

81.227



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a células vegetais que são resistentes a inibidores herbicidas da glutamina sintetase (GS), em que a resistência é causada por níveis de actividade da GS que, quando presentes numa célula vegetal sensível a inibidores herbicidas de GS, tornem a célula substancialmente resistente a inibi-

=====

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

"CELULAS VEGETAIS RESISTENTES A INIBIDORES HERBICIDAS DE GLUTAMINA SINTETASE"



-2-

dores herbicidas de GS.

A glutamina sintetase é uma enzima vegetal que tem um importante papel na assimilação do amoníaco e na regulação do metabolismo do azoto.

Este invento permite conferir a plantas seleccionadas grande resistência a inibidores de GS nomeadamente a fosfinotricina (PPT).

REFERENCIA A PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

O presente pedido de patente é em parte a continuação da application Serial No.656 488, entre gue em 1 de Outubro de 1984 no United States Patent and Trademark Office.



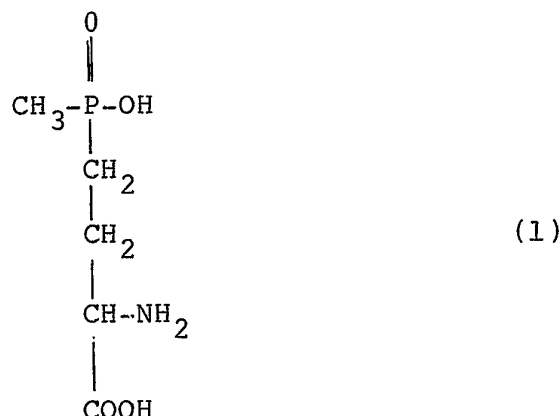
CAMPO TECNICO

O presente invento relaciona-se com a utilização da tecnologia de DNA recombinante para transformação de células vegetais, e, mais especificamente, a projecção e construção de células vegetais que sejam resistentes aos inibidores da glutamina sintetase vegetal herbicidas tais como fosfinotricina.

FUNDAMENTO DO INVENTO

A Glutamina Sintetase (GS) é uma enzima vegetal que desempenha um papel central na assimilação de amonia e na regulação do metabolismo do azoto. Uma vez que a glutamina sintetase é na maior parte das plantas, pela via da glutamina sintetase/glutamato sintetase a mais eficaz maneira de desintoxicar a amonia libertada pela redução de nitratos, degradação de aminoácidos ou fotorespiração, as plantas são muito susceptíveis a inibidores da glutamina sintetase.

Um dos inibidores mais potentes da glutamina sintetase agora conhecido é a fosfinotricina (1) (daqui em diante PPT):



PPT é um análogo do ácido glutâmico. O composto foi inicialmente isolado a partir de um antibiótico tripeptídico produzido por Streptomyces viridochromogenes (Bayer E. et al, Helvetica Chimica Acta, 55:224 (1972)., ver também a Patente Alemã Dos 2717440, Hoechst A.G.). PPT é um forte inibidor competitivo da glutamina sintetase de E.coli com um K_i de 0,0059mM.

Scwerdtle F. (Zeitschrift fur Pflanzen-Krankheiten und Pflanzenschutz, IX, 431-440(1981) demonstrou que o PPT é um herbicida foliar não selectivo para o controle de plantas mono e dicotiledóneas em pomares, vinhas, plantações com lavoura mínima, sementeira directa e como um auxiliar de colheita. Ensaio de campo na Alemanha Federal, Espanha, Africa do Sul, E.U.A. e Japão, mostraram que a maior parte das ervas daninhas dicotiledóneas eram bem controladas. Para as ervas-daninhas monocotiledóneas era necessário quantidades mais elevadas para um bom controle. Leason, M. et al. (Phytochemistry, volume 21: 855-857 (1982) demonstraram que o PPT é um inibidor competitivo misto da glutamina sintetase de folha da ervilheira com um valor de K_i aparente de 0,073 mM.

Seria de grande interesse poder-se conferir resistência ao PPT assim como a outros inibidores de GS em plantas seleccionadas, uma vez que a selectividade herbicida é bastante crucial em qualquer herbicida



útil comercialmente. O PPT como foi indicado não é selectivo.

Existem alguns precedentes da existência de glutamina sintetases resistentes a outros compostos. Sabe-se que a metionina sulfoximina (MSO), um outro análogo de glutamato, é um inibidor competitivo misto (valor de K_i de 0,16mM) da glutamina sintetase da folha de ervilheira (Leason, M. et al., Phytochemistry 21:855-857 (1982). Miller, E.S. e Brenchley, J.E. (The Journal of Biological Chemistry 256:11307-11321 (1981)) estudaram as propriedades de vários mutantes de Salmonella resistentes ao MSO. Mais recentemente, Young e Ringold (Ibid 258:11260-11266(1983)) divulgaram que células 3T6 de ratinho crescidas na presença de MSO desenvolveram resistência a este. As células resistentes ao MSO possuem mRNA enriquecido em glutamina sintetase e os outros sugeriram que esta observação implicava uma amplificação do gene.

Ver também Sanders e Wilson, EMBO J. 3:65-71(1984). Nem os estudos de Miller nem os de Young ou de Sanders diziam respeito a GS vegetal.

Ainda, antes do presente invento não foram divulgados quaisquer estudos ou tentativas para conferir resistencia aos inibidores de GS herbicidas, tais como PPT, através de manipulação dos genes da glutamina sintetase em células vegetais.

Seria portanto desejável criar células vegetais que fossem resistentes aos inibidores de GS herbicidas, tais como PPT, pela manipulação dos genes da glutamina sintetase nas referidas células. Deste modo, seria possível conferir selectividade herbicida a qualquer planta.



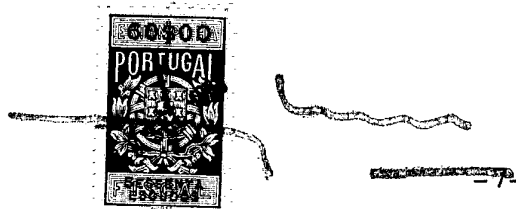
Divulgação do Invento

O presente invento surgiu da descoberta de que a resistencia ac PPT em plantas pode surgir devido a superprodução de glutamina sintetase, um fenomeno que, nas experiências iniciais se mostrou ser devido a um mecanismo de amplificação do gene subjacente. Ao aplicar-se a pressão selectiva em certas células vegetais em cultura de tecidos foi possível, isolar estirpes resistentes ao PPT. A resistencia no entanto, não foi devida ao presença de um mutante estrutural da glutamina sintetase que tivesse menos afinidade para o PPT, mas antes, devido a amplificação do gene de e concomitante aumento das concentrações do enzima nas células vegetais. Destas observações iniciais surgiu o conceito do invento de criar células vegetais que superproduzissem glutamina sintetase (e assim apresentassem resistencia ao inibidor de GS herbicida), quer por centri-amplificação do gene quer por outros mecanismos diferentes da amplificação de genes.

O invento baseia-se assim, na produção de uma célula vegetal que é resistente ao inibidor da glutamina sintetase (GS) herbicida, onde a referida resistência é causada por níveis de actividade GS em células vegetais que quando presentes numa célula vegetal de outro modo sensível ao inibidor de GS herbicida, tornaria a referida célula substancialmente resistente ao referido inibidor de GS herbicida.

O invento pode ser conseguido por uma variedade de métodos e portanto abrange várias realizações práticas. Por exemplo, numa das execuções, o invento baseia-se na produção de uma célula vegetal tendo uma combinação de genes compreendendo:

- a) uma primeira sequencia genetica codificadora de uma



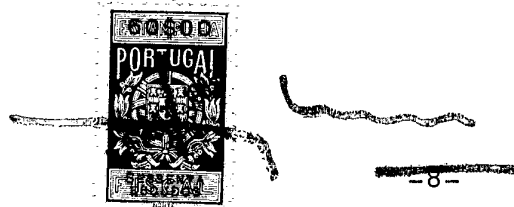
glutamina sintetase (GS) funcional na referida célula vegetal, operacionalmente ligada a

b) uma segunda sequência genética capaz de aumentar os níveis de expressão da referida primeira sequência genética de tal modo que quando a referida combinação está presente numa planta que de outro modo seria sensível ao inibidor de GS herbicida, a referida célula é substancialmente resistente ao inibidor de GS herbicida.

O invento também inclui uma combinação de genes como a descrita, presente no genoma ou num elemento replicável extracromossómico de uma espécie vegetal, espécie essa que é heteróloga para as referidas primeira ou segunda sequências genéticas ou para ambas.

Numa outra execução o invento baseia-se na produção de uma célula vegetal resistente ao inibidor de GS herbicida a qual possui níveis significativamente aumentados da actividade de GS devido ao facto de ter um número de cópias significativamente maior do que o gene GS selvagem do que a correspondente célula vegetal sensível ao inibidor de GS herbicida. Nesta execução pode-se obter uma planta por indução da amplificação do gene GS através de pressão selectiva em cultura celular para obtenção de uma estirpe ou variante resistente, seguido de crescimento e desenvolvimento daquela para um callus e, planta adulta seguido da sua reprodução sexuada. Como alternativa, pode-se obter uma planta por indução da amplificação do gene de GS através da selecção em cultura de célula de uma variante ou estirpe dadora resistente, seguido de fusão de protoplastos das células dadoras como uma célula aceitadora apropriada para dar um híbrido morfogenético capaz de crescimento e desenvolvimento ulteriores.

Como outra alternativa uma célula vegetal resistente que possua um número de cópias signifi-



cantamente maior do gene selvagem do que a correspondentes célula sensível pode ser obtido pela introdução de múltiplas cópias expressivas do gene GS selvagem num elemento extracromossómico adequado capaz de se replicar, ou no genoma da própria célula vegetal. Isto pode ser conseguido por transformação na fase de cultura celular ou na fase da planta global. Os organelos de várias cópias estáveis tendo o gene GS selvagem, podem também ser usados para introduzir números significativamente grandes do gene GS numa célula.

