



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8401421

Nederland

⑲ NL

- ⑤④ Genen die aan gisten bestendigheid tegen herbiciden verlenen.
- ⑤① Int.Cl³.: C12N 15/00.
- ⑦① Aanvrager: Labofina S.A. te Brussel.
- ⑦④ Gem.: Ir. H.J.G. Lips c.s.
Haagsch Octrooibureau
Breitnerlaan 146
2596 HG 's-Gravenhage.

- ②① Aanvraag Nr. 8401421.
- ②② Ingediend 4 mei 1984.
- ③② Voorrang vanaf 9 mei 1983.
- ③③ Land van voorrang: Luxemburg (LU).
- ③① Nummer van de voorrangsaanvraag: 84795 .
- ⑥② - -

- ④③ Ter inzage gelegd 3 december 1984.

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

Genen die aan gisten bestendigheid tegen herbiciden verlenen.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een gen, dat na transformatie of de gist de intrinsieke bestendigheid van deze laatste verleent tegen aan herbicide-type groei belemmeraar. Meer in het bijzonder heeft hij betrekking op het
5 plasmide, waarin een dergelijk gen is ingevoerd teneinde de door dit plasmide getransformeerde gist bestand te maken tegen genoemde belemmeraar. De uitvinding heeft ook betrekking op een gist, dat bestendig gemaakt is tegen een herbicide-type groei belemmeraar door transformatie met een dergelijk
10 plasmide. Bovendien heeft de uitvinding ook betrekking op een werkwijze voor het selektief kweken van gist, die getransformeerd is door een plasmide, dat dit gen bevat.

Het is uit de stand van de techniek bekend om micro-organismen te reprogrammeren door ze te transformeren met
15 exogeen DNA onder zodanige omstandigheden, dat dit DNA in de getransformeerde cel gekopieerd wordt en wordt omgezet in zijn nageslacht. Het praktische belang van deze technieken is duidelijk als het exogene DNA tenminste één gen bevat, dat in de getransformeerde cel de expressie van een voor de handel
20 van belang zijnd polypeptide verzekert, dat ofwel een hormoon voor medisch gebruik, zoals insuline, of een enzym voor industrieel gebruik, zoals amylase, kan zijn. Het is inderdaad voldoende om onder geschikte omstandigheden de getransformeerde microorganismen te kweken opdat ze het van belang zijnde
25 polypeptide voortbrengen, dat dan teruggewonnen wordt hetzij uit de microorganismen zelf of uit het kweekmedium, afhankelijk ervan of het polypeptide aan de cel gebonden blijft of afgescheiden wordt.

Een laboratoriummethode, die gewoonlijk gebruikt
30 wordt om een microorganisme te transformeren bestaat uit het gebruik van aan zelf-kopieërend plasmide als een vector van het betreffende gen, d.w.z. een cirkelvormig DNA molecuul, dat een reeks bevat die het een replicon in de gastcel maakt. Dit plasmide moet ook tenminste een restrictie plaats bevat-
35 ten, d.w.z. een reeks die specifiek splijtbaar is door een restrictie enzym.

Als het gesplitste plasmide gekoppeld wordt samen met DNA fragmenten die verkregen zijn hetzij door restrictie

van een exogeen DNA of door in vitro synthese, is het mogelijk om met geschikte gebruikelijke technieken zogenaamde "chimere" plasmiden te verkrijgen, waarin een fragment van exogeen DNA op de restrictieplaats is ingevoerd. Na incuberen van een microorganisme bevolking in aanwezigheid van een DNA preparaat dat dergelijke plasmiden bevat, is het mogelijk die clonen uit te kiezen, die door transformatie één of meer chimere plasmiden hebben verkregen. De verkregen clonenbank wordt dan gecontroleerd om de één of meer clonen te identificeren waarvan het genom gereprogrammeerd is door het gen volgens de uitvinding. Die clonen worden herkend hetzij omdat ze een nieuw fenotypisch kenmerk bezitten, dat gemakkelijk kan worden aangetoond door een kweek op een indicator of selectief medium, of omdat ze positief reageren op een proef, die berust op het gebruik van ofwel specifieke moleculaire sonden zoals nucleinezuren die complementair zijn voor het gezochte gen, of antilichamen die gericht zijn tegen het overeenkomstige polypeptide.

Na het identificeren van de gezochte clonen moet een fermentatieproces ontwikkeld worden, dat een optimale produktie van het van belang zijnde polypeptide verzekert. Om dit doel te bereiken worden gewoonlijk twee complementaire benaderingen toegepast: enerzijds wordt de chimere vektor onderworpen aan verschillende in vitro behandelingen, die tot doel hebben aan het coderende deel van het overeenkomstige gen een stel opeenvolgingen te verlenen die zijn uitdrukking het beste verzekeren, en anderzijds worden de kweekomstandigheden gekozen, die het geschiktste zijn voor het overleven en/of de vermenigvuldiging van de getransformeerde microorganismen, en voor de uitsluiting van fenotypische teruggevormde produkten, die tijdens fermentatie kunnen optreden. Als dergelijke kweekomstandigheden zijn vastgelegd, is het fermentatieproces genetisch stabiel en kan het worden overgebracht tot een industriële schaal.

