAGCATATGCCCCGCAAAATCCAATAG					
GlnSerGlnArgThrLysValValAlaAspGlyAlaTyrAlaProAlaLysSerAsnArg					
310	320	330	340	350	360
GACCCGCCGAGTTCGTAAGCAGAAAAAGCACAAAGTTTGTCAAATATCTTGTC AACGAAGC					
ThrArgArgValArgLysGlnLysLysHisLysPheValLysTyrLeuValAsnGluAla					
370	380	390	400	410	420
TCGTGCCGAGTTTGGATIGCCTAAACCAACTGAGGCAAACAGACTCATGGTCCAACATTT					
ArgAlaGluPheGlyLeuProLysProThrGluAlaAsnArgLeu <u>MET</u> ValGlnHisPhe					

FIG. 4

430 440 450 460 470 480
 CTTGCTCAGGGTGTGTAAAGGATTGGGGCGTTGTTACAGCCCACGTACACGGCAACGTTGC
 LeuLeuArgValCysLysAspTrpGlyValValThrAlaHisValHisGlyAsnValAla
 490 500 510 520 530 540
 ACTAGCTTTGCCACTGGTGTTCATTCCAACGGAAGATGATCTGCTATCACGASCATTGAT
 LeuAlaLeuProLeuValPheIleProThrGluAspAspLeuLeuSerArgAlaLeuMEI
 550 560 570 580 590 600
 GAACACACATGCTACTAGAGCTGCTGTACGAGGCATGGACAATGTCCAAGGCCAAGGGTG
 AsnThrHisAlaThrArgAlaAlaValArgGlyMEIAspAsnValGlnGlyGlnGlyTrp
 610 620 630 640 650 660
 GTGGAACAATAGGTTGGGGATTGGGGCCAGATCGGACTGGCCTTCCGGTCCAAATAGGG
 TrpAsnAsnArgLeuGlyIleGlyGlyGlnIleGlyLeuAlaPheArgSerLys---Gly
 670 680 690 700 710 720
 GTGCCTTGAAAGGAGGCCAGGATTCTCCACGTCGGITTCGCGTGGGGAACATCCTGATCT
 CysLeuGluArgArgProGlyPheSerThrSerValSerArgGlyGluHisProAspLeu
 730 740 750 760 770 780
 GGTGGTCATACCATCAGGGCGCCCTGAGAAACAGCGTCAGTTGTTACGCTACAGTGGTAT
 ValValIleProSerGlyArgProGluLysGlnArgGlnLeuLeuArgTyrSerGlyIle
 790 800 810 820 830 840
 AGGCGGCCATTTATTAATCGGCATCCACAACAACTCTCTTTCCAACCTGCGTAGGGGCTT
 GlyGlyHisLeuLeuIleGlyIleHisAsnAsnSerLeuSerAsnLeuArgArgGlyLeu
 850 860 870 880 890 900
 GATGGAGAGAGTATTCTACGTCGAGGGGCCCAATGGGCTCCAAGACGCCCTAAGCCCGT
MEIGluArgValPheTyrValGluGlyProAsnGlyLeuGlnAspAlaProLysProVal

9001711

910 920 930 940 950 960
 | | | | | |
 CAAGGGAGCTTTCCGGACCCTTGATAAGTTTTCGTGATCTCTATACTAAAAATAGTTGGCG
 LysGlyAlaPheArgThrLeuAspLysPheArgAspLeuTyrThrLysAsnSerTrpArg

970 980 990 1000 1010 1020
 | | | | | |
 TCATACCCCTGTAAGTGAACAATTCCTAATGAATTACACGGGCAGGAAACTGACTAT
 HisThrProValThrSerGluGlnPheLeuMETAsnTyrThrGlyArgLysLeuThrIle

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 | | | | | |
 TTACAGAGAGGCGGTTGATAGTTTGTGCGCATCAACCCCTTAGCTCACGAGATGCGAAGCT
 TyrArgGluAlaValAspSerLeuSerHisGlnProLeuSerSerArgAspAlaLysLeu

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 | | | | | |
 AAAGACATTCGTGAAGGCCGAAAAATTAAACCTTTCTAAGAAGCCTGACCCTGCTCCCAG
 LysThrPheValLysAlaGluLysLeuAsnLeuSerLysLysProAspProAlaProArg