O invento compreende ainda células vegetais transformadas per se resistentes ao inibidor de GS herbicida, as quais no seu estado não transformado seriam sensíveis ao inibidor de GS herbicida. Estão também incluídas plantas totais que sejam resistentes ao inibidor GS herbicida.

O invento também engloba veículos intermediários capazes de servirem como vectores de transformação de células vegetais possuindo informação genética como a descrita, capazes de conferir resistência ao inibidor de GS herbicida e métodos de conferir resistência a células vegetais.

O invento compreende ainda um método de controle de plantas caracterizado por se pôr em contacto plantas sensíveis ao inibidor de GS herbicida com quantidades controladoras de plantas de um inibidor de GS herbicida, na presença de, e simultaneamente contacto de plantas tornadas resistentes ao referido inibidor pelos métodos descritos.



BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O invento será melhor compreendido pela referência as Figuras juntas em que

A Figura 1 mostra o ciclo da glutamina sintetase/ glutamato sintetase em que se mostra que GS catalisa a formação de glutamina a partir de ácido glutâmico e amónia ou numa reacção em que se dá a hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico. O azoto amido da glutamina constitui a fonte de azoto para muitas reacções de biossíntese indicando um papel central para o GS no metabolismo do azoto. O inibidor de GS herbicida, ao inibir GS, evita a biossíntese da glutamina evitando deste modo a desintoxicação em relação a amónia.

A Figura 2 mostra as características de crescimento da linha celular de alfafa tipo selvagem (sensível ao PPT) na ausência (o) e na presença de 25(Δ), 50 ($\bullet$) e 100 ($\square$) μ m de L-PPT.

A Figura 3 mostra as características de crescimento de uma linha celular de alfafa variante resistente ao PPT na ausência (o) e na presença de 100 (Δ), 200 ($\bullet$) e 500 ($\square$) μ m de L-PPT.



MELHOR MANEIRA DE REALIZAR O INVENTO

Na descrição que se segue são extensivamente usados uma serie de termos empregues em tecnologia de DNA recombinante e de genetica de plantas. Com o fim de fornecer um entendimento claro e consistente da especificação e reivindicações, incluindo o âmbito em que são usados tais termos, são dadas as definições que se seguem:

Nucleotídeo . Uma unidade monomérica de DNA ou de RNA consistindo num açúcar, um fosfato e uma base heterocíclica azotada. A base está ligada a porção açúcar através de um carbono glicosídico (carbono 1' da pentose). A combinação de uma base e de um açúcar é designado por nucleosídeo. Cada nucleotídeo é caracterizado pela sua base. As quatro bases do DNA são a adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). As quatro BASES DO RNA são A, G, C e uracilo (U).

Sequência genética . Um arranjo linear de nucleotídeos ligados uns aos outros por ligações fosfodiéster entre os carbonos 3' e 5' de pentoses adjacentes.

Sequência genética funcional . Uma sequência genética codificadora de um polipeptídeo tendo a actividade pretendida, independentemente da sequência ser menor ou maior do que a sequência de tamanho completo de polipeptídeo. É também definido como "gene funcional".

Codão ou triplete . Uma sequência de DNA com três nucleotídeos que codifica através do mRNA um aminoácido, um sinal de iniciação de tradução ou um sinal de terminação da tradução. Por exemplo, os codões TTA, TTG, CTT, CTC, CTA e



-11-

CTG codificam o aminoácido leucina. TAG, TAA e TGA são sinais de paragem da tradução e ATG é um sinal de iniciação da tradução.

Fase de Leitura. O agrupamento de codões durante a tradução do mRNA na sequência de aminoácidos. Durante a tradução deve-se manter a fase de leitura correcta. Por exemplo, a sequência GCTGGTTGTAAG pode ser tratada e traduzida em três fases de leitura ou frases dependendo se começa com G, com C ou com T podendo assim dar três produtos peptídicos diferentes.

Duas sequências estão em ligação operacional quando a fase de leitura de uma sequência está ligada a outra de modo a ambas operarem em combinação como se estivessem presentes independentemente.

Transcrição O processo de produção de mRNA a partir de um gene funcional.

Tradução. O processo de produção de um polipeptídeo a partir de mRNA.

Expressão. O processo, iniciado com um gene funcional, para produzir o seu polipeptídeo, sendo uma combinação de transcrição e tradução.

Veículo de clonagem. Um plasmídeo, DNA fágico ou outras sequências de DNA que sejam capazes de se replicarem numa célula hospedeira, que se caracteriza por possuir um ou um pequeno número de locais de reconhecimento por endonucleases nos quais essas sequências de DNA podem ser cortadas de modo determinado sem perda de uma função biológica esencial do DNA e que possui uma marca adequada ao uso na



identificação de células transformadas. Um exemplo típico é uma marca de resistência a um antibiótico. A palavra "vector" é por vezes usada para um veículo de clonagem.

Veículo de expressão . Um veículo, analogo a um veículo de clonagem, que é particularmente útil para produção em células hospedeiras de um polipeptídeo, por expressão do gene funcional codificador do referido polipeptídeo, presente no veículo.

Veículo de replicação . Um veículo de clonagem ou de expressão.

Fago ou bacteriófago. Um vírus bacteriano que pode consistir em sequência de DNA encapsidadas num invólucro ou revestimento proteico.

Plasmídeo . Uma sequência de DNA de cadeia dupla são cromossómico compreendendo um "replicação" intacto, de tal modo que o plasmídeo é replicado ou incorporado no genoma de uma célula hospedeira. Quando o plasmídeo é colocado num organismo celular-uni ou multicelular, as características desse organismo podem ser alteradas ou transformadas como resultado do DNA do plasmídeo. Por exemplo um plasmídeo tendo o gene da resistência a canamicina transforma uma célula previamente sensível a canamicina numa que é resistente a esta droga.

Clonagem. O processo de obtenção de uma população de organismos ou sequências de DNA derivados de um desses organismos ou sequências por reprodução assexuada.



Sequência de controle da expressão. Uma sequência genética que controla e regula a expressão de sequências genéticas funcionais, quando operacionalmente ligada aquelas sequências. Nelas estão incluídas sequências que se sabe controlarem as regiões que regulam a expressão. Incluem sequências promotoras e de terminação.

Promotor Vegetal. Uma sequência de controle de expressão que é capaz de causar a expressão na referida planta de quaisquer sequências genéticas homólogos ou heterólogos operacionalmente ligadas ao referido promotor.

Promotor vegetal de superprodução (OPP). Um promotor vegetal capaz de provocar a expressão, numa célula vegetal transformada, de qualquer sequência ou sequências genéticas funcionais operacionalmente ligadas em níveis (medidos pelos quantidades de mRNA ou de polipeptídeo) substancialmente superiores aos níveis naturalmente observados em células hospedeiras não transformadas com o referido OPP.

Degeneração. Uma característica informativa de acordo com a qual um aminoácido na natureza pode ser codificado, por mais de um codão. Por exemplo, leucina pode ser codificada por TTG, TTA, CTA, CTT, CTC ou CTG.

Por variações degenerativas, conforme usado no presente pedido e reivindicação, pretende-se significar qualquer variação dos fragmentos polinucleotídios do invento devido a degeneração do código genético. Por exemplo, desde que o material resultante ainda codifique GS funcional, ou suas partes, tal material deve ser incluído no presente invento.



Glutamina Sintetase (GS): A definição desta enzima é funcional e inclui qualquer glutamina sintetase capaz de funcionar numa dada planta pretendida para transformar ácido glutâmico em glutamina no ciclo da GS. O termo inclui portanto não apenas a enzima da espécie de planta específica envolvida na transformação genética mas pode incluir GS de outras espécies vegetais ou microorganismos ou mesmo dos outros eucariotas, se essas GS fôr capaz do funcionar nas células vegetais transformadas. Os termos incluem proteínas ou polipeptídeos tendo mais ou menos o comprimento estrutural total da GS vegetal natural, tais como fragmentos parciais funcionais da GS ou os seus análogos.

Glutamina Sintetase (GS) . A definição desta enzima é funcional e inclui qualquer glutamina sintetase, capaz de funcionar numa dada planta pretendida para transformar ácido glutâmico em glutamina no ciclo da GS. O termo inclui portanto não apenas a enzima da espécie de plantas específica envolvida na transformação genética mas pode incluir GS de outras espécies vegetais ou microorganismos ou mesmo de outros eucariotas, se essa GS fôr capaz de funcionar nas células vegetais transformadas. Os termos incluem proteínas ou polipeptídeos tendo mais ou menos o comprimento estrutural total da GS vegetal natural, tais como fragmentos parciais funcionais da GS ou os seus análogos.

Fosfinotricina (PPT). O composto com a fórmula (1) supra, na sua forma biologicamente activa. Podem ser as formas L, D, ou L,D e podem ser isolados ou em combinação com outros compostos inertes ou activos que não interfiram com a actividade de PPT.

O invento compreende no seu nível mais fundamental numa célula vegetal que é resistente a um inibidor da glutamina sintetase herbicida em que a resis-



tência é provocada por níveis de actividade de GS que, quando presentes uma célula de outro modo sensível ao inibidor de GS herbicida, torna a célula substancialmente resistente ao inibidor de GS herbicida.

Os termos "inibidor da glutamina sintetase herbicida" pretendem incluir qualquer inibidor, competitivo ou não competitivo, que diminua significativamente a actividade de glutamina sintetase de uma célula vegetal de uma determinada especie, e como consequência disso, para provocar efeitos herbicidas na célula vegetal. A célula vegetal ou planta total resistente ao herbicida sobrevive sem danificação irreversível a uma concentração de inibidor de GS herbicida que é letal para individuos selvagens da mesma especie. Normalmente, um aumento de cinco vezes ou superior na resistencia ao inibidor de GS herbicida é considerado significativo. No entanto, este numero varia de especie vegetal e de herbicida para herbicida. Não é portanto correcto fornecer um nível unico para todas as diferentes especies vegetais e herbicidas englobados no presente invento. Tal nível, pode no entanto ser facilmente acertado pelos entendidos na matéria.

