



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 36 801 T2 2007.08.16

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 862 635 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 36 801.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/04982

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 919 934.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/035960

(86) PCT-Anmeldetag: 24.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.10.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.09.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 11.10.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 16.08.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

622679 26.03.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, US

(72) Erfinder:

STILES, I., John, Kaneohe, HI 96744, US;
MOISYADI, Istefo, Honolulu, HI 96822, US;
NEUPANE, Raj, Kabi, Honolulu, HI 96826, US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: GEREINIGTE PROTEINE, REKOMBINANTE DNS-SEQUENZEN UND PROZESSE FÜR DIE PRODUKTION VON KOFFEINFREIEN GETRÄNKEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung betrifft gereinigte Proteine, rekombinante DNA-Sequenzen, damit transformierte Wirte und Verfahren zur Herstellung von koffeinfreien Getränken und Nahrungsmittelprodukten. Insbesondere betrifft die vorliegende Anmeldung gereinigte Proteine und rekombinante DNA-Sequenzen, die die Expression von Koffein in Kaffeepflanzen und in daraus geernteten Früchten unterdrücken. Die Erfindung ergibt stabile Linien von koffeinfreien Kaffeepflanzen, deren Früchte nach dem Rösten und Mahlen zur Herstellung von koffeinfreiem Kaffee verwendet werden können. Es wird erwartet, dass die Erfindung zur Unterdrückung der Koffeinsynthese in Tee (*Camellia sinensis*) und Cola (*Cola acuminata*) sowie von verwandten Alkaloiden in Schokolade (*Theobroma cacao*) verwendet werden kann.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Kaffee wird aus den gerösteten Kaffeebohnen der Pflanzen des Genus *Coffea* und im Allgemeinen der Spezies *C. arabica* hergestellt. Kaffeepflanzen produzieren das Alkaloid Koffein, das in den getrockneten Früchten, den Kaffeebohnen, vorkommt. Da viele Kaffeetrinker lieber Kaffee ohne Koffein trinken, wurden eine Reihe von Verfahren entwickelt, um Koffein aus Kaffeebohnen zu entfernen. Diese Verfahren führen alle dazu, dass außer Koffein auch andere Substanzen aus den Bohnen entfernt werden, wodurch der Geschmack des aus den behandelten Bohnen gebrühten Kaffees beeinträchtigt wird. Es gibt zwar einige natürlich vorkommende koffeinfreie Kaffeesorten und verwandte Arten (*Mascaro coffeea* spp. und *Coffea bengalensis*), aber diese haben keinen kommerziellen Wert. (Charrier und Berthaud, „Variation of Caffeine Content In The *Coffea* Genus“, *Cafe Cacao The*, 14:251-264 (1975)). Demnach besteht ein Bedarf nach einem Verfahren zur Herstellung von entkoffeinierten Kaffeebohnen, das nicht zur Entfernung von anderen Substanzen außer Koffein aus den Bohnen führt.

[0003] Koffein ist ein natürlich vorkommendes Purinalkaloid, das unter anderem von Kaffee- und Teepflanzen produziert wird. Es wird angenommen, dass die Koffeinsynthese die Pflanzen vor Insekten schützt. Kaffeepflanzen synthetisieren Koffein aus dem Nucleosid Xanthosin in vier sequentiellen Reaktionen wie in [Fig. 1](#) gezeigt. Eine Übersicht findet sich in Suzuki, T., Ashihara, H. und Waller, G.R., *Phytochemistry* 31:2575 (1992). Der erste Schritt auf diesem Pfad ist die Methylierung des Nucleosids Xanthosin durch S-Adenosylmethionin, das von dem Enzym Xanthosin N⁷ Methyltransferase (XMT) katalysiert wird. Das Produkt, 7-Methylxanthosin, wird zu 7-Methylxanthin hydrolysiert (eine Ribose wird entfernt) und wird weiter zu Theobromin und Koffein methyliert. Es ist davon auszugehen, dass eine Unterbrechung dieser Reihenfolge von synthetischen Reaktionen die Koffeinsynthese blockieren würde.