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 | | | | | |
 GGTCATAAACCTAGATCGCCTCGGTATAACGTTTGTGGGCAGGTACCTCCGACATTA
 ValIleGlnProArgSerProArgTyrAsnValCysLeuGlyArgTyrLeuArgHisTyr

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 | | | | | |
 TGAACATCACGCGTTTAAAACCATTGCCAAGTGCTTTGGGGAATCACGGTCTTCAAAGG
 GluHisHisAlaPheLysThrIleAlaLysCysPheGlyGluIleThrValPheLysGly

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 | | | | | |
 GTTTACTCTGGAGCAACAAGGGGAAATCATGCGCTCGAAGTGAATAAATATGTTAATCC
 PheThrLeuGluGlnGlnGlyGluIleMETArgSerLysTrpAsnLysTyrValAsnPro

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 | | | | | |
 CGTTGCGGTCGGACTTGACGCCAGTCGTTTCGACCAACACGTGTCTGTTGAAGCACTCGA
 ValAlaValGlyLeuAspAlaSerArgPheAspGlnHisValSerValGluAlaLeuGlu

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 | | | | | |
 GTATGAGCATGAATTTTATCTCAGAGATTACCCAAATGATAAACAGCTAAAATGGCTGCT
 TyrGluHisGluPheTyrLeuArgAspTyrProAsnAspLysGlnLeuLysTrpLeuLeu

9001711

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AAAGCAGCAATTGTGCAACGTGGGAACGGCATTGCCAGTGACGGTGTATAAAATACAA
 LysGlnGlnLeuCysAsnValGlyThrAlaPheAlaSerAspGlyValIleLysTyrLys

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GAAGAAGGGTTGTAGAATGAGCGGAGACATGAACACGAGTTTGGGCAACTGCATTTTAAAT
 LysLysGlyCysArgMETSerGlyAspMETAsnThrSerLeuGlyAsnCysIleLeuMET

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GTGCGCCATGGTCTACGGGTIGAAAGAACACTTAAACATCAATTTGTCCCTTGCAAATAA
 CysAlaMETValTyrGlyLeuLysGluHisLeuAsnIleAsnLeuSerLeuAlaAsnAsn

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TGGGGATGACTGCGTCATTGTCTGTGAGAAAGCGGATTTAAAGAAATTGACGAGCAGCAT
 GlyAspAspCysValIleValCysGluLysAlaAspLeuLysLysLeuThrSerSerIle

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CGAGCCATATTTCAAGCAGTTTGGATTCAAGATGGAAGTGGAAAAACCCGTGGATATCTT
 GluProTyrPheLysGlnPheGlyPheLysMETGluValGluLysProValAspIlePhe

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TGAGCGTATAGAATTTTGCCAAACCCAGCCTGTGTTTGGATGGATCCCAATATATCATGGT
 GluArgIleGluPheCysGlnThrGlnProValPheAspGlySerGlnTyrIleMETVal

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 ACGCAAACCTTCAGTTGTAACATCCAAAGACGTCACCAGCCTCATCCCATGTCAAACGAA
 ArgLysProSerValValThrSerLysAspValThrSerLeuIleProCysGlnThrLys

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 AGCACAATACGCAGAATGGCTGCAAGCTGTGGGTGAGTGTGGCATGAGCATCAATGGTGG
 AlaGlnTyrAlaGluTrpLeuGlnAlaValGlyGluCysGlyMETSerIleAsnGlyGly

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 | | | | | |
 GATTCCTGTTATGCAGAATTTCTACCAGATGCTCCAAACTGGCATCCGCCGCACAAAATT
 IleProValMETGlnAsnPheTyrGlnMETLeuGlnThrGlyIleArgArgThrLysPhe

 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 | | | | | |
 CACCAAGACCGGCGAGTTCAGACGAACGGATTGGGGTATCACTCTAGATTTATGCATAG
 ThrLysThrGlyGluPheGlnThrAsnGlyLeuGlyTyrHisSerArgPheMETHisArg

 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 | | | | | |
 AGTGGCCCGGGTCCCTTCGCCTGAAACCCGTTTATCCTTCTATCTAGCTTTCCGGTATCAC
 ValAlaArgValProSerProGluThrArgLeuSerPheTyrLeuAlaPheGlyIleThr

 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 | | | | | |
 ACCAGACCTCCAAGAAGCAATGGAGATCTTCTATGATACTCACAAGCTTGATTGGATGA
 ProAspLeuGlnGluAlaMETGluIlePheTyrAspThrHisLysLeuAspLeuAspAsp