Entre os inibidores de GS herbicidas descobertos pelo invento encontram-se a fosfinotricina a metionina, sulfoximina, assim como outros análogos do ácido glutâmico.

A glutamina sintetase pode ou não ser da célula vegetal especifica a ser transformada. Tudo o que é necessário é que a sequência genética da enzima a ser expressa e produzida, seja um enzima funcional na célula vegetal final. Assim, o invento compreende células vegetais possuindo tanto genes GS homólogos como genes GS heterólogos (e os seus respectivos produtos de expressão). De um modo geral , a enzima poderá também ser de outra especie



vegetal, ou mesmo enzimas de organismos diferentes, como sejam microorganismos ou animais. São preferidos os genes de glutamina sintetase vegetal e os seus produtos de expressão. São de particular interesses os genes da glutamina sintetase da espécie vegetal particular que serve como hospedeiro na manipulação genética, i.e., genes GS homólogos. Um desses grupos genes de glutamina sintetase utilizável nas moléculas de rDNA do invento está ilustrado no Exemplo 2.

Qualquer célula vegetal sensível aos inibidores de GS herbicidas, que seja capaz de sofrer manipulação genética pelas construções genéticas ou métodos do invento e capaz de expressar as referidas construções, pode ser usada no presente invento. Entre as plantas dicotiledóneas estão incluídas varias espécies de batata (Solanum tuberosum); tomate (Lycopersicon esculentum); pimenta (Capsicum cennumm); tabaco (Nicotiana tabacum); varias espécies de Barssica, especialmente colza (Brassica napus) varios legumes, por exemplo alfafa (Medicago sativa), trevo (TRifolium spp) soja (Glycine max), amendoim (Arachis hypogae), várias espécies de feijão (Phaseolus spp. Vicia sp., Vigna sp.), ervilhas (Pisum sativum) culturas de raízes como seja a beterraba (Beta vulgaris), cenouras (Dancus carota) e batata doce (Ipomoea batatus).

Existe uma variedade de realização incluídas no conceito largo do invento. A célula vegetal resistente ao inibidor de GS herbicida pode possuir níveis significativamente superiores de actividade de GS através de qualquer um de uma variedade de mecanismo e/ou construções genéticas.

Por exemplo o invento compreende numa das suas execuções, uma combinação de duas sequências genéticas: (a) uma primeira sequência genética codificando



uma glutamina sintetase funcional numa dada célula vegetal operacionalmente ligada a jusante de (b) uma segunda sequência genética capaz de aumentar os níveis do produto genético da referida primeira sequência de modo que quando a combinação está presente numa célula vegetal de outro modo sensível ao inibidor de GS, a referida célula é substancialmente resistente ao referido inibidor de GS herbicida.

A segunda sequência genética pode ser um promotor ou uma sequência amplificadora. Se fôr um promotor pode ser um promotor de GS ou um promotor de outro gene estrutural. Nestes dois ultimos casos o promotor util na combinação é um promotor vegetal de super-produção. A única característica essencial deste promotor é que, quando numa ligação operacional com a sequência genética da glutamina sintetase, seja capaz de promover a expressão da referida glutamina sintetase em níveis tais que quando o combinação está pressente numa célula vegetal de outro modo sensível ao inibidor de GS herbicida, a célula torna-se substancialmente resistente ao referido inibidor de GS.

Assim, a escolha do promotor vegetal a usar é regulada por considerações funcionais. O promotor vegetal será heterólogo ou homólogo da célula hospedeira.

O promotor endógeno nativo da referida célula hospedeira será incapaz de causar resistencia através de superprodução de GS, uma vez que o promotor nativo normalmente promove a expressão de GS a niveis tão baixos que são substancialmente ou completamente inibidos pelas concentrações de herbicida de controle vegetal normalmente usadas. Assim, numa execução do presente invento, o promotor nativo é substituído por um OPP.



Entre os PPs úteis encontram-se o promotor da subunidade pequena (ss) da ribulose bi-fosfato carboxilase e da proteína de ligação a clorofila a/b. A expressão destes dois genes verificou-se ser induzido pela luz a nível transcrição no tecido verde (ver, por exemplo, Genetic Engineering of Plants, An Agricultural Perspective A. Cashmore, Plénum, New York 1983, paginas 29-38, Coruzi G. et al The Journal of Biological Chemistry 258:1399 (1983) ou Dunsmuir P. et al. , Journal of Molecular and Applied Genetics 2:285(1983).

O invento estende-se a qualquer célula vegetal modificada de acordo com os métodos descritos ou modificada por quaisquer outros métodos que confirmam resistência ao inibidor de GS herbicida. A célula vegetal pode estar viva ou não por si só em cultura de tecidos ou como parte de uma planta multicelular ou parte dela. Tal planta, multicelular que no seu estado não transformado é sensível ao inibidor de GS herbicida, será resistente quando as suas células forem resistentes de acordo com o invento.

Partes obtidas de plantas, como sejam as flores, sementes, folhas, ramos, frutos e similares também estão cobertas pelo invento, desde que estas partes possuam células resistentes ao inibidor de Gs herbicida como foi dito. Em particular, as partes de plantas podem estar vivas ou não. Assim, um tomate, cenoura ou folha de tabaco modificados geneticamente obtidos de um tomate, cenoura ou planta do tabaco estão englobados no invento mesmo se separados da planta de origem.



Processo de Produção e Intermediários nele usados.

Várias metodologias são aplicáveis para efectuar as diferentes execuções do invento. Por exemplo, se a resistencia ao inibidor de GS herbicida fôr conseguida através do aumento significativo do número de cópias de um gene estrutural (em oposição a super-produção, atrás mencionada, do gene selvagem), as metodologias disponiveis incluem selecção de uma célula que seja resistente devido a amplificação do gene GS ou, como alternativa, introdução de multiplas cópias do gene GS no genoma ou um elemento de replicação extracromossómica.

A selecção é efectuada num meio de cultura apropriado através do cultivo de células vegetais na presença de aumentos graduais do inibidor de Gs herbicida no meio. Após um determinado periodo de tempo decorrido, como seja, por exemplo, entre algumas semanas a vários meses, é possível seleccionar uma população de células que seja várias vezes mais resistente ao inibidor de GS herbicida dos que as células vegetais originais. Por exemplo, quando as células são de alfafa eo inibidor é PPT, é possível obter uma linha celular de alfafa resistente ao PPT após um ano de aumentos graduais de PPT, linha de essa vinte vezes mais resistente ao PPT do que a linha original. Quando a linha resistente foi subcultivada durante varios meses na ausencia do inibidor, observou-se um lento decréscimo na percentagem de células resistentes em experiências de sementeira sobre meio de agar contendo inibidor, mas após mais de seis meses foi possível seleccionar clones de células altamente resistentes. Isto nunca foi possível através da sementeira de células do tipo selvagem.

A regeneração de calli e plantas crescidas a partir de células em cultura de tecidos é conhecida nos entendidos na materia e varia de especie para espe-



cie .

Ver, por exemplo Sheperd, Scientific American, 1982, aqui incluído como referência. De um modo geral é dado, primeiro uma suspensão de protoplastos contendo múltiplas cópias do gene GS ou possuindo a combinação de sequências genéticas.

A formação de embriões pode então ser induzida a partir de suspensões de protoplastos até ao estado de maturação e germinação como embriões naturais. Os meios de cultivar conterão de um modo geral vários aminoácidos e hormonas tais como auxina e citocininas. É vantajoso adicionar ácido glutâmico e prolina ao meio, especialmente para espécies tais como milho e alfafa.

Os rebentos de raízes desenvolvem-se normalmente em simultâneo. A regeneração eficaz dependerá do meio, do genótipo e da história de cultura. Se estas três variáveis forem controladas então a regeneração será totalmente reprodutível e repetível.

Para os genótipos de algumas espécies, tais como tabaco, alfafa, batata, tomate, petúlias, soja, colza e algumas árvores de fruto e cenouras, a regeneração foi claramente demonstrada em trabalhos anteriores. Tal regeneração está dentro do âmbito da matéria se o genótipo e história adequados forem escolhidos por rastreio. Geralmente, após cerca de mais de um ano de subcultura e eficácia da regeneração de plantas decresce a partir de uma dada cultura de células. Portanto, a regeneração tem normalmente mais sucesso se for iniciada após a obtenção de uma cultura de células resistentes adequada.

Como alternativa, e especialmente útil em culturas celulares que tenham mais de alguns meses



ou um ano, o gene GS amplificado pode ser levado para um sistema regenerador por cruzamento e/ou fusão. Ver, por exemplo, Coking et al., Nature, 293:268 (1981) aqui incluído como referência. Neste método, uma linha celular resistente ao inibidor de GS herbicida é conseguida por selecção e uma cultura em suspensão de células em divisão rápida é obtida por métodos bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. Os protoplastos são isolados a partir delas e de preferência irradiados com uma quantidade de radiação e durante um tempo suficientes para inactivar, se não mesmo causar alterações irreversíveis, as células hospedeiras. Por exemplo, radiação de raios X de 20 Krads pode ser usada vantajosamente. Após irradiação dos protoplastos dadores, os mesmos são usados com protoplastos aceitadores de células susceptíveis adequadas. Existem vários métodos para se obter fusões, tais como, por exemplo, fusão com poli etilenoglicol, tratamento com concentração alta de cálcio, combinações de ambos, do mesmo recentemente electrofusão. Após ter-se dado a fusão, o crescimento selectivo do produto de fusão pode ser efectuado uma vez que o produto de fusão deverá ser feito e resistente ao inibidor de GS herbicida. Em particular se se usar um dador que já não seja morfogenético (i.e., a história da cultura dadora, é tal que já tenha passado vários meses ou até um ano desde a selecção original), pode-se então efectuar uma selecção simples em meio contendo inibidor de GS herbicida.