[0004] Demnach besteht eine Strategie zur selektiven Eliminierung von Koffein aus Kaffeepflanzen darin, die Synthese spezifischer Enzyme in einem Pfad für die Koffeinbiosynthese zu verhindern. In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die genetische Veränderung von Kaffeepflanzen zur Eliminierung der Synthese von XMT. In der zurzeit bevorzugten Ausführungsform wird die Synthese von XMT durch Transformation der Kaffeepflanzen mit einer DNA-Sequenz unterdrückt, die bei Transkription für eine im Gegensinn zur mRNA, die bei Expression für XMT kodiert, stehenden Boten-RNA (mRNA) kodiert. Die Erfindung kann so verallgemeinert werden, dass andere koffeinfreie Getränke oder Nahrungsmittelprodukte, einschließlich Tee, Kakao und andere Getränke oder Nahrungsmittel auf Schokoladenbasis hergestellt werden können.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Gereinigte Proteine, DNA-Sequenzen, die bei Expression dafür kodieren, und rekombinante DNA-Moleküle, einschließlich damit transformierte Wirte, zur Transformation von Kaffeepflanzen zur Unterdrückung der Expression von Koffein. Die DNA-Sequenzen und rekombinante DNA-Moleküle sind dadurch gekennzeichnet, dass sie bei Expression für ein Enzym, Xanthosin N⁷ Methyltransferase (XMT) kodieren; dies ist der erste Schritt auf dem Weg zur Koffeinsynthese in Kaffee. Die Grundsequenz dieser DNA und die vorhergesagte Aminosäuresequenz von XMT werden bereitgestellt.

[0006] Kaffeepflanzen werden mit DNA-Molekülen transformiert, die bei Transkription für mRNA kodieren, die gegensinnig (antisense) zur mRNA vorliegt, die bei Expression für mindestens ein Enzym auf dem Weg zur Koffeinbiosynthese kodiert. Die gegensinnige RNA bindet an XMT mRNA und inaktiviert so die mRNA, die den ersten Schritt auf dem Weg zur Koffeinsynthese kodiert. Als Ergebnis können die transformierten Pflanzen nicht mehr Koffein synthetisieren, aber andere Aspekte ihres Stoffwechsels bleiben unbeeinflusst.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0007] [Fig. 1](#) ist eine schematische Zeichnung des Wegs zur Kaffeinsynthese in Coffea arabica.

[0008] [Fig. 2](#) ist ein Foto eines mit Silber angefärbten SDS PAGE Gels von gereinigter Xanthosin-N⁷-methyltransferase.

[0009] [Fig. 3](#) ist eine densitometrische Darstellung der Elution tryptischer Fragmente von gereinigter Xanthosin-N⁷-methyltransferase nach HPLC-Trennung.

[0010] [Fig. 4](#) ist eine Beschreibung der Oligonucleotid-Primer, die für die Durchsuchung der cDNA-Bank-cDNA, die für Xanthosin-N⁷-methyltransferase kodiert, verwendet wurden.

[0011] [Fig. 5](#) ist die Grundsequenz der cDNA, die für Xanthosin-N⁷-methyltransferase kodiert.

[0012] [Fig. 6](#) mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz von Xanthosin-N⁷-methyltransferase.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0013] Zum vollständigen Verständnis der hierin beschriebenen Erfindung dient die nachfolgende detaillierte Beschreibung. In der Beschreibung werden folgende Begriffe verwendet:

Nucleotid – Eine monomere Einheit von DNA oder RNA aus einem Zuckerteil (Pentose), einem Phosphat und einer nitrogenen heterocyclischen Base. Die Base ist mit dem Zuckerteil über den glykosidischen Kohlenstoff (1' Kohlenstoff von Pentose) verbunden und diese Kombination aus Base und Zucker wird Nucleotid genannt. Die Base charakterisiert das Nucleotid. Die vier DNA-Basen sind Adenin („A“), Guanin („G“), Cytosin („C“) und Thymin („T“). Die vier RNA-Basen sind A, G, C und Uracil („U“).