 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 | | | | | |
 TGTTATCCCGACTGATACCTACCAAGTGTGAGGAGAGCATTGATCAATGGATTACCAA
 ValIleProThrAspThrTyrGlnValSerGlyGluHisLeuIleAsnGlyLeuProAsn

 2230
 |
 CTGATGTAACGGAGGA
 ---CysAsnGlyGly
 ▼

FIG.4

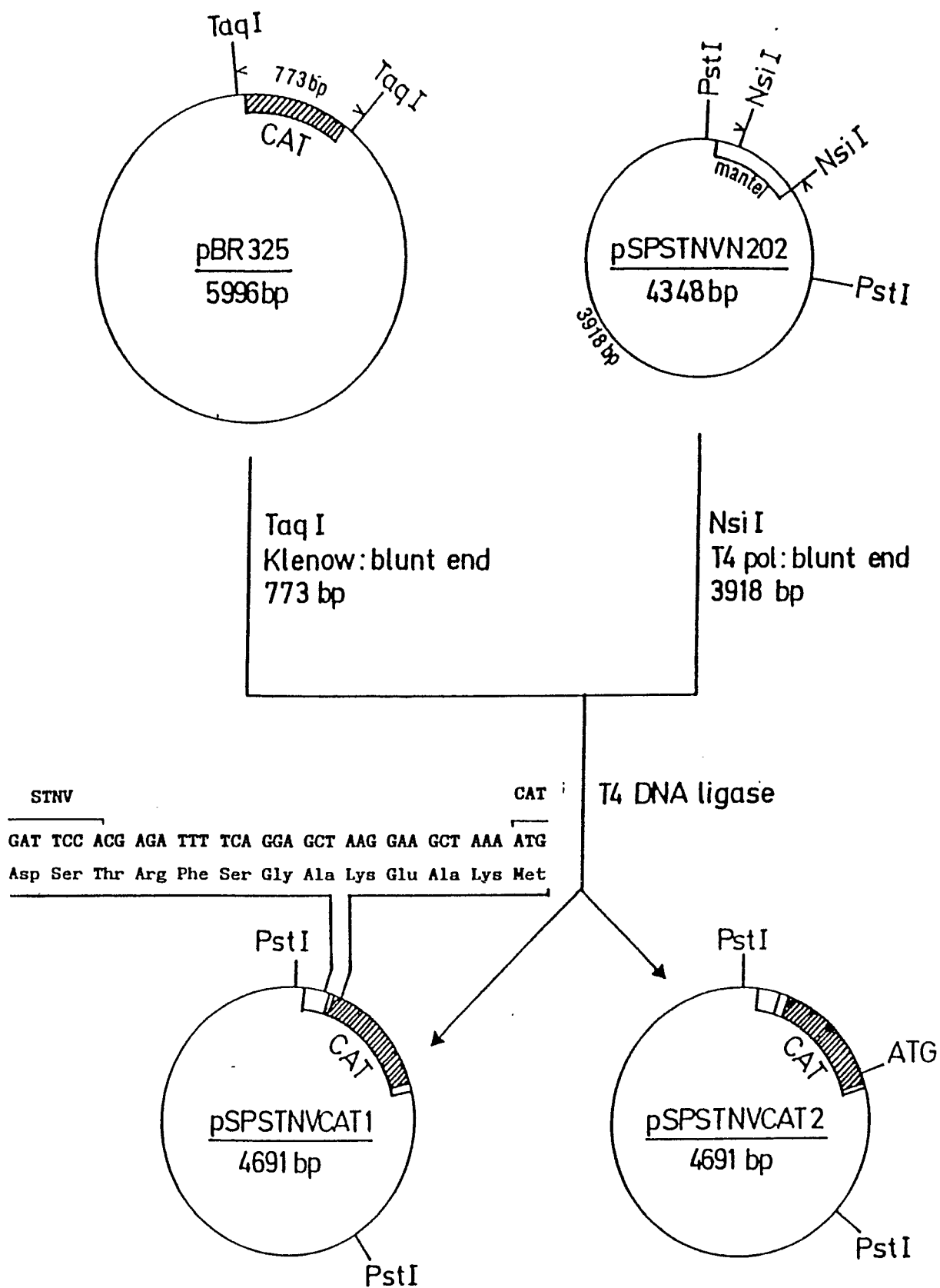


FIG.5