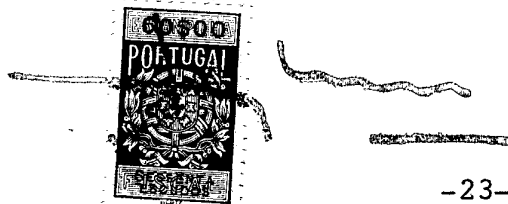
Um outro método para introduzir material genético em células vegetais e infectar uma folha de planta com uma incisão com a bactéria, A. tumefaciens transformada. Em condições de crescimento adequado forma-se um anel de calli a volta da incisão. Os calli são então transferidos para meio de crescimento, deixa-se que formem rebentos, raízes e finalmente plantas. Como alternativa também se pode efectuar enxertos em plantas completas.



Um método alternativo para introduzir múltiplas cópias do gene GS na célula vegetal é por auto-ligação de uma cópia de um gene estrutural GS funcional (DNA genómico ou cDNA) utilizando métodos bem conhecidos dos familiarizados com a tecnologia de DNA recombinante. Os genes estruturais, cada um contendo o seu promotor individual são ligados operacionalmente uns aos outros por meio de adaptadores apropriados podendo-se introduzir em certos casos 10-30 cópias de cada gene num veículo de expressão replicável adequado, como seja um plasmídeo Ti. Como alternativa o material genético pode ser microinjectado directamente em células do embrião vegetal. No caso de plantas monocotiledóneas, o pólen pode ser transformado com DNA total ou com um clone funcional adequado que dê resistência e o pólen utilizado então para produzir progénie por reprodução sexuada.

Claro que podem ser utilizados quaisquer outros métodos para aumentar a actividade GS numa dada célula para níveis tais que tornem a célula resistente ao inibidor de GS herbicida. É de interesse particular neste invento a ligação operacional de uma sequência genética codificadora de um gene GS estrutural a uma outra sequência genética capaz de produzir super-produção do produto genético de onde deriva. Esta ligação de sequências genéticas pode ser introduzida nas células vegetais adequadas, por exemplo, por meio do plasmídeo Ti.

A introdução do material genético nas células vegetais, especialmente usando o chamado plasmídeo indutor de tumores (Ti) de Agrobacterium tumefaciens é uma tecnologia reprodutível e previsível (ver, por exemplo, Caplan, A. et al "Introduction of Genetic Material into Plant Cells" Science .815-821 (November 1983);



Schell, J. and Van Montagu, M., "The Ti Plasmid as Natural and as Practical Gene Vector for Plants", Bio/Technology; Abril 1983, pps. 175-180; Horsch et al., "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants"; Science:233, 496-498 (1984); Fraley R.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4803 (1983) Watson, et al. Recombinant DNA: A Short Course, Scientific American Books, 1982, pp 164-173; e Old e Primrose, Principles of Gene Manipulation, 2ª. edição V. Cal. Press. 1981, pp. 138-156 aqui incluídos como referência).

Os plasmídeos Ti possuem duas regiões essenciais para a produção de células transformadas. Um destes designado DNA de transferência (TDNA) induz a formação de tumores. A outra designada região virulenta é essencial para a formação mas não manutenção de tumores. O DNA de transferência que transfere para o genoma vegetal pode ser aumentado em tamanho pela inserção dos múltiplos genes GS ligados uns aos outros ou da combinação de genes do invento sem que a sua capacidade de transferência seja afectada. Através da remoção dos genes que provocam tumores de modo o que não mais interfiram o plasmídeo Ti modificado pode então ser usado como vector para a transferência das construções de genes do invento para uma célula vegetal adequada. O DNA estranho a ser inserido é normalmente introduzido entre as sequências terminais que ladeiam a região T.

Um vector plasmídeo Ti particularmente útil é o pGV3850, um derivado não oncogénico do plasmídeo Ti nopalina C58. (Ver Caplan et al. supra). Este vector utiliza as propriedades de transferência naturais do plasmídeo Ti. Os genes de T-DNA internos que determinam o fenotipo de galha em coroa indiferenciado foram eliminado e substituídos por qualquer veículo de clonagem vulgarmente usado (como seja o pBR322). A sequência do veículo de clona



gem contida entre as regiões delimitantes do T-DNA serve como região de homologia para a recombinação introduzir de novo o DNA estranho clonado num derivado do mesmo veículo de clonagem. Qualquer construção genética do invento clonado nesse plasmideo pode assim ser inserida no pGV3850 através de uma simples recombinação das sequências homólogas. Pode-se adicionar ao plasmideo marcas de resistência a antibióticos para seleccionar os recombinantes. A resistência ao herbicida pode certamente ser também usada concomitante ou independentemente. A presença do gene do nopalina sintetase (nos) neste vector torna fácil controlar a eficácia de transformação usando pGV3850. Um callus em cultura de tecidos pode então ser testado quanto a presença de nopalina.

Após transformação da célula vegetal ou planta, a mesma pode ser seleccionada com a ajuda de uma marca adequada, como seja a resistencia a antibioticos, ou mais relevante, resistencia a herbicidas, e depois crescimento pelas vias convencionais. Em tabaco, culturas de protoplastos com três a cinco dias após isolamento dos protoplastos são adequados a transformação por Agrobacterium tendo o plasmideo Ti adequado o qual que contem na sua região de T-DNA o gene GS híbrido descrito. Após dois dias de co-cultura das células derivadas de protoplastos e com Agrobacteria, as células vegetais podem ser lavadas por centrifugação e ressuspensas em meio novo várias vezes. Isto remove a maior parte das bactérias. As restantes bactérias são mortas por um antibiotico adequado, por exemplo cefotaxima (400-1000 ug/ml), adicionado ao meio de cultura de protoplastos. As células são cultivadas em meio não selectivo até formarem agregados de células visíveis (calli). Em seguida são nomeadas em meio contendo a concentração de herbicida adequada que mata todas as células do tipo selvagem. Apenas os transformantes que expressem o gene híbrido GS incorporado sobrevivem e continuam a crescer.



Estes celli podem ser facilmente induzidos para regenerarem rebentos quando transferidos para meio de Murashige e Shoog contendo 1mg/l de 6-benziladamina e 0,1 mg/l de naftaleno ácido acético. Os rebentos podem desenvolver raízes em meio MS sem hormonas ou directamente em perlite ou vermiculite e transferidos para vasos. As plântulas estão prontas para crescerem na estufa e podem ser testadas quanto a resistencia ao herbicida.

Também podem ser usados outros sistemas tais como o virus do mosaico da couve-flore, CaMV (Hohn, B. et al., em "Molecular Biology of Plant Tumors", Academic Press, New York 1982, pps. 549-560; e Howell, Patente dos Estados Unidos 4.407.956). A totalidade do genoma de DNA viral do CAMV é inserida num plasmideo bacteriano parental criando uma molécula de DNA recombinante que pode ser propagada em bactérias. Após clonagem, o plasmideo recombinante é cortado com enzimas de restrição tanto ao acaso como em locais unicos da parte viral do plasmideo recombinante para inserção da combinação de genes do invento.

Também se pode inserir um pequeno oligonucleotideo, descrito como adaptador, tendo um local de restrição unico. O plasmideo recombinante modificado pode ser clonado de novo e ainda modificado pela introdução de pedaços maiores de uma construção de genes no local de restrição unico do adaptador.

A parte viral modificada do plasmideo recombinante é então excisada do plasmideo bacteriano parental, e usada para inocular as células vegetais ou plantas.



Este virus está descrito na patente Howell acima referida como sendo particularmente bom para a inserção de genes capazes de aumentar a produção de proteína, maior tolerância a tensão, resistência a pragas e pesticidas, fixação de azoto, e similares.

Normalmente, as sequências GS pretendidas são operacionalmente ligadas in vitro umas as outras ou a um promotor de super-produção, por metodologia recombinante conhecida. Por exemplo, o gene estrutural de GS, normalmente a sua versão genómica, é separado do seu promotor normal por restrição na região entre tal promotor e o codão de iniciação AUG. Uma função de transcrição com, e.g., a subunidade pequena da ribulose bifosfato carboxilase é então efectuada. Em seguida a construção é inserida num local de restrição adequado do veículo vegetal.

Por exemplo, quando se usa DNA de CaMV como veículo, a construção genética é inserida num local ou locais do DNA viral, sem destruir a infecciosidade do DNA viral ou o seu movimento através de planta. Assim, a construção pode ser inserida numa série de locais de restrição seguido de clonagem do produto e determinação da manutenção das características essenciais do virus. Deste modo pode-se rapidamente isolar uma quantidade relativamente grande de virus modificado que pode ser testado quanto a infecciosidade e movimento. Após ter sido modificada a parte viral do plasmídeo de DNA híbrido o virus modificado pode ser excisado do plasmídeo de DNA híbrido e pode ser usado para inocular plantas directamente na forma linear ou ligado em circular.

Várias técnicas podem ser empregues para infecção de células vegetais com veículos de CaMV. As folhas novas podem ser suavemente esfregadas com um abradi-



-27-

vo e depois postas em contacto com o DNA viral. Após infecção o DNA viral pode ser transmitido por afídeos, quando o gene transmissível pelo afídeo seja operacional. Também podem ser usadas técnicas mecânicas. Como alternativa os tecidos ou células individuais podem ser infectadas.

Utilizações

A utilização de veículos contendo as construções de genes do invento é como intermediários na preparação de células vegetais e plantas resistentes a herbicidas. Assim não só as células vegetais tornadas resistentes de acordo com os métodos, do invento mas também todos os veículos ou vectores, derivam a sua utilidade da utilidade do produto final, a planta na sua totalidade.

A utilização de uma planta completa tornada resistente de acordo com os métodos do invento é óbvio. Tal planta, quando posta em contacto com quantidades de herbicida de outro modo controladoras ou supressoras de plantas, serão resistentes. Isto permitirá que o tratamento com herbicida seja selectivo para qualquer planta ou grupos de plantas pretendidos.