DNA-Sequenz – Eine lineare Anordnung von Nucleotiden, die durch Phosphodiesterbindungen zwischen den 3' und 5' Kohlenstoffen benachbarter Pentosen miteinander verbunden sind.

Codon – Eine DNA-Sequenz aus drei Nucleotiden (ein Triplet), die durch mRNA eine Aminosäure kodiert, ein Translationsstartsignal oder ein Translationsterminationssignal. Die Nucleotidtriplets TTA, TTG, CTT, CTC, CTA und CTG kodieren beispielsweise für die Aminosäure Leucin („Leu“), TAG, TAA und TGA sind Translationsterminationssignale und ATG ist ein Translationsstartsignal, das auch die Aminosäure Methionin („MET“) kodiert.

Polypeptid – Eine lineare Anordnung von Aminosäuren, die über Peptidbindungen zwischen den Amino- und Carboxygruppen benachbarter Aminosäuren miteinander verbunden sind.

Genom – Die gesamte DNA einer Zelle oder eines Virus. Sie umfasst unter anderem das strukturelle Gen, das für die Polypeptide der Substanz kodiert, sowie Promotor-, Transkriptions- und Translationseinleitungs- und -terminationsstellen.

Gen – Eine DNA-Sequenz, die durch ihre Template- oder Boten-RNA („mRNA“) eine Aminosäuresequenz kodiert, die für ein spezifisches Polypeptid charakteristisch ist.

Transkription – Das Verfahren der Herstellung von mRNA aus einem Gen oder einer DNA-Sequenz.

Translation – Das Verfahren der Herstellung eines Polypeptids aus mRNA.

Expression – Das Verfahren, dem ein Gen oder eine DNA-Sequenz unterworfen wird, um ein Polypeptid herzustellen. Es ist eine Kombination aus Transkription und Translation.

Plasmid – Eine nichtchromosomal doppelsträngige DNA-Sequenz mit einem intakten „Replikon“, so dass das Plasmid in einer Wirtszelle repliziert wird. Wenn das Plasmid in einen einzelligen Organismus gebracht wird, können die Eigenschaften dieses Organismus durch die DNA des Plasmids verändert oder transformiert werden. Ein Plasmid, das das Gen für Tetracyclinresistenz (TETR) trägt, transformiert beispielsweise eine Zelle, die zuvor für Tetracyclin empfindlich war, in eine Zelle, die dagegen resistent ist. Eine Zelle, die durch ein Plasmid transformiert wird, nennt man eine „Transformante“.

Phage oder Bakteriophage – Bakterienviren, von denen viele aus DNA-Sequenzen bestehen, die in einer Proteinhülle oder einem Proteinmantel verkapst sind („Kapsid“).

Klonvehikel – Plasmid, Phagen-DNA, Kosmid oder andere DNA-Sequenz, die in einer Wirtszelle replizieren kann, gekennzeichnet durch ein oder wenige Endonuklease-Erkennungsstellen, an denen solche DNA-Sequenzen auf vorbestimmbare Weise ausgeschnitten werden können, ohne Verlust einer wesentlichen biologischen Funktion der DNA, z.B. Replikation, Produktion von Mantelproteinen oder Verlust von Promotor- oder Bindungsstellen, und die einen Marker enthält, der zur Identifizierung von transformierten Zellen, z.B. Tetracyclinresistenz oder Ampicillinresistenz verwendet werden kann. Ein Klonvehikel wird häufig als Vektor bezeichnet.

Klonen – Verfahren der Gewinnung einer Population von Organismen oder DNA-Sequenzen aus einem sol-

chen Organismus oder einer solchen Sequenz durch asexuelle Reproduktion.

Rekombinantes DNA-Molekül oder Hybrid-DNA – Ein Molekül aus Segmenten von DNA unterschiedlicher Genome, die auf der Außenseite von lebenden Zellen Ende an Ende verbunden wurden und die in lebenden Zellen aufrechterhalten werden können.

cDNA – Ein DNA-Strang, der einer mRNA komplementär ist und für ein bestimmtes Polypeptid kodiert.