Het is bekend, dat de transformatie van een microorganisme volgens de bovenstaande methoden meestal een instabiel omzetprodukt vormt. Het voorkomen van een toenemende hoeveelheid fenotypische teruggevormde cellen in opvolgende generaties, gekweekt in een niet-selektief kweekmedium, is een gevolg van genoemde instabiliteit. Uit een analyse blijkt, dat

ze de meeste of al hun plasmiden verloren hebben (zie K. Nagahari, J. Bacteriol. 136, 312, 1978). Deze toestand is het gevolg van de combinatie van twee verschijnselen:

1. Spontaan optreden in de kweek van gedeeltelijk of volledig behandelde microorganismen.

Deze behandeling kan het gevolg zijn van verschillende oorzaken:

- statistische afscheiding van de plasmiden tijdens de celdeling;
- ontkoppelen van de vermenigvuldiging van de plasmiden en van de chromosomen;
- voor vermenigvuldiging nadeel van chimere plasmiden ten opzichte van endogene plasmiden (zie C.P. Hollenberg, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96, 119, 1982).

2. Bevoorkeurde verspreiding van volledig of gedeeltelijk behandelde microorganismen tengevolge van het selectieve nadeel dat transformanten ondergaan (zie K. Sakaguchi, Molecular breeding and genetics of applied micro-organisms, Ed. K. Sakaguchi en M. Okanishi, Academic Press, 1980, bl.1).

Dit nadeel is des te sterker uitgesproken naarmate de expressie van de in het plasmide aanwezige genen sterk is en een belangrijker deel van de cel-economie vergt. Deze toestand is paradoxaal aangezien de onderzoekers, die een winstmakend proces voor industriële fermentatie wensen te ontwikkelen nu juist hun energie wijden aan een maximum expressie van de gecloonde genen.

Het is daarom noodzakelijk om, teneinde de genetische stabiliteit van de bevolking van microorganismen tijdens de fermentatie te beheersen, een kunstmatige selectie druk ten gunste van de transformanten uit te oefenen. Deze druk kan uitgeoefend worden door aan het kweekmedium een groei belemmeraar toe te voegen waarvoor het vektor-plasmide een extrinsieke bestendigheidsgroep bevat: zulks is het geval voor de meeste vektoren, die gebruikt worden voor de genetische omzetting van procaryotische microorganismen, die aan de transformanten bestendigheid verlenen voor verschillende antibiotica, zoals ampicilline (gedesactiveerd door een β -lactamase), neomycine (gedesactiveerd door een fosforylase), chlooramfenicol (gedesactiveerd door een acetylase).

De selectiedruk kan ook worden uitgeoefend door de

fermentatie uit te voeren in een kunstmatig kweekmedium, dat een essentiële metabool mist, waarvan de novo synthese verzekerd is door een enzym, dat gecodeerd is door een gen, dat uitsluitend door de vektor gedragen wordt, terwijl de over-
5 eenkomstige allel gedragen wordt door het chromosoom van de gastheer, door mutatie gedesactiveerd is. Deze toestand was in het bijzonder van toepassing op gist, dat door transformatie door middel van de het meest algemeen gebruikte vectoren het vermogen krijgt te groeien in een medium dat vrij is van
10 leucine (zoals pJDB207), tryptofaan (YRp7), of van uracil (pFL1)

Stabiliteitsregeling vormt in het algemeen geen ernstige hindernis voor het opstellen van industriële fermentatieprocessen op kleine schaal, zoals die, ontwikkeld voor de bereiding van medisch interessante producten met zeer hoge
15 toegevoegde waarde, zoals hormonen of vaccins: met de eerste soort selectie behoeft men niet beducht te zijn voor aanmerkelijke kosten of bevoorradingsproblemen, terwijl het gebruik van een kunstmatig kweekmedium aanvaardbaar is uit zowel een praktisch als een economisch standpunt met de tweede soort
20 selectie; in beide gevallen blijven de benodigde hoeveelheden betrekkelijk beperkt.

De noodzaak om tot dergelijke praktijken zijn toe- vlucht te nemen beperkt echter deze vooruitzichten voor het opzetten van industriële fermentatieprocessen op grote schaal
25 zoals die, gericht op de produktie van grote hoeveelheden producten met betrekkelijk geringe toegevoegde waarde, zoals voor bepaalde enzymen met landbouw-levensmiddel gebruik en gevormd door getransformeerde gist. In dit geval is het gebruik van kunstmatige media, die ontdaan zijn van een essen-
30 tiële metabool, dat de fenotypische teruggevormde producten (in tegenstelling tot de transformanten) niet in staat zijn te synthetiseren, bijzonder nadelig rekening houdend met de moeilijkheid van het bereiden van deze media en hun buitensporig hoge prijs.