Em adição, a resistência ao herbicida permitirá a sua utilização como marca selectiva na transferência de outros genes para a planta ou suas células

Com os termos "quantidades de inibidor de GS herbicidas controladoras de plantas" pretende-se incluir funcionalmente uma quantidade de herbicida capaz de afectar o crescimento ou desenvolvimento de uma dada planta. Assim, a quantidade pode ser suficientemente pequena para apenas retardar ou suprimir o crescimento ou desenvolvimento ou a quantidade pode ser suficientemente grande para destru



ir irreversivelmente a planta sensível. Normalmente, a maior parte das plantas dicotiledóneas e sementes pode ser controlada com taxas entre 0,5 e 1,5 kg/ha ia. Para as plantas monocotiledóneas, as taxas entre 0,5 kg/ha ia e até cerca de 2,0 kg/ha ia são as normalmente usadas. O herbicida pode certamente ser posto em contacto com a planta adequada usando métodos de pulverização ou de disseminação bem conhecidos. Por exemplo, a administração foliar usada em trabalhos anteriores para controle de ervas daninhas por PPT pode ser usada com plantas resistentes ao PPT que estejam dentro do âmbito do invento.

O invento também engloba um método para controle de plantas que se caracteriza por se pôr em contacto uma célula vegetal ou planta sensível ao inibidor de GS herbicidas controladoras de plantas em que o contacto é efectuado enquanto a célula vegetal ou planta está presente conjuntamente com células vegetais ou plantas resistentes ao inibidor de GS herbicida do invento. Assim, o tratamento de plantas com herbicida foliar num campo ou cultivar, plantas essas que incluem tanto células vegetais sensíveis ao herbicida como células resistentes ao herbicida e em que ambas são simultaneamente postas em contacto com o inibidor de GS herbicida durante a operação de tratamento, constitui um método incluído no presente invento.

Tendo agora descrito de um modo geral este invento, o mesmo será melhor entendido por referencia a certos exemplos específicos que aqui são incluídos com fins ilustrativos apenas não pretendendo ser limitantes a menos que de outro modo seja especificado.



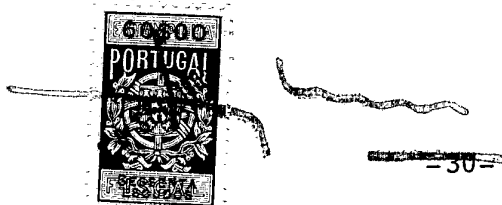
Exemplo 1

Isolamento e Caracterização de Cultura de Células de Alfafa Resistentes ao PPT

Foi seleccionada uma linha celular de alfafa capaz de crescer na presença de L-fosfinotricina 3mM no meio de cultura. Escolheu-se a alfafa uma vez que é uma das plantas modelo em que a regeneração da planta completa a partir de célula isoladas ou protoplastos pode ser facilmente conseguida.

A selecção da linha de alfafa resistente à fosfinotricina foi feita por aumento gradual de concentração de inibidor no meio de cultura líquida. Dentro de 6 meses uma população de células foi seleccionada sendo 20 vezes mais resistente à fosfinotricina que a linha celular original. Medindo o volume de células sedimentadas das culturas em suspensão verificou-se que as células do tipo selvagem eram completamente inibidas por L-fosfinotricina $2,5 \times 10^{-5}M$. As células resistentes cresciam tão bem na presença de $5 \times 10^{-4}M$ do composto como na sua ausência (Figuras 2 e 3).

Quando os padrões proteicos dos extractos celulares brutos de linhas celulares susceptíveis e resistentes foram comparados por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida, pode-se observar a superprodução de um polipeptídeo na gama de pesos moleculares 40-42 KD na linha celular resistente ao PPT. GS purificada de alfafa possui o mesmo peso molecular. A actividade enzimática dos extractos celulares foi determinada em paralelo. A actividade específica de GS nas células resistentes era 5-10 vezes superior a das células do tipo selvagem. A actividade específica de GS nas linhas celulares resistentes ao PPT é da mesma ordem da grandeza do tecido dos nódulos da raiz de alfafa, o qual, como todos os tecidos de nódulos



de legumes que fazem uma fixação eficaz de azoto, tem uma actividade de GS elevada. As medições da actividade de GS na presença de varias quantidades de fosfinotricina revelaram o mesmo grau de inibição da enzima pelo PPT em ambos os tipos celulares, sugeridos não haver ocorrido alteração estrutural da proteína GS durante a selecção da variante resistente.

Isolou-se RNA mensageiro do tipo selvagem e de células resistentes usando um método de extracção de RNA com isotiocianato de guanidínio, seguida de separação do mRNA em coluna de oligo dT-celulose. Puderam-se isolar 4 microgramas de RNA por grama, de material celular. A tradução in vitro do mRNA isolado de ambas as linhas celulares deu padrões de polipeptídeos semelhantes ao padrão obtido in vivo em extractos marcados com ³⁵S-metionina. Isto indicou que o mRNA isolado estaria pouco degradado. Enquanto que as proteínas marcadas in vivo apresentavam uma diferença marcante na quantidade do polipeptídeo 40-42KD, a diferença entre o tipo selvagem e a linha celular variante nos padrões de proteína traduzida in vitro não era pronunciada.

Sintetizou-se a primeira e a segunda cadeia do cDNA a partir da população de mRNA da variante resistente ao PPT. Após clivagem com S1 e colocação de caudas poli C no cDNA, o DNA foi ligado a DNA vector pBR322 com caudas poliG. A estirpe MG1061 de E.coli foi transformada com o vector recircularizado.

Obtiveram-se $3,5 \times 10^4$ colónias por mg de DNA vector ligado. 80% das colónias eram sensíveis a ampicilina (amp) e 50% dos clones sensíveis a ampicilina tinham inserções que podiam ser detectadas por digestão dos plasmídeos com Pst. 10% das inserções tinham mais de 1000 pares de bases.



Cultivaram-se 1800 colonias em filtros de nitrocelulose e os filtros foram sondados com uma sonda consistindo na primeira cadeia de cDNA marcada com ^{32}P tendo uma percentagem aumentada de sequencias especificas de GS.

Entre tais clones esperou-se encontrar um clone de cDNA especifico para GS. Um clone de cDNA de GS de uma biblioteca de cDNA de Phaseolus preparada a partir de mRNA de nodulos de raiz foi obtido de uma fonte diferente. Este clone de cDNA de GS permitiu a identificação de um clone de cDNA de alfafa na biblioteca de cDNA que hibridou fortemente com o DNA de GS de Phaseolus.

O DNA inserido do clone de cDNA GS de alfafa foi sequenciado. Os cDNAs de GS de alfafa e de Phaseolus foram então usados como sondas para caracterizar a diferença entre as células selvagem de alfafa e as celulas variantes superprodutoras de GS.

Preparou-se DNA genómico total a partir de folhas de alfafa, a partir de linha celular selvagem e a partir de três sublinhas de uma linha de células resistentes que foram seleccionadas na presença de L-fosfinotricina $6 \times 10^4 \text{ M}$, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ e $3 \times 10^{-2} \text{ M}$. O DNA foi digerido com BamHI, EcoRI, e HindIII e uma combinação de duas enzimas. Após electroforese em gel de agarose dos DNAs digeridos, os fragmentos de DNA foram transferidos para filtros de nitrocelulose por transferencia Southern. O DNA ligado aos filtros foi hibridado com inserções de cDNA dos clones de GS de alfafa e de Phaseolus marcados com ^{32}P . DNA do mesmo tamanho hibridos com ambas as sondas. Uma banda predominante hibrida com a mesma intensidade em todas as 5 amostras de DNA com a sonda de alfafa. Uma segunda banda, que mal se vê no DNA tipo selvagem digerido, hibrida fortemente com DNA das linhas celulares resistentes



O maior grau de hibridação foi observado com DNA das linhas celulares altamente resistentes, indicando a amplificação de um fragmento de DNA durante o desenvolvimento da resistencia. A sonda de cDNA de alfafa hibridou fortemente com o fragmento de DNA amplificado e, em menor grau com o DNA não amplificado com homologia de GS.

Para confirmar a razão pela qual a linha celular variante de alfafa se tornou resistente ao PPT, repetiram-se ambas as transferências Northern e Southern usando linhas celulares tipo selvagem e variantes. A transferencia Northern indicou que há um aumento de cerca de 8 vezes no mRNA da glutamina sintetase do tipo selvagem. Quando se fizeram as transferências Southern usando DNA genómico de ambas as linhas celulares, houve uma indicação clara de duplicação do gene da glutamina sintetase na linha celular mutante de alfafa. A duplicação parece ser 5 a 15 vezes acima do gene da glutamina sintetase não duplicado conforme estimado por hibridação. Parece igualmente ser uma duplicação exacta, ou seja, apenas uma banda aumentar na hibridação entre 7 e 11 vezes.



Exemplo 2

Isolamento e Caracterização da Glutamina Sintetase da Cultura de células Resistentes ao PPT

Materiais e Métodos

Clivagem com CNBr

Glutamina sintetase (12 mmoles) foi dissolvida em 1 ml de ácido fórmico a 70% 5 mg de CNBr foi adicionado e a clivagem deu-se durante 24h a temperatura ambiente (Gross, Meth. Enzymol. 11 : 238-255(1967). Após diluição com água destilada (16 ml), a mistura foi liofilizada duas vezes.

Cromatografia Líquida de Alta Resolução dos Peptídeos de CNBK

A cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (HPLC) foi efectuada num Ultrapore RPSC (0,46 DIX 7,5 cm) a 40°C usando ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% (Bennett et al, Biochem. J 168 :9-13(1977) e um gradiente linear de 0-60% de acetonitrilo (30 min. fluxo 0,5 ml/min). Os peptídeos de CNBr foram dissolvidos no volume mínimo de hidrócloro de guanidina 6M em TFA a 0,1%.