[0014] Die Strategie zur Herstellung von koffeinfreiem Kaffee kann zwar auch auf andere Enzyme auf dem Weg zur Koffeinsynthese in Kaffee und andere Koffein produzierenden Pflanzen verallgemeinert werden, aber in der zurzeit bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Expression des ersten einzigartigen Enzyms auf diesem Weg, Xanthosin-N⁷-Methyltransferase (XMT) unterdrückt. Die Rolle von XMT in der Koffeinsynthese wurde zwar durch radioaktive Markierung von Vorläufern aufgeklärt, aber bis heute wurde das Enzym noch nicht gereinigt und seine Aminosäuresequenz wurde noch nicht bestimmt. Diese Erfindung umfasst daher im Wesentlichen gereinigtes XMT. Die Erfindung umfasst ferner die Aminosäuresequenz von tryptischen Fragmenten, die aus dem gereinigten XMT isoliert wurden.

[0015] cDNA-Sonden auf Basis von Teilen der Aminosäuresequenz, die aus Proben des gereinigten Enzyms gewonnen wurden, wurden synthetisiert und ein Teil des Gens wurde mit PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden durch Screenen einer cDNA-Bank verwendet, die aus mRNA von jungen Blättern synthetisiert wurde, um für XMT kodierende Transkripte zu identifizieren. Die positiven Transkripte wurden sequenziert und ca. 90% des für XMT kodierenden Gens wurden erhalten.

[0016] DNA, die bei Expression für XMT kodiert, wird in einen pBI-121-Transformationsvektor eingebaut, der ein Kanamycin-Resistenzgen enthält. Der erfolgreiche Einbau des Vektors in die Pflanzenzellen wird durch Erfassung von antibiotischer Resistenz überwacht. Die Konstrukte werden zur Transformation von somatischen Kaffee-Embryos in Gewebekulturen verwendet. Die transformierten Embryos wachsen anschließend zu neuen Kaffeepflanzen heran, die kein Koffein produzieren. Natürlich entkoffeinerter Kaffee wird aus den gerösteten und gemahlenen Früchten dieser neuen Pflanzen hergestellt.

[0017] Insbesondere wurde frisches Blattgewebe von jungen Blättern von *C. arabica* mazeriert und das Protein daraus extrahiert. Säulengereinigte Extrakte wurden durch Überwachung der Methylierung von Xanthosin mit C¹⁴-markiertem S-Adenosylmethionin als Substrat auf enzymatische Aktivität untersucht. Das Reaktionsprodukt wurde durch Vergleich der Migration des markierten Reaktionsprodukts mit der Migration von 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, 8-Methylxanthin, 7-Methylxanthosin, Xanthin und Xanthosin in jeweils vier verschiedenen Chromatographiesystemen als 7-Methylxanthosin bestätigt.

[0018] Die Reinheit der Proteinisolate wurde mit SDS PAGE Elektrophorese und zweidimensionaler Gelelektrophorese bestimmt. Anfärbung der eindimensionalen SDS PAGE Gels mit Silber zeigte die Anwesenheit eines Dupletts mit der enzymatischen Aktivität von XMT und einem Molekulargewicht von 36-37 kDa (kD) wie in [Fig. 2](#) gezeigt. Jedes Protein wurde durch isoelektrische Fokussierung weiter aufgelöst. Die Daten weisen auf das Vorliegen von Isozymen von XMT hin, die das Resultat einer posttranslationalen Modifikation des Proteins sein können; alternativ kann es eine Genfamilie geben, die für XMT-Enzyme kodiert.