35 Anderzijds blijkt het gebruik van natuurlijke kweek media, die betrekkelijk overvloedig en goedkoop zijn, zoals lactoserum of melasse, volkomen onwerkzaam te zijn omdat ze van nature niet selectief zijn wegens hun betrekkelijk hoge gehalte aan essentiële metaboliën. In de laatstgenoemde me-
40 dia zou de toevoeging van belangrijke hoeveelheden antibioti-

ca, zoals chlooramfenicol of een derivaat van neomycine, dat bekend staat als G418, waarvoor een extrinsieke bestendigheid kortelings aan de gist door transformatie kon worden verleend (zie C.P.Hollenberg, ICN-UCLA Symp.Mol.Cell.Biol., 5 15, 335, 1979, en A.Jimenez en J.Davies, Nature, 287, 869, 1980), niet alleen de fermentatiekosten aanzienlijk verhogen, maar het zou ook ernstige leveringsproblemen voor deze molekulen met zich mee brengen, waarvoor het voorkeursgebruik medisch of veterinair is. Het is bovendien ook bekend, dat 10 gist, net als de andere eucaryotica, indifferent is voor de meeste tegenwoordig verkrijgbare antibiotica: het is daarom zeer onwaarschijnlijk dat andere bestendigheidsfactoren voor belemmeraars van die soort voor gist gevonden zouden kunnen worden, en met meer reden dat ze nuttig gebruikt zouden kunnen 15 worden om de stabiliteit doeltreffend te regelen.

Een doel van de onderhavige uitvinding is een gen te verschaffen zodanig, dat na transformatie in een gistcel door middel van een zelf-kopieërend plasmide, dat dit gen bevat, de gist intrinsiek bestendig wordt voor één of ver- 20 scheidene groei-belemmeraars van het synthetische organische herbicide type. Dergelijke belemmeraars hebben, in tegenstelling tot antibiotica, het voordeel dat ze overvloedig beschikbaar en goedkoop zijn. In één van de uitvoeringsvormen van de uitvinding verschaft het gen aan de aldus getransformeerde 25 gist bestendigheid tegen een herbicide met formule 1, waarin Ar een groep is die een ring met een aromatisch karakter bevat, R_1 gelijk is aan waterstof, of een methyl of een hydroxygroep, en R_2 gelijk is aan een alkyl, cycloalkyl, alkenyl, alkylamino, cycloalkylamino, dialkylamino, methoxymethylamino 30 of alkoxygroep.

In een andere uitvoeringsvorm verschaft deze uitvinding een gen dat aan gist bestendigheid verleent tegen een herbicide met formule 2, waarin X gelijk is aan chloor of een methoxy of methylthiogroep, en R_1 en R_2 , die gelijk of verschillend kunnen zijn, een ethylamino of isopropylaminogroep 35 zijn.

Een ander doel van de onderhavige uitvinding is om een plasmide te verschaffen, dat het gen zoals hierboven beschreven bevat, dat gebruikt kan worden voor het overbrengen 40 van het gen naar de afstammelingen alsmede de expressie door

8401421

de getransformeerde gist van het bestendigheid fenotype, dat overeenkomt met het gen.

Nog een ander doel van de onderhavige uitvinding is om een gist te verschaffen, die bestendig gemaakt is tegen tenminste één synthetische organisch herbicide door transformatie met een plasmide zoals hierboven beschreven.

Een verder doel van de onderhavige uitvinding is om een werkwijze te verschaffen, die het mogelijk maakt om op industriële schaal een genetisch stabiele fermentatie van met een dergelijk plasmide getransformeerde gist te ontwikkelen.

Er is nu gevonden, dat de gistgroei belemmerd wordt door talrijke synthetische chemische produkten, die tegenwoordig gebruikt worden als totale of selektieve herbiciden in land- en tuinbouw. Dit feit is te meer verrassend, omdat van de meeste van deze herbiciden bekend is, dat ze werken op de fotosynthese van de planten, terwijl gist volledig vrij is van fotosynthetische aktiviteit.

Van deze herbiciden wordt een groot deel chemisch gekenmerkt door formule 1, waarin Ar een groep is, die een ring met een aromatisch karakter bevat. Deze Ar-groep is in het algemeen een benzéén of alkylbenzeenring, die één of verscheidene polaire substituenten kunnen bevatten, zoals halogeenaatomen of een methoxy of trifluormethylgroep. De Ar-groep kan ook een heterocyclische ring zijn, zoals benzothiazol of thiadiazol. In deze formule 1 is R_1 in het algemeen een waterstofatoom, maar hij kan ook een alkyl of hydroxygroep zijn. R_2 kan een alkyl, cycloalkyl of alkenylgroep zijn. Zulks is het geval voor een klasse van herbiciden van het carboxyanilide type, waarin Ar een in het algemeen gesubstitueerde fenylgroep is. Het is van deze herbiciden bekend, dat ze een belemmerende werking op fotosynthese hebben. Een karakteristiek voorbeeld is 3',4'-dichloorpropionanilide, algemeen bekend onder de gebruiksnaam "Propanil" (zie "The Pesticide Manual", Ed. Ch. R. Worthing, BCPC 6de ed. 1979, bl. 446).

R_2 kan ook een alkoxygroep zijn, in welk geval de herbiciden tot het carbamaat type behoren. Een karakteristiek voorbeeld is methyl-3,4-dichloorfenylcarbamaat, algemeen bekend als "Swép" (idem, bl. 569) genoemd en waarvan de werking ook op fotosynthese wordt uitgeoefend; een ander voorbeeld is isoprop-

8401421

yl-N-(3-chloorfenyl)carbamaat, beter bekend als "chlorpropham"(idem, bl.118).