Os picos cromatográficos de vários separações foram colhidos manualmente, reunidos e liofilizados. A detecção foi feita a 214 nm usando um detector Beckman 160.



Análise de Aminoácidos

As composições em aminoácidos foram determinados após hidrólise ácida das amostras em tubos fechados e com vácuo (Pyrex^R, cultura, inquebrável, 6 x 55mm) a 110°C durante 24 h com ebulição constante de HCl (0,025 ml) (Moore, Chemistry and Biology of Peptides. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, 629-653(1972). Usando um analisador de aminoácidos Beckman 6300 com dois integrados Hewlett-Packard 3390A, ninidrina e dois canais (440 e 570 nm) de integração obteve-se a análise de todos os aminoácidos excepto o triptofano, cisteína, asparagina e glutamina, com valores de confiança de 1-7% a 100 pmoles/aminoácido e com um limite inferior de detecção de 25 pmoles. As análises foram feitas 3-5 vezes para cada amostra e controlos do fundo.

Análise da Sequência Proteica:

Fez-se degradação de Edman Automatizada com um sequenciador Applied Biosystems 47pA. O programa de sequenciação foi desenvolvido anteriormente para o sequenciador de peptideos e proteínas em fase gasosa-liquida solida (Hewick et al., J. Biol. Chem. 256-:7990-7997 (1981). O programa possui um passo de acoplamento (44°C) 26 min e um passo de clivagem simples (44°C, 6,7 min). A conversão automatizada dos derivados de 2-anilino-5-triazolinona (aminoácidos Pth) utiliza ácido trifluoroacético a 25% (50°C, 33 min). Polybrene^R (1,5 mg) (tarr et al., Anal. Biochem. 84: 622-627 (1978); Klapper et al ibid 85, : 126-131 (1978) foi adicionado ao disco de filtração em vidro no cartucho antes da degradação da proteína ou peptideos e fizeram-se cinco ciclos de sequenciação para reduzir contaminantes derivados de Polybrene^R. Adicionou-se angiotensina II (1 nmole) ao cartucho de filtração e completaram-se dez ciclos de degradação. A sequenciação da angiotensina permi-



tiu testar a operacionalidade química e mecânica do sequenciador antes da sequência de uma proteína desconhecida. A análise de sequência proteica da apomióglobina de esperma de baleias (100-200 pmoles) de rotina demonstrou um rendimento inicial de 45-55%, rendimento inicial de 45-55%, rendimento repetitivo médio de 92-93% e um eclipse médio por ciclo de 2-3%.

Todos os aminoácidos Pth foram identificados por cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa numa coluna de ciano (0,45 x 25 cm) usando tampão acetato de sódio 15 mM (pH 5,5) e um gradiente complexo de acetonitrilo/metanol (92,5:7,5 v/v), baseado num sistema desenvolvido por Hunkapiller e Hood, Methods Enzymol. 91: 486-493(1983). Este sistema de HPLC separou os Pth-aminoácidos e o padrão interno (éster metílico de Pth-Glu) dos principais contaminantes: um aditivo de ditioneitol,, N-dimetil-N'-fenil-tiourea e difeniltiourea. A metionina e a prolina não foram separadas por rotina, mas uma modificação do gradiente separou estes dois aminoácidos Pth. O padrão interno foi adicionado (200 pmoles) a cada conjunto de ciclos e as amostras foram secas num Speedvac Concentrador com um rotor RH-100-6. As amostras secas foram dissolvidas em 0,025 ml de água/acetonitrilo (80:20 v/v) e uma pequena quantidade (0,017 ml) (68% da amostra total) foi injetada automaticamente. Os Pth-aminoácidos foram detectados por absorvância de UV a 254 nm usando um detector Beckman 160.



Esquema de Purificação

O processo de purificação está brevemente resumido no seguinte esquema:

100 g de células congeladas

adicionar Tris 50mM-pH7,5

↓
Usar misturador baixa velocidade (30 segundos)

(Alta velocidade) (2 minutos)

↓
Centrifugar 8 K rpm, 5°, 10 minutos

↓
Sobrenadante 7,5% v/v de sulfato de protamina a 1%,
15 minutos, 4°

↓
Centrifugar 8k rpm, 5°, 10 minutos

↓
Sobrenadante 1,5% v/v de $MgSO_4$ 1M
pH até 6,8 com ácido acético 1N
Me para 7 mM

↓
Ligar a H.A., 4°, 15 minutos

↓
Lavar H.A. 5x com Tris 50 mM pH 7,5
 $MgSO_4$ 0,28M
etilenoglicol 10%

↓
Eluir GS 6 x com Tris 50 mM pH 7,5
 $MgSO_4$ 0,5M
etilenoglicol 16,7%

↓
reunir as fracções eluidas, dialisar contra Tris 10mM
pH 6,8
Mg 10mM
 $MgSO_4$

↓
Coluna G-110, reunir as fracções do pico de actividade



100 gramas de células em cultura de tecidos de alfafa variante foram misturadas com neve carbónica e trituradas num misturador até se obter um pó fino. Após descongelação, a mistura foi centrifugada a 8000 rpm a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi precipitado com sulfato de protamina para remover o ácido nucleico. A concentração de MgSO_4 foi levada até 10 mM, o β Me até 7 mM e o pH ajustado a 6,8 com ácido acetico 1N. O extracto bruto foi ligado a H.A. A. H.A. foi lavada 5 vezes com Tris 10 mM, pH 7,5 MgSO_4 0,28M e etilenoglicol a 10%. A glutamina sintetase foi eluida aumentando a concentração de MgSO_4 para 0,5M. Foram feitas cinco eluições. Após diálise contra Tris 10mM, pH 7,5, MgSO_4 10mM, foi aplicado uma columna G-200. Reuniram-se as fracções com boa actividade de glutamina sintetase. Por electroforese em gel de SDS e acrilamida e coloração com prata observou-se um grau de pureza superior a 95%. A composição em aminoácidos mostrou que a composição da glutamina sintetase de alfafa é praticamente a mesma de uma composição publicada para a soja (Tabela 1)



TABELA 1

Composição em aminoácidos da Glutamina Sintetase
de alfafa

Aminoáci do	Soja* Raiz(mole%)	Folha de er vilheira (%)	Alfafa (mole % +CV)
Ala	8,4	6,9	8,7 ($\pm 0,4$)
Arg	5,6	4,0	5,0 ($\pm 0,5$)
Asx	10,4	10,7	11,4 ($\pm 0,6$)
Cis	0,8	N.D	N.D.
Glx	10,0	10,1	9,9 ($\pm 0,5$)
Gli	10,6	19,1	13,5 ($\pm 0,7$)
His	2,2	3,6	3,1
Ile	6,6	5,6	8,4 ($\pm 0,4$)
Leu	6,7	6,5	7,6 ($\pm 0,9$)
Lis	5,9	5,7	6,8 ($\pm 0,3$)
Met	1,6	N.D	0,6 ($\pm 0,3$)
Fen	2,8	2,6	2,3
Pro	6,1	8,8	8,0 ($\pm 0,6$)
Ser	5,4	7,8	6,5 ($\pm 0,4$)
Tre	5,1	4,9	5,6 ($\pm 0,3$)
Trp	1,5	N.D.	N.D.
Tir	3,9	0,5	3,4 ($\pm 0,7$)
Val	6,3	4,8	4,4 ($\pm 1,5$)

* R.H. McParland, et al., Biochem.J. (1976) 153:597-606

N.D. = Não eliminado

C.V. = Valor de confiança (D.P./média)



Sequênciação

Uma primeira tentativa de sequênciação foi iniciada usando a proteína nativa purificada. Não se obteve qualquer sequência indicando que a terminação NH_2 estava naturalmente bloqueada. Efectuou-se clivagem com CNBr e os fragmentos foram separados por HPLC. A composição de aminoácidos da proteína indicou haver apenas duas a cinco metioninas. Dois dos fragmentos de CNBr separados por HPLC deram informação útil sobre a sequência.

A sequênciação do fragmento de glutamina sintetase purificada foi então efectuada. Os resultados são como se segue:

Arg-Glu-Asp-Gli-Gli-Tir-Glu-Val-Ile-
Leu-Lis-Ala-Ile-Glu-Lis-Leu-Gli-Lis-
Lis-(Glu/His)-Lis-Glu-His-Ile-Ala-
Ala-Tir-Gli-Gli-Gli-Asn

Esta sequência corresponde a parte da sequência obtida do clone completo de cDNA de alfafa variante. A sequência proteica deduzida é apresentada na página seguinte.