[0019] Das auf SDS PAGE Gels visualisierte Duplett wurde für die Proteinsequenzierung verwendet. Gereinigtes XMT wurde partiell tryptisch aufgeschlossen, um Fragmente zur weiteren Analyse zu erhalten; drei Peaks wurden mit HPLC aufgelöst. Die Sequenzierung erfolgte durch das Protein Structure Laboratory der Universität von Kalifornien, Davis, unter Verwendung von automatischer Edman Degradierung. (Edman, P. und Begg, G., Eur. J. Biochem. 1:80). Zwei einzigartige Sequenzen wurden aufgelöst und zur Herstellung von Primern für die Sondensynthese verwendet. RNA wurde aus Kaffeeblättern extrahiert. mRNA enthaltende Poly (A+)-Sequenzen wurden daraus gereinigt. Eine cDNA-Bank wurde mit Reverse-Transkriptase aus der Poly (A+) mRNA hergestellt. Doppelsträngige DNA wurde mit DNA Polymerase I hergestellt und durch Präzipitation wieder gewonnen. Die cDNA wurde fraktioniert und in den Phagen zur Amplifikation eingefügt. Die cDNA-Bank wurde mit einer PCR-synthetisierten Sonde durchsucht, die mit Primern auf Basis der von der Aminosäuresequenz des gereinigten XMT erwarteten DNA-Sequenz hergestellt wurde. Ein Klon, der eine cDNA produziert, die alle für XMT kodierenden Sequenzen enthält, wurde identifiziert.

[0020] Die cDNA, die dem für XMT kodierenden Gen entspricht, wird zur Transformation von embryonischen Kaffeepflanzen verwendet. Das Plasmid-pBI-121 wird als Transformationsvektor verwendet. Die der DNA, die bei Expression für XMT kodiert, entsprechenden Sequenzen werden in umgedrehter Orientierung neben einem Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotor in das Plasmid eingefügt. Daraus transkribierte RNA ist komplementär zur mRNA, die für die Aminosäuresequenz von XMT kodiert. Vollständige Konstrukte werden in Bak-

terienwirten amplifiziert. Die Werte werden aufgebrochen und der amplifizierte Vektor wird an kolloidale Goldpartikel angeheftet. Die Goldpartikel mit den anhängenden Vektoren werden in Kaffeepflanzenprotoplasten eingefügt, indem die Partikel bei hoher Geschwindigkeit wie in US Patent 5.107.065 beschrieben an die Zellen geschleudert werden. Erfolgreich transformierte Jungpflanzen werden durch antibiotische Resistenz identifiziert. Die transformierten Pflanzen produzieren kein Koffein.

BEISPIELE

A. Reinigung von Xanthosin-N⁷-Methyltransferase aus *C. arabica* L. cv Kaffeeblättern aus Guatemala.

[0021] Junges Blattgewebe mit einer Länge von unter 5 mm (entsprechend dem Stadium B3 (Frischknecht, P.M., Ulmer-Dufek, J. und Baumann, T.W. (1986) *Phytochemistry* 25:613) wurde von Bäumen gesammelt, die in der University of Hawaii Waimanalo Research Station, Oahu, Hawaii, gezüchtet wurden. Die Blätter wurden sofort in flüssigen Stickstoff (flüssigen N₂) eingetaucht und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Alle anschließenden Verfahren wurden bei 4°C durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist. Blattgewebe (150 g) wurde in einem Mörser mit Pistill unter flüssigem N₂ mazeriert und im noch gefrorenen Zustand in eine vorgekühlte Haushaltskaffeemühle überführt und mit einem kleinen Stück Trockeneis ca. 20 Sekunden gemahlen. Das Gewebepulver wurde in einen Becher mit 1,5 l eiskaltem 80%igen Aceton, 5 mM Thioharnstoff und 12,5 mM β-Mercaptoethanol gegeben. Nach dem Mischen auf einem Magnetrührer für 45 Minuten wurde das Gewebe durch Filtration unter Vakuum in einem Buchner-Trichter mit Whatman Nr. 1 Filterpapier zurückgewonnen. Das Gewebe wurde mit 2,5 l 80%igem eiskaltem Aceton gewaschen, das wie oben Thioharnstoff und β-Mercaptoethanol enthielt, 20 Minuten an der Luft getrocknet und dann 48 Stunden gefriergetrocknet.