Tenslotte kan R_2 een alkylamino-cycloalkylamino, alkoxyalkylamino, dialkylamino, ... groep zijn. In dat geval zijn de herbiciden derivaten van ureum, en ze zijn allen goed bekend wegens hun belemmerende werking op fotosynthese. Een klassiek voorbeeld van deze klasse van herbiciden is 3-(3,4-dichloorfenyl)-1,1-dimethylureum, gewoonlijk "Diuron"(idem, bl.224) genoemd. Als karakteristieke voorbeelden van verbindingen waarin Ar een heterocyclische ring is, kunnen genoemd worden 1-(benzothiazol-2-yl)-3-methylureum, dat benzothiazuron(idem, bl.37) genoemd wordt, en 1-(5-tert.butyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1,3-dimethylureum, dat tebuthiuron(idem, bl.495) genoemd wordt.

Een andere belangrijke herbiciden-familie, waarvan de belemmerende werking op de groei van gist aan het licht gekomen is, wordt chemisch gekenmerkt door formule 2, waarin X een chlooratoom of een methoxy of methylthiogroep kan zijn, terwijl R_1 en R_2 ethylamino en/of isopropylaminogroepen zijn. Deze herbiciden zijn derhalve afgeleiden van S-triazine, dat ook werkt op de fotosynthese; ze zijn van aanzienlijk commercieel belang. Een van de meest gebruikten is 2-chloor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine, beter bekend als "Atrazine"(idem, bl.21). Een andere is 2-chloor-4,6-di(ethylamino)-1,3,5-triazine, ook "Simazine"(idem, bl.474) genoemd.

Andere herbiciden, die niet overeenkomen met de algemene hierboven beschreven formule, kunnen eveneens volgens de onderhavige uitvinding gebruikt worden. Bij wijze van karakteristiek voorbeeld wordt 3-amino-1,2,4-triazoöl genoemd, algemeen amitrol genoemd; dit herbicide staat bekend wegens zijn werking op de biosynthese van carotenoïden.

Ofschoon het juiste werkingsmechanisme van deze herbiciden op gist niet in bijzonderheden bestudeerd is, kan deze werking voor een groot deel van deze produkten geacht worden te worden uitgeoefend op het ademhalingssysteem, rekening houdende met hun verschillende invloed op groei van gist in een medium waarin de enige koolstofbron een ademhalings-substraat is, b.v. glycerol, in vergelijking met een vergelijkingskweek, gemaakt in een medium dat een koolstofbron, zoals glucose, bevat, die zowel fermentatie als ademhaling

toelaat.

Het is bekend, dat in tenminste één geval mutanten van de gist *Saccharomyces cerevisiae*, die van nature bestand zijn tegen een herbicide (Diuron) geïsoleerd konden worden (zie A.M.Colson c.s., Eur.J.Biochem.74, 721, 1977). De uitsluitend mitochondrische plaats van de overeenkomstige genetische faktor maakt deze echter volkomen ongeschikt voor enigerlei poging om door transformatie een bestendigheid fenotype aan de gist te verlenen. Anderzijds is het bekend, dat intrinsieke bestendigheid factoren in het algemeen recessief zijn, hetgeen ze in principe ongeschikt maakt voor clonen in het bovengestelde doel. Deze regel is in ieder geval van toepassing op de gist *Saccharomyces cerevisiae* (zie J.R.Broach, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* - Life cycle and inheritance, Ed. J.N.Strathern, E.W.Jones en J.R.Broach, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, bl.723) en dit principe wordt duidelijk bevestigd in het enige bekende geval van clonen van een recessieve faktor van intrinsieke bestendigheid in de gist *Saccharomyces cerevisiae*, waarvoor het fenotype van bestendigheid tegen de overeenkomstige belemmeraar (het antibioticum trichodermine) niet in de transformant uitgesrukt kon worden (zie C.P.Hollenberg, Curr.Top. Microbiol.Immunol., 96, 119, 1982).

Er is gevonden, en dit is een belangrijk aspect van deze uitvinding, dat het mogelijk is om mutanten van de gist *Saccharomyces cerevisiae* te isoleren, die intrinsiek bestendig zijn tegen herbicide-type belemmeraars door het feit dat de genetische faktor, die verantwoordelijk is voor het fenotype van bestendigheid, gelegen is in de chromosomen van de kern, en dat dit semi-dominant is. Dergelijke mutanten zijn verkregen met de klassieke selektiemethode op een kweekmedium, dat het betreffende herbicide bevat.

Er is onverwacht uit het bestuderen van het verschijnsel van bestandigheid van deze mutanten gevonden, dat ze niet alleen bestendig waren tegen het herbicide, dat hun selectie mogelijk maakte, maar ook tegen andere synthetische organische herbicide-type belemmeraars. Dit kenmerk vormt een belangrijke eigenschap van de genen met intrinsieke bestendigheid volgens de onderhavige uitvinding.