1 ATG TCT CTC CTT TCA GAT CTT ATC AAC CTT GAC CTC TCC GAA ACC ACC GAG AAA ATC ATC GCC GAA TAC ATA TGG
Met Ser Leu Ser Asp Leu Ile Asn Leu Asp Leu Ser Glu Thr Thr Glu Lys Ile Ile Ala Glu Tyr Ile Trp
76 ATT GGT GGA TCT GGT TTG GAC TTG AGG AGC AAA GCA AGG ACT CTA CCA GGA CCA GTT ACT GAC CCT TCA CAG CTT
Ile Gly Gly Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Lys Ala Arg Thr Leu Pro Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser Glu Leu
151 CCC AAG TGG AAC TAT GAT GGT TCC AGC ACA GGT CAA GCT CCA GAA GAT AGT GAA GTT ATT ATC TAC CCA CAA
Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Thr Gly Gln Ala Pro Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Ile Tyr Pro Gln
225 GCC ATT TTC AAG GAC CCA TTT AGA AGG GGT AAC AAT ATC TTG GTT ATG TGT GAT GCA TAC ACT CCA GCT GGA GAG
Ala Ile Phe Lys Asp Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu Val Met Cys Asp Ala Tyr Thr Pro Ala Gly Glu
300 CCC ATT CCC ACC AAC AAG AGA CAT GCA GCT GCC AAG ATT TTC AGC CAT CCT GAT GTT GGT GAA GTA CCA TGG
Pro Ile Pro Thr Asn Lys Arg His Ala Ala Lys Ile Phe Ser His Pro Asp Val Val Ala Glu Val Pro Trp
375 TAT GGT ATT GAG CAA GAA TAC ACC TTG TTG CAG AAA GAC ATC AAT TGG CCT CTT GGT TGG CCA GTT GGT TTT
Tyr Gly Ile Glu Gln Gly Tyr Thr Leu Leu Leu Lys Asp Ile Asn Trp Pro Leu Gly Trp Pro Val Gly Gly Phe
450 CCT GGA CCT CAG GGA CCA TAC TAT TGT GGA GCT GGT GAT GCA AAG GCA TTT GGC CGT GAG ATT GTT GAC TCA CAT
Pro Gly Pro Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys Gly Ala Gly Ala Asp Lys Ala Phe Gly Arg Asp Ile Val Asp Ser His
525 TAC AAA GCC TGT CTT TAT GCC GGC ATC AAC ATC AGT GGA ATC AAT GGT GAA GTG ATG CCT GGT CAA TGG GAA TTC
Tyr Lys Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe
600 CAA GTT GGT CCC TCA GTT CTT ATC TCT CTT GGT GAT GAG ATA TGG GTT GGT TAC ATT TTG GAG AGG ATC ACT
Gln Val Gly Pro Ser Val Gly Ile Ser Ala Gly Asp Glu Ile Trp Val Ala Arg Tyr Ile Leu Glu Arg Ile Thr
675 GAG GTT GCT GGT GTG GTG CTT TCC TTT GAC CCA AAA CCA ATT AAG GGT GAT TGG AAT GGT GCT GGT CAC ACA
Glu Val Ala Gly Val Val Leu Ser Phe Asp Pro Lys Pro Ile Lys Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Ala His Thr
750 AAT TAC AGC ACC AAG TCT ATG ACA GAA GAT GGT GCC TAT GAA GTC ATC TTG AAA GCA ATT GAG AAG CTT GGG AAG
Asn Tyr Ser Thr Lys Ser Met Arg Glu Glu Asp Gly Tyr Glu Val Ile Leu Lys Ala Ile Glu Lys Leu Gly Lys
825 AAG CAC AAG GAG CAC ATT GCT GCT TAT GGA GAA GGC AAC GAG CGT AGA TTG ACA GGC CGA CAT GAG ACA GCT GAG
Lys His Lys Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn Glu Arg Arg Leu Thr Thr Glu Thr Ala Asp
900 ATT AAC ACC TTC TTA TGG GGT GTT GCA AAC CGT GGT GCG TCG ATT AGA GTT GGA AGG GAC ACA GAG AAA GCA GGG
Ile Asn Thr Phe Leu Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala Ser Ile Arg Val Gly Arg Asp Thr Glu Lys Ala Gly
975 AAA GGT TAT TTC GAG GAT AGG AGG CCA TCA TCT AAC ATG GAT CCA TAT GTT GGT ACT TCC ATG ATT GCA GAG ACC
Lys Gly Tyr Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ser Asn Met Asp Pro Tyr Val Val Thr Ser Met Ile Ala Asp Thr
1050 ACC ATT CTC TGG AAA CCA TAA 1071
Thr Ile Leu Trp Lys Pro End



PREPARAÇÃO DE UMA SEQUENCIA GENOMICA FUNCIONAL CODIFICADORA DE GLUTAMINA SINTETASE

DNA genômico total foi obtido de cultura de tecidos de alfafa usando um protocolo semelhante ao usado para obter o dos módulos da raiz de Phaseolus (Cullimore J.D. e Mifflin, B.J. FEBS Letters, 158:107-112 (1983) e digerido totalmente com BamHI. O material foi então fraccionado de acordo com o tamanho num gradiente de 5-20% de acetato de potássio e separado em pequenas quantidades. Cada uma destas migron num gel de 1% de agarose e hibridada num sistema de transferência Southern com uma sonda de cDNA de glutamina sintetase obtida por corte com Pst da sonda da sequência codificadora apresentada atrás. As hibridações positivas foram então seleccionadas relativamente a fragmentos superiores a 4 Kb. Estes foram ligados a um vector lambda BV-2, 100 000 fagos foram semeados e sondados com a sonda de cDNA da glutamina sintetase como acima. Obtiveram-se quatro placas positivas. Estas foram então expandidas e purificadas por hibridação de placas durante 3-4 voltas. Um clone genómico de 4Kb purificado foi isolado e ligado de novo ao H13mp9. Este clone foi sequenciado a partir de ambas as extremidades. Em adição, o clone foi também fragmentado com HaeIII, subclonado em MP-9 e de novo sequenciado.

Deste modo, este fragmento 5' é de 4KB (assim como um fragmento 3' de 8kb também obtido a partir de digestão do DNA genómico) pode ser totalmente sequenciado. Estes dois fragmentos em conjunto dão um gene funcional completo, sendo a fase de leitura prevista a partir da informação sobre a sequência proteica, o peso molecular conhecido da GS e a incidência relativa dos tripletos de paragem nas três fases de leitura possíveis. Com uma sequência funcional completa da GS a mesma pode ser expressa por



qualquer dos métodos descritos anteriormente.

Tendo agora descrito exhaustivamente este invento compreender-se-a que o mesmo pode funcionar dentro de uma gama de estruturas, produtos, processos e utilizações larga e equivalente sem afectar o espirito ou objectivo do invento ou de qualquer execução sua.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

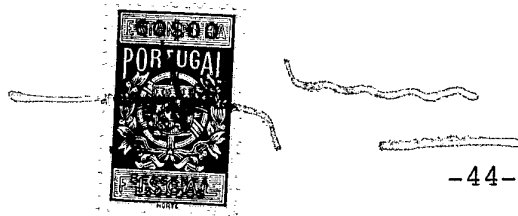
1a.- Célula vegetal caracteriza-da por ser resistente a um inibidor herbicida de glutamina sintetase (GS) e por a referida resistencia ser causada por níveis de actividade da GS na célula vegetal, que, quando presentes numa celula vegetal sendo sensível a inibidores herbicidas de GS, tornam a referida célula substancialmente resistente ao referido inibidor herbicida de GS.

2a.- Célula vegetal resistente de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os referidos níveis de actividade da GS estarem presentes em virtude da referida célula vegetal ter um numero significativamente maior de copias do gene "selvagem" da GS, do que a correspondente célula vegetal sensível.

3a.- Célula vegetal, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o numero de copias do gene "selvagem" da GS na referida célula vegetal ser tal que os níveis de actividade da GS produzidos tornam a referida célula substancialmente resistente ao referido inibidor herbicida de GS.

4a.- Célula vegetal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada por o gene "selvagem" da GS, na referida célula vegetal, estar substancialmente amplificado.

5a.- Célula vegetal de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por transportar uma combinação de sequencias genéticas que compreende:



a) uma primeira sequencia genética codificadora de glutamina sintetase (GS) funcional na referida célula vegetal, operavelmente ligada a

b) uma segunda sequencia genética capaz de aumentar os níveis da expressão da referida primeira sequência genética tal que, quando tal combinação está presente numa célula vegetal sensível a inibidores herbicidas de GS, a referida célula é substancialmente resistente ao referido inibidor herbicida de GS.

6a.- Célula vegetal de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a referida combinação estar integrada no genoma da referida célula vegetal.

7a.- Célula vegetal de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a referida combinação estar presente num plasmídeo Ti de Agrobacterium tumefaciens.

8a.- Célula vegetal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1,2,3,5,6 ou 7, caracterizado por o referido inibidor herbicida de GS ser fosfitricina (PPT).

9a.- Célula vegetal transformada resistente a inibidores herbicidas de GS, caracterizado por, no seu estado, não transformado, ser sensível a inibidores herbicidas de GS.

10a.- Célula vegetal de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o inibidor herbicida de GS ser PPT.



-45-

11a.- Combinação de sequencias geneticas operável numa determinada célula vegetal caracterizada por compreender:

a) uma primeira sequencia genetica codificadora de glutamina sintetase funcional na referida célula vegetal, operavelmente ligada a

b) uma segunda sequencia genetica capaz de aumentar os níveis da expressão da referida primeira sequencia genética tal que, quando tal combinação está presente uma célula vegetal sensível a inibidores herbicidas de GS, a referida célula é substancialmente resistente ao referido inibidor herbicida de GS.

12a.- Combinação da sequencias geneticas de acordo com a reivindicação 11 caracterizado por a segunda sequencia genetica ser um promotor.

13a.- Combinação de sequencias genéticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12 caracterizada por estar integrada no genoma da referida célula vegetal.

14a.- Combinação de sequencias geneticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12 caracterizada por estar presente num plasmideo Ti de Agrobacterium tumefaciens.

15a.- Combinação de sequencias geneticas de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12 caracterizadas por o referido inibidor herbicida de GS ser PPT.



-46-

16a.- Método para conferir resistência a inibidores herbicidas de GS, a uma célula vegetal sensível a inibidores herbicidas de GS, caracterizado por compreender o aumento das cópias de gene "selvagem" da GS presentes na referida célula vegetal sensível.

17a.- Método de acordo com a reivindicação 19 caracterizado por a referida resistência a inibidores herbicidas de GS ser uma resistência à PPT.

18a.- Método para conferir resistência a inibidores herbicidas de GS, a células vegetais, caracterizado por compreender a transformação da referida célula com a combinação de sequências genéticas de acordo com a reivindicação 11.

19a.- Método de acordo com a reivindicação 21 caracterizado por o referido inibidor herbicida de GS ser PPT.

20a.- Método para controlar selectivamente plantas sensíveis a inibidores herbicidas de GS caracterizado por compreender o contacto de uma planta sensível a inibidores herbicidas de GS, e por o referido contacto ser efectuado enquanto simultaneamente se contacta a planta resistente a inibidores herbicidas de GS, de acordo com a reivindicação 16.

21a.- Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o referido inibidor herbicida de GS ser PPT.