[0022] Das resultierende Acetonpulver wurde in einem Mischer mit 400 ml Extraktionspuffer (EB) (0,1 M Pi-PES [pH 7,0], 0,5 mM Na₂EDTA, 0,5 mM Na₂EGTA, 5% Ascorbinsäure, 5 mM Dithiotreitol [DTT], 5 mM Thioharnstoff, 12 mM L-Cystein-HCl, 1 % Polyethylenglykol (PEG) 20.000, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF] und 20 g Polyvinyl-polypyrrolidon [PVPP]) homogenisiert. Die Aufschlämmung wurde 10 Minuten bei mittlerer Geschwindigkeit homogenisiert und dann in 250 ml Zentrifugenflaschen überführt und bei 23.000 × g 30 Minuten in einem GSA (Dupont-Sorvall) Rotor zentrifugiert.

[0023] Der erhaltene rohe Überstand von 350 ml wurde über 30 Minuten durch langsames Hinzufügen von 79,86 g AS Pulver unter Rühren in einem Becher, der von einem Eisbad umgeben war, auf 40% Ammoniumsulfat (AS) Sättigung gebracht. Das Gemisch wurde erneut in 250 ml Zentrifugenflaschen überführt und bei 23.000 × g 30 Minuten wie oben beschrieben zentrifugiert. Der erhaltene Überstand von 350 ml wurde in eine 40 ml Macro-Pep (Bio-Rad) Methyl hydrophobische Interaktionschromatographie (HIC) Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 ml/Minute geladen. Alle Säulenfraktionen wurden mit Absorption bei 280 nm auf Protein überwacht. Die HIC-Säule wurde mit Prä-Äquilibrierungspuffer gewaschen, der 1,7 M AS, 20 mM bis-tris-Propan (pH 6,8) und 5 mM DTT enthielt, bis eine Grundlinie in der Nähe von Null erreicht wurde. Die Säule wurde dann mit einem Puffer gestript, der 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT, 1 mM MgCl₂ enthielt. Die ersten 15 ml aus der Säule wurden verworfen und das verbleibende Eluat (200 ml) wurde unter Schwerkraft in eine 100 ml Affi-Gel blaue Affinitätsgel (100-200 Mesh, Bio-Rad) Säule geladen, bei der der Farbstoff Cibacron blue F3Ga kovalent an der Matrix befestigt war. Das Gel wurde mit 10-mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT, 1 MgCl₂ Ladepuffer voräquilibriert. Die Säule wurde gründlich mit diesem Ladepuffer gewaschen, bis sich die Grundlinie bei Null stabilisierte, und die gebundenen Proteine wurden mit einem Puffer eluiert, der 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT und 1,5 M Natriumchlorid (NaCl) enthielt.

[0024] Das Eluat (142 ml) der Affi-Gel Blue Gel Säule wurde durch langsames Hinzufügen von 31,8 g AS Pulver unter Rühren für 30 Minuten in einem Becher, der von einem Eisbad umgeben war, 1,7 M AS gemacht. Die Anschlämmung wurde in 250 ml Zentrifugenflaschen wie oben beschrieben 30 Minuten bei 23.000 × g zentrifugiert und der Überstand wurde in eine FPLC Phenyl-Sepharose Säule XK 26/20 (Pharmacia) bei 23°C geladen. Die Säule wurde mit einem Puffer voräquilibriert, der 20 mM tris-Propan (pH 6,8), 5 mM DTT und 1,7 M AS enthielt. Wenn sich eine Grundlinie in der Nähe von Null einstellte, wurden die Proteine aus der Säule in einem 40 Min umgekehrten Gefälle von 1,7 M AS bis 0 M AS bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/Minuten eluiert, wobei 1 Min Fraktionen gesammelt wurden. Der 0 M AS Elutionspuffer enthielt 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT und 1 mM MgCl₂.