Er is ook gevonden, en dit is een ander belangrijk

aspekt van de uitvinding, dat de gist *Saccharomyces cerevisiae* door transformatie met een gen van dat type een meervoudig bestendigheid fenotype kan verkrijgen ten opzichte van de oorspronkelijke mutant, en zulks door toepassing van tegenwoordig voor gist gebruikte genetische behandelingsmethoden.

Het transformeren van een gevoelige gist tot een gist die bestendig is tegen tenminste één van de herbiciden waarop deze uitvinding gericht is, kan in principe uitgevoerd worden met ieder intrinsiek bestendigheid gen waarmee het verband houdt, en dit door middel van elke zelf-vermenigvuldigende vektor, die gebruikt kan worden voor de gist *Saccharomyces cerevisiae*. Als voorbeelden van bekende vektoren die zich voor een dergelijk gebruik lenen, kunnen degenen genoemd worden die gevormd zijn door J.D.Beggs (pJDB 207, pJDB 219, pJDB 248; zie J.D.Beggs, Genetic Engineering 2, Ed.R.Williamson, Academic Press, 1981, bl.175) of door C.P.Hollenberg (pMP78, pMP81, zie C.P.Hollenberg, Curr.Top.Microbiol.Immunol. 96, 119, 1982) of zelfs door Ph.Fournier c.s. (zie Europese Octrooiaanvraag Nr. 11.562).

Door één van deze plasmiden getransformeerde gisten, waarin een bestendigheid gen volgens deze uitvinding van te voren is ingebouwd, kan voor commerciële doeleinden gekweekt worden, b.v. voor een industriële produktie van een polypeptide, waarvan de expressie wordt verzekerd door een gen dat in hetzelfde plasmide is ingebouwd als voor het bestendigheid gen, en dit onder omstandigheden die de genetische stabiliteit van de fermentatie garanderen en onder vermijding van de bovengenoemde nadelen of hindernissen die inherent zijn aan de tegenwoordig bruikbare methoden voor het regelen van de stabiliteit. Voor dat doel is het voldoende dat aan het kweekmedium één van de groei-belemmende stoffen wordt toegevoegd, waartegen de gist bestendig gemaakt is door transformatie, in een zodanige concentratie, dat alleen de transformanten kunnen overleven en/of vermenigvuldigen, in tegenstelling tot fenotypisch teruggevormde produkten, die tijdens fermentatie zouden kunnen optreden.

Andere kenmerken en voordelen van het gebruik van een gen volgens de onderhavige uitvinding worden geacht bin-
nen zijn beschermingsomvang te vallen en de volgende voor-

8401421

beelden worden gegeven om de onderhavige uitvinding beter toe te lichten, maar zonder deze te beperken.

Voorbeeld I

Isoleren van een mutant van gist *Saccharomyces cerevisiae*,
5 die spontaan bestendig is tegen groei-belemmeraars van het herbicide type.

Een mutant, die D273-10B/A21/D^R₂₁₇ wordt genoemd (verder aangeduid met DIU^R₂₁₇), die spontaan bestendig is, is geïsoleerd uit de stam D273-10B/A21 van *Saccharomyces*
10 *cerevisiae*, door selectie op een glycerol medium waaraan Diuron was toegevoegd in een concentratie van 100 µmol - de belemmeringsdrempel van 75 µmol voor deze stam was vooraf experimenteel bepaald voor haploïde alsmede voor diploïde cellen. De kernplaats van deze bestendigheid faktor van ge-
15 noemde mutant is bevestigd door een bestudering van zijn wijze van overgang naar het nageslacht van een kruiskweek tussen mutant DIU^R₂₁₇ en een gevoelige stam: uit analyse van de tetraden is gebleken, dat de faktor een scheiding volgt die karakteristiek volgens Mendel is. De analyse van het be-
20 stendigheid fenotype van heterogene diploïden ontstaan uit genoemde kruising heeft het semi-slapende karakter van de bestendigheid faktor aangetoond: de belemmering drempel is in het onderhavige geval 100 µmol, terwijl de haploïde mutant bestendig was bij een concentratie van 150 µmol. Van deze mu-
25 tant is vastgesteld, dat deze niet alleen bestendig is tegen het herbicide, dat gebruikt is om hem te selekteren, maar ook tegen andere herbiciden van het ademhaling belemmerende type, zoals atrazine (drempel 2 mmol, bestendigheid 5 mmol) amitrol (drempel 10 mmol, bestendigheid 20 mmol)
30 chlorpropham (drempel 0,3 mmol, bestendigheid 1 mmol) chlooroxuron dat 3-(4-(4-chloorfenoxyl)-1,1-dimethylureum is (drempel 0,01 mmol, bestendigheid 0,05 mmol) monuron dat 3-(4-chloorfenyl)-1,1-dimethylureum is (drempel 0,5 mmol, bestendigheid 1,5 mmol)
35 monolinuron dat 3-(4-chloorfenyl)-1-methoxy-1-methylureum is (drempel 1 mmol, bestendigheid 3 mmol) desmetryne dat 2-isopropylamino-4-methylamino-6-methylthio-1,3,5-triazine is (drempel 1 mmol, bestendigheid 5 mmol)
40 metribuzine dat 4-amino-6-tert.butyl-4,5-dihydro-3-methyl-

thio-1,2,4-triazin-5-on is (drempel 5 mmol, bestendigheid 50 mmol)

en dinoseb dat 2-sec.butyl-4,6-dinitrofenol is (drempel 0,2 mmol, bestendigheid 0,4 mmol)

5

Voorbeeld II

Clonen en expressie van een gen met intrinsieke bestendigheid tegen herbiciden in gist *Saccharomyces cerevisiae*

DNA is gezuiverd uit een vloeibare kweek van mutant DIU_{217}^R en onderworpen aan de restrictie door middel van enzym Pst I.