22a.- Processo para a obtenção de uma molécula de DNA recombinante caracterizado por se



incluir na referida molécula uma sequência genética que codifica a glutamina sintetase.

23a.- Processo de acordo com a reivindicação 25 caracterizado por se obter uma molécula que é um veículo capaz de transformar a célula vegetal.

24a.- Processo para a obtenção duma molécula de DNA recombinante (rDNA) caracterizado por se incluir na referida molécula uma sequência genérica codificadora de glutamina sintetase e por a referida glutamina sintetase consistir na seguinte fórmula de polipeptídeo:

Met-Ser-Leu-Leu-Ser-Asp-Leu-Ile-Asn-
Leu-Asp-Leu-Ser-Glu-Tre-Tre-Glu-Lis-
Ile-Ile-Ala-Glu-Tir-Ile-Trp-Ile-Gli-
Gli-Ser-Gli-Leu-Asp-Leu-Arg-Ser-Lis-
Ala-Arg-Tre-Leu-Pro-Gli-Pro-Val-Tre-
Asp-Pro-Ser-Gln-Leu-Pro-Lis-Trp-Asn-
Tir-Asp-Gli-Ser-Ser-Tre-Gli-Gln-Ala-
Pro-Gli-Glu-Asp-Ser-Glu-Val-Ile-Ile-
Tir-Pro-Gln-Ala-Ile-Phe-Lis-Asp-Pro-
Phe-Arg-Arg-Gli-Asn-Asn-Ile-Leu-Val-
Met-Cis-Asp-Ala-Tir-Tre-Pro-Ala-Gli-
Glu-Pro-Ile-Pro-Tir-Asn-Lis-Arg-His-
Ala-Ala-Ala-Lis-Ile-Phe-Ser-His-Pro-
Asp-Val-Val-Ala-Glu-Val-Pro-Trp-Tir-
Gli-Ile-Glu-Gln-Glu-Tir-Tre-Leu-Leu-
Gln-Lis-Asp-Ile-Asn-Trp-Pro-Leu-Gli-
Trp-Pro-Val-Gli-Gli-Phe-Pro-Gli-Pro-
Gln-Gli-Pro-Tir-Tir-Cis-Gli-Ala-Gli-

Ala-Asp-Lis-Ala-Fen-Gli-Arg-Asp-Ile-
Val-Asp-Ser-His-Tir-Lis-Ala-Cis-Leu-
Tir-Ala-Gli-Ile-Asn-Ile-Ser-Gli-Ile-
Asn-Gli-Glu-Val-Met-Pro-Gli-Gln-Trp-
Glu-Fen-Gln-Val-Gli-Pro-Ser-Val-Gli-
Ile-Ser-Ala-Gli-Asp-Glu-Ile-Trp-Val-
Ala-Arg-Tir-Ile-Leu-Glu-Arg-Ile-Tre-
Glu-Val-Ala-Gli-Val-Val-Leu-Ser-Fen-
Asp-Pro-Lis-Pro-Ile-Lis-Gli-Asp-Trp-
Asn-Gli-Ala-Gli-Ala-His-Tre-Asn-Tir-
Ser-Tre-Lis-Ser-Met-Arg-Glu-Asp-Gli-
Gli-Tir-Glu-Val-Ile-Leu-Lis-Ala-Ile-
Glu-Lis-Leu-Gli-Lis-Lis-His-Lis-Glu-
His-Ile-Ala-Ala-Tir-Gli-Glu-Gli-Asn-
Glu-Arg-Arg-Leu-Tre-Gli-Arg-His-Glu-
Tre-Ala-Asp-Ile-Asn-Tre-Fen-Leu-Trp-
Gli-Val-Ala-Asn-Arg-Gli-Ala-Ser-Ile-
Arg-Val-Gli-Arg-Asp-Tre-Glu-Lis-Ala-
Gli-Lis-Gli-Tir-Fen-Glu-Asp-Arg-Arg-
Pro-Ser-Ser-Asn-Met-Asp-Pro-Tir-Val-
Val-Tre-Ser-Met-Ile-Ala-Asp-Tre-Tre-
Ile-Leu-Trp-Lis-Pro

Lisboa, 30 de Setembro de 1985



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA



Fig. 1

O Ciclo da Glutamato Sintetase

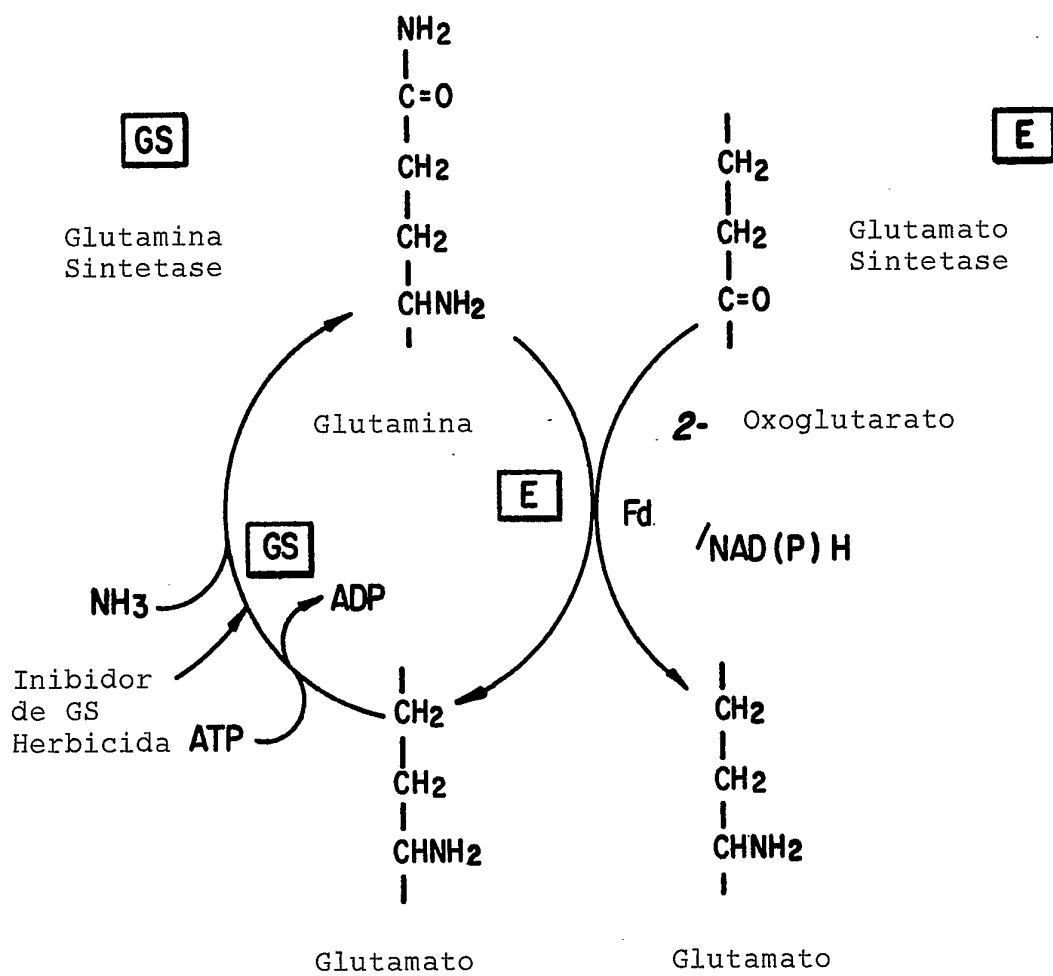




Fig.2

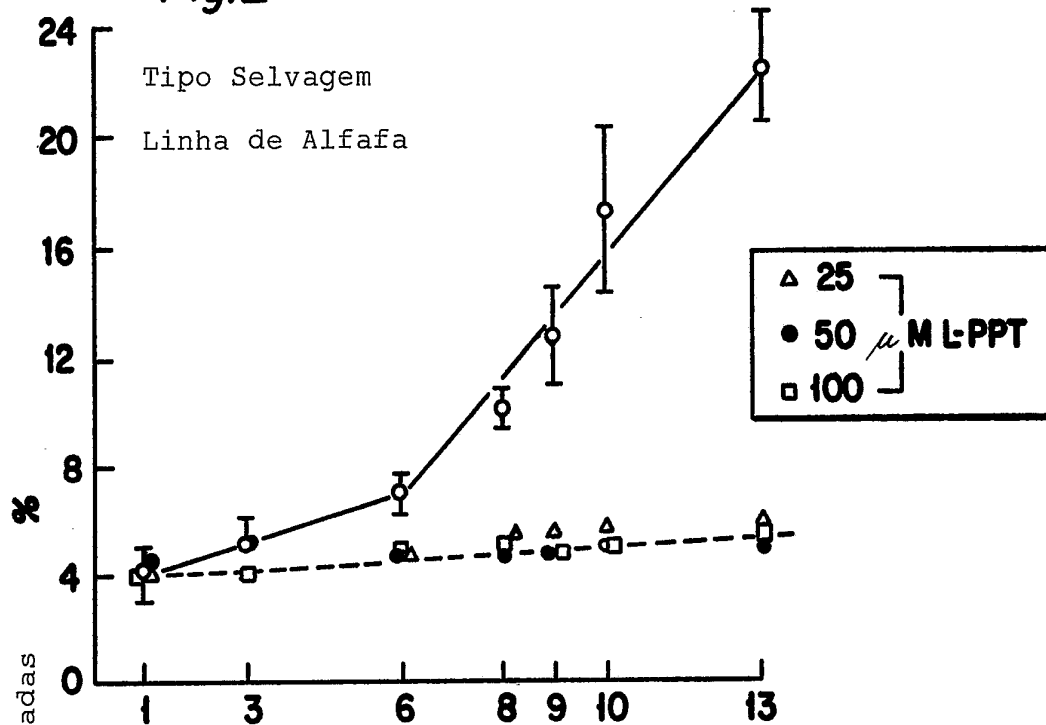


Fig.3