[0025] Aktivitätsassays an den gesammelten Fraktionen wiesen darauf hin, dass der größte Teil der enzymatischen Aktivität für Xanthosin-N⁷-Methyltransferase in den Fraktionen 49 bis 54 konzentriert war. Diese Fraktionen wurden in ein Endvolumen von 30 ml zusammengefasst und dann in eine 6 ml ATP-Agarose Säule (Sigma Chemicals, A2767) durch Schwerkraft bei 4°C geladen. Die Säule wurde mit 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM

DTT und 1 mM MgCl₂ voräquilibriert. Nach Stabilisierung der Grundlinie wurde die Säule mit 20 ml Prä-Äquilibrierungspuffer mit 100 µM Xanthosin gestript und mit weiteren 40 ml Prä-Äquilibrierungspuffer gewaschen. Beide Säuleneluate wurden zusammengefasst und in eine Mono-P HR 5/20 FPLC (Pharmacia) Säule geladen, die mit 25 mM bis-tris (pH 6,0) und 9% Betain bei 23°C voräquilibriert war. Nach Stabilisierung der Grundlinie wurde die Säule mit 100 ml Polypuffer 74 (10 ml:90 ml H₂O, v:v) (pH 4,0) (Pharmacia) und 9% Betain bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Minute eluiert. Die Sammelrörchen enthielten 100 µl 0,5 M Tricin-Puffer (pH 7,0) und 50 mM DTT zu einer Endkonzentration von 1 ml 50 mM Tricin (pH 7,0) und 5 mM DTT in 1 Min-Fraktionen. Dadurch wurden die endgültigen pH-Bedingungen für die unter leicht saurem pH aus der Mono-P Säule eluierten Proteine stabilisiert. Die Hauptaktivität für Xanthosin-N⁷-Methyltransferase in Sammelrörchen ohne Tricin wurde in Fraktionen 15 und 16 des aus der Säule eluierenden Gradienten mit einem pH von 5,42 bzw. 5,35 gefunden. Es war wichtig, die Proteinproben zu keinem Zeitpunkt der Reinigung einzufrieren, weil dies eine erhebliche negative Auswirkung auf den Aktivitätszustand der Xanthosin-N⁷-Methyltransferase hatte.

B. Untersuchung der Enzymaktivität

[0026] Das 100 µl Standardassaygemisch enthielt 50 mM Tricin (pH 7,0), 1200 µM Xanthosin, 5 mM DTT, 7,5 µM S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin (SAM) (60 mCi/mmol; DuPont NEN) und 1 mM Na₂EDTA. Das Reaktionsgemisch (50 µl ohne Enzym) wurde 10 Minuten bei 25°C vorinkubiert und die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 50 µl Enzymlösung eingeleitet und bei 25°C 1 Stunde laufen gelassen. Am Ende der Inkubationszeit wurden 30 µl Aliquote der Reaktion entnommen und durch Hinzufügen von 8 µl 0,6 M Perchlorsäure (HClO₄) beendet. Der gleiche Vorgang erfolgte für Nullzeitkontrollen zum Nachweis echter Enzymaktivität. Dieses Gemisch wurde 5 Minuten in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und 19 µl des Überstands wurde mit 1,0 µl 33 mM 7-Methyl-Xanthosin gemischt. Diese Gemische wurden auf Whatman Nr. 1 Chromatographiepapier angefleckt und mit n-Butanol-Essigsäure-H₂O (n-BuOH-HOAc-H₂O) (4:1:1) entwickelt. Die Position von 7-Methylxanthosin wurde anhand seiner blauen Fluoreszenz bei Exposition gegenüber kurzwelligem UV-Licht bestimmt. Diese Region wurde aus den Chromatogrammen geschnitten und die Radioaktivität wurde durch Szintillationszählung mit 3 mL Scinti-verse Szintillationsflüssigkeit (Fisher Scientific) bestimmt. Die Zähleffizienz betrug 74,7%. Hintergrundstrahlung und unspezifische Strahlung, die in der 7-Methylxanthosin-Region der Nullzeitproben festgestellt wurde, wurde subtrahiert.