De verkregen restrictiefragmenten zijn ingevoerd door in vitro recombinatie in het overbreng-plasmide pJDB207 dat restrictie heeft ondergaan tot plaats Pst I van de bestendigheid faktor tegen ampicilline. Stam HB101 van *Escherichia Coli* is getransformeerd door middel van deze plasmiden teneinde een genom bank te vormen van mutant DIU_{217}^R in de vorm van een verzameling, die ongeveer 100.000 clonen bevat van *Escherichia Coli*, die elk één of meer chimere plasmiden bevatten en een fenotype vertonen dat gevoelig is voor ampicilline en bestendig is tegen tetracycline.

Een kweek van *Escherichia Coli* is uitgevoerd door middel van enten met alle clonen van deze bank teneinde de daarin aanwezige chimere plasmiden te uit te breiden. Uit die kweek is DNA geëxtraheerd en de plasmiden zijn daarna gezuiverd door isopycniisch centrifugeren op cesiumchloride in aanwezigheid van ethidiumbromide. Deze plasmiden zijn gebruikt om stam AH22 van *Saccharomyces cerevisiae* te transformeren volgens een klassieke methode (zie A.Hinnen c.s., Proc.Natl. Acad.Sci., USA, 75, 1929, 1978). De transformanten zijn geselecteerd op een glucodemedium, dat vrij was van leucine, en de getransformeerde clonen, die bestendig zijn tegen Diuron, zijn daarna geselecteerd door middel van een kweek op een glycerolmedium, waaraan Diuron was toegevoegd in een concentratie van 100 μ mol.

Het fenotype van bestendigheid van vele clonen, die overeenkomstig deze methode verkregen zijn, is daadwerkelijk het gevolg van de aanwezigheid daarin van één of meer chimere plasmiden, die de bestandigheid faktor bevatten, afkomstig van stan DIU_{217}^R , en dit feit is langs twee verschillende wegen gecontroleerd.

8401421

Ten eerste is een behandeling van ieder cloon van de verzameling uitgevoerd overeenkomstig de Hollenberg methode (zie C.P.Hollenberg, Curr.Top.Microbiol.Immunol.96, 119, 1982) en er is daarna gecontroleerd dat vele ervan overgingen in een fenotype dat zowel auxotroof met betrekking tot leucine, als gevoelig voor Diuron is na behandeling; clonen, die niet positief aan deze proef voldoen zijn terzijde gesteld. Anderzijds is DNA geëxtraheerd uit een vloeibare kweek, die geënt was met één van de clonen, die overeenkomstig de proef bewaard waren, en stan HB101 van Escherichia Coli is door middel van genoemd DNA getransformeerd, teneinde een bank van plasmiden van de genoemde gistcloon te vormen.

De verkregen clonen van Escherichia Coli, verder "secundair" genoemd, zijn bijeen gebracht in groepen van 50 clonen teneinde het enten van gemengde kweken uit te voeren, waaruit op de bovenbeschreven wijze plasmiden geëxtraheerd zijn. Deze plasmiden zijn gebruikt om stam AH22 te transformeren, zoals hierboven aangegeven; overeenkomstig deze methode is met een zeer hoge frekwentie een groot aantal tegen Diuron bestendige gist clonen verkregen, die hierin "secundair" genoemd worden.

Onder alle chimere plasmiden, die aanwezig waren in de Escherichia Coli secundaire bank, is een onderzoek uitgevoerd om het plasmide te ontdekken, dat verantwoordelijk was voor de waargenomen bestendigheid. Voor dit doel is de bovenstaande procedure herhaald en zijn namelijk plasmiden van elke afzonderlijke cloon, die de groep van 50 plasmiden vormen, die voldoen aan de proef van secundaire omzetting van gist, gezuiverd. Er is door elektroforese waargenomen, dat een grote verscheidenheid plasmide langs deze weg verkregen is, die belangrijke verschillen vertonen met betrekking tot de grootte van de fragmenten die in de plasmiden zijn ingevoerd enerzijds, en wat betreft hun restrictie profiel anderzijds, waarbij deze verschillende plasmiden in ongeveer tien onderscheidbare klassen gegroepeerd zijn, die het heteroplasmidische kenmerk van de primaire gist-transformatie vertonen; deze toestand is het gevolg van het meervoudige optreden van de oorspronkelijke transformatie gebeurtenis, en van de verdere mogelijkheid van recombinatie gebeurtenissen.

Clonen, die representatief zijn voor elk van deze

8401421

klassen zijn geïdentificeerd, en elk daarvan heeft een plasmidepreparaat gegeven, dat afzonderlijk gezuiverd is, zoals hierboven beschreven. Eén daarvan, pDIU202 genoemd, heeft zijn vermogen getoond om als begeleiding door transformatie van stam AH22 overeenkomstig de hierboven beschreven methoden, een fenotype te verlenen dat zowel prototroof ten aanzien van leucine is als bestendig tegen dezelfde herbiciden waar- tegen de oorspronkelijke mutant DIU^R₂₁₇ bestendig was. De grootte van het ingebouwde fragment in plasmide pDIU202 is door electroforese geschat ongeveer 1,5 Kb te zijn.

Een stam van *Escherichia Coli*, omgezet door plasmide pDIU202, is op 4 mei 1983 ingediend bij het Centraal bureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, 3740 AG Baarn, Nederland, onder nr. LMD 83.07 = CBS 396.83.

15 Voorbeeld III

Werkwijze voor de selektieve kweek van gist *Saccharomyces cerevisiae*, omgezet door een plasmide, dat een gen bevat met intrinsieke bestendigheid tegen herbiciden, die de genetische stabiliteit van de bevolking verzekert.

20 Een vloeibare kweek van stam AH22 van *Saccharomyces cerevisiae*, welke stam voordien getransformeerd is door middel van plasmide pDIU202, zoals beschreven in Voorbeeld II, is bij 30°C onder konstant roeren gekweekt in een Erlenmeyer die 100 ml bevatte van een volledig glycerol medium waaraan Diuron was toegevoegd in een eindconcentratie van 100 µmol. Tijdens de exponentiële fase van genoemde kweek werd een monster, dat getrokken was, gebruikt om een dergelijk kweekmedium te enten op zodanige wijze, dat deze tweede kweek onmiddellijk in de exponentiële groeifase is. Deze bewerking werd herhaald volgens dezelfde procedure tijdens een waarnemingsperiode van 300 uur, hetgeen overeenkomt met 132 opeenvolgende generaties.

Tijdens deze opeenvolgende kweken zijn monsters getrokken, waarbij de momenten overeenkomen met de volgende getallen van opeenvolgende generaties: 0, 8, 15, 25, 43, 57, 68, 78, 91, 110 en 132. De cellen werden welke keer verspreid Petri schaaltjes, die een vast volledig glycerol medium bevatten, teneinde geïsoleerde kolonies te verkrijgen. Iedere keer werden 50 kolonies daarvan verder gekweekt volgens de steriele tandestoker techniek op een stel van 4 Petri dozen,

8401421

die de volgende vaste media bevatten:

1. volledige glycerol
2. volledige glycerol en Diuron 100 μ mol
3. minimum glycerol en histidine
- 5 4. minimum glucose en histidine.

De kolonies die op elk van deze petri schaaltes gegroeid waren, werden iedere keer geteld. In alle gevallen is waargenomen, dat elk van de 50 verder gekweekte kolonies op elk van de boven gedefinieerde Petri schaaltes groeide. Deze
10 resultaten laten zien dat geen fenotype teruggevormd produkt was opgetreden noch voor het leucine auxotroof kenmerk noch voor het Diuron gevoeligheid kenmerk, tijdens de opeenvolgende 132 kweekgeneraties gedurende welke een positieve selectiekracht is uitgeoefend tengevolge van de aanwezigheid van
15 Diuron. Deze opmerkelijke genetische stabiliteit van de bevolking van gisten, die getransformeerd zijn door middel van plasmide pDIU202 is volkomen onverwacht ten opzichte van de waarnemingen als vermeld in de stand van de techniek (zie: N. Gunge, Ann. Rev. Microbiol., 37, 253, 1983) voor gisten die
20 omgezet zijn door middel van zelfvermenigvuldigende plasmiden van de YE_p klasse (gist episomale plasmiden) waartoe plasmide pDIU202 volgens de onderhavige uitvinding behoort. Met genoemde zelfvermenigvuldigende plasmiden is het welbekend, dat herhalingen van fenotype reversie van ongeveer één of
25 meer procent per generatie waargenomen worden, zelfs als een selectieve druk uitgeoefend is (in alle eerder beschreven gevallen was deze druk van het negatieve type). Bij wijze van voorbeeld kunnen de waarnemingen worden aangehaald die gedaan zijn aan gisten die waren omgezet door middel van de volgende
30 plasmiden en die een genetische instabiliteit vertonen:

- pleu 1.4 en pleu 2.6

(zie: J.B. Hicks, A. Hinnen en G.R. Fink, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 43, 1305, 1979)

- pJDB110, pJDB207, pJDB209, pJDB210 en pJDB211

35 (zie: J.D. Beggs, A. Benzon Symposium, 16, 383, 1981)

-pJDB219

(zie: J.D. Beggs, A. Benzon Symposium, 16, 383, 1981;

C.P. Hollenberg, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96, 119, 1982;

40 A. Toh-E, P. Guerry-Kopecko en R.B. Wickner, J. Bacteri-

8401421

ol., 141, 413, 1980; R.M.Waisley, D.C.J.Gardner en S.G.Oliver, Mol.Gen.Genet. 192, 361, 1983).

- G9

(zie: C-Gerbaud, P.Fournier, H.Blanc, M.Aigle, H.Heslot
5 en M.Guérineau, Gene, 5, 233, 1979)

- YEpl3

(zie: C.L.Hsiao en J.Carbon, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78,
3760, 1981)

- YEpl4

10 (zie: K.Struhl, D.T.Sticjcomb, S.Scherer en R.W.Davis,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 1035, 1979)

Teneinde het kenmerk van instabiliteit van een door
plasmide pJDB207 (dit plasmide is identiek aan pDIU202 behal-
ve dat het vrij is van het 1.5Kb fragment dat verantwoorde-
15 lijk is voor de bestendigheid tegen Diuron; het is derhalve
niet in staat een positieve selektiedruk in stand te houden
door toevoeging van laatstgenoemd herbicide aan het kweekme-
dium) getransformeerde controle kweek te bevestigen, zijn
vloeibare kweken van stam AH22 van *Saccharomyces cerevisiae*,
20 die vooraf getransformeerd waren door middel van plasmide
pJDB207, zoals beschreven in Voorbeeld II, bereid in overeen-
stemming met de hierboven beschreven procedure, behalve dat
Diuron niet was toegevoegd aan het medium, en behalve dat de
monsters getrokken werden op momenten die overeenkomen met
25 de volgende generaties: 0, 13, 26, 38, 51 en 66. Teruggevorm-
de produkten die een auxotroof kenmerk hebben ten aanzien van
leucine zijn reeds in de 26ste generatie (2%) waargenomen en
met een toenemende veelvuldigheid zoals te zien valt uit de
volgende resultaten.

30 Na 38 generaties 4%
Na 51 generaties 6%
Na 66 generaties 20%

Deze resultaten bevestigen duidelijk, dat de werk-
wijze voor de selektieve kweek volgens de onderhavige uitvin-
35 ding de genetische stabiliteit garandeert van een bevolking
van gisten die door middel van een positieve selektiedruk,
uitgeoeft door een herbicide ten gunste van cellen die een
plasmide bevatten, dat zelf een gen met intrinsieke bestendig-
heid tegen genoemd herbicide bevat, getransformeerd zijn.

C o n c l u s i e s :

1. Gen, dat aan een gistcel de intrinsieke bestendigheid van de cel verleent tegen tenminste één groei belemmeraar van het synthetisch organische herbicide type, door middel van een transformatie van genoemde cel.
- 5 2. Gen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het herbicide overeenkomt met formule 1, waarin Ar een groep is, die een ring met een aromatisch karakter bevat, R_1 gelijk is aan waterstof, een methyl of hydroxy-
10 groep, R_2 gelijk is aan een alkyl, cycloalkyl, alkenyl, alkylamino, cycloalkylamino, alkoxyalkylamino of alkoxygroep.
3. Gen volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat de R_2 groep van het herbicide een methylamino, 15 dimethylamino of methoxymethylaminogroep is.
4. Gen volgens conclusie 2 of 3, met het kenmerk, dat de Ar groep van het herbicide een al dan niet gesubstitueerde benzeenring bevat.
20
5. Gen volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat de Ar groep van het herbicide een fenylgroep met 1 of 2 substituenten, die bestaan uit halogeenatomen of een alkyl, methoxy of trifluormethylgroep, is.
25
6. Gen volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het herbicide isopropyl-N-(3-chloorfenyl)-carbamaat is.
- 30 7. Gen volgens conclusie 2, waarin het herbicide 3-(3,4-dichloorfenyl)-1,1-dimethylureum is.
8. Gen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het herbicide overeenkomt met formule 2, 35 waarin X gelijk is aan chloor, een methoxy of methylthiogroep en R_1 en R_2 een ethylamino en/of isopropylaminogroep zijn.
9. Gen volgens conclusie 8, met het ken-

8401421

m e r k , dat het herbicide 2-chloor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine is.

10. Gen volgens conclusie 8, m e t h e t k e n -
5 m e r k , dat het herbicide 2-chloor-4,6-di(ethylamino)-1,3,5-triazine is.

11. Gen volgens conclusie 1, m e t h e t k e n -
m e r k , dat het herbicide 3-amino-1,2,4-triazool is.

10

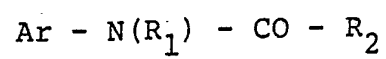
12. Plasmide dat het gen beschreven in één van de conclusies 1 tot 11 bevat, hetgeen de expressie van genoemd gen in de gist garandeert en aan de gist bestendigheid verleent tegen tenminste het overeenkomstige herbicide.

15

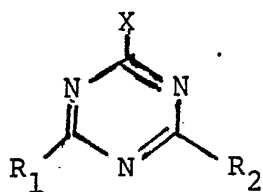
13. Tegen tenminste één synthetisch organisch herbicide bestendige gist, m e t h e t k e n m e r k , dat deze een plasmide overeenkomstig conclusie 12 bevat.

20

14. Werkwijze voor de selektieve kweek van door het plasmide van conclusie 12 getransformeerde gisten, m e t h e t k e n m e r k , dat deze werkwijze de genetische stabiliteit van de bevolking tijdens de fermentatie verzekert.



1



2

LABOFINA S.A., Bruxelles, België

8401421