C. Identifikation des Reaktionsprodukts.

[0027] Die Methylierungsstelle auf dem Xanthinring wurde durch Hydrolyse des Zuckers aus dem methylierten Xanthosin-Reaktionsprodukt und Trennung in 4 verschiedenen Chromatographiesystemen identifiziert. Das Produkt aus zwei 100 µl Reaktionen, die wie oben beschrieben durchgeführt wurden, und das 6 µl 33 mM 7-Methylxanthosin als Träger enthielt, wurde als Band am Ursprung eines Whatman Nr.1 Papierchromatogramms aufgetragen. Das Chromatogramm wurde in n-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:1) entwickelt. Die Region des Chromatogramms, die dem methylierten Xanthosin entsprach, wurde wie oben nachgewiesen, in kleine Stücke geschnitten, in ein steriles Röhrchen gelegt und mit 35 µl entionisiertem Wasser bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Der Extrakt wurde durch 2 Schichten Miracloth und dann durch einen 0,22 µm Filter filtriert und anschließend lyophilisiert. Der getrocknete Extrakt wurde in 1,0 ml entionisiertem Wasser resuspendiert, in eine Glasaufschlussampulle verbracht und gefriergetrocknet. Die Probe wurde in 400 µl 1,0 M HCl resuspendiert und 1 Stunde bei 100°C inkubiert. Das Aufschlussprodukt wurde lyophilisiert, in 400 µl 3 mM 7-Methylxanthin resuspendiert und erneut gefriergetrocknet. Das Aufschlussprodukt wurde in 40 µl entionisiertem Wasser resuspendiert und 10 µl wurde in jeweils einem von vier verschiedenen Systemen chromatographiert. 1-Methylxanthin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin, 8-Methylxanthin, 7-Methylxanthosin, Xanthin und Xanthosin wurde auf jedem Chromatogramm zum Vergleich aufgenommen. Die folgenden Chromatographiesysteme wurden verwendet: Whatman Nr. 1 Papier, entwickelt in n-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:1) und C8 Dünnschichtplatten (Whatman KC18F), entwickelt entweder in Isoamylalkohol-H₂O-Acetonitril (41:4:5), Ethanol-H₂O (4:1) oder tert-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:1). Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme mit En³Hance (Dupont NEN) besprüht, erneut getrocknet und 30 Tage vorbelichtetem Fuji RX_{GC} Röntgenfilm bei -70°C ausgesetzt.

D. Identifikation von Proteinen durch Gelelektrophorese.

[0028] Wie oben erhaltene Extrakte wurden in eindimensionalen (1D) SDS-PAGE Minigels (Hauptgel: 12,5% Acrylamid, 0,8% Methylenbisacrylamid; Stapelgel: 7,5% Acrylamid, 0,21 % Methylenbisacrylamid) durch Mischen mit Laemmli Probenpuffer (Laemmli, UK, Nature 227:680 (1970)) und in zweidimensionalen (2D) Mini IEF/SDS-PAGE nach der modifizierten Methode von O'Farrell et al. (O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell P.H., Cell 12:1133 (1977)) verwendet. Die zweidimensionale Elektrophorese war durch Abscheiden von Proteinen mit 50 Volumen von 100% Ethanol für 1 Stunde und erneutes Auflösen der Proteine in isoelektrischem

Fokussier (IEF)-Probenpuffer mit 5% Ampholinen (1:1, v:v, pH 3-10:pH 5-7, LKB-Pharmacia) möglich. Das Verhältnis von ursprünglichem Proteinextrakt zum IEF Probenpuffer wurde bei mindestens 1:2 gehalten, um sicherzustellen, dass verbleibende Pufferbestandteile aus den Chromatographieschritten IEF nicht störten. Gleiche Gesamtproteinproben (<20 µg) wurde auf das basische Ende der vorfokussierten Röhrchengels (8,8% Acrylamid, 1,6% Methylenbisacrylamid) mit 5% Ampholinen wie oben aufgebracht. Die Gels wurden 10.000 V-Stunden plus weiteren 2 Stunden bei 1.000 V fokussiert. Blank fokussierte Gels wurden in 5 mm Abschnitte geschnitten und in 0,5 ml 100 mM CaCl₂ 24 Stunden inkubiert und der pH-Wert der Segmente wurde bestimmt. Aus dieser Analyse wurde der pH-Gradient des IEF-Gels auf einen Bereich von 4,4 bis 6,0 geschätzt.

[0029] Die Röhrchengels wurden für SDS-PAGE durch eine kurze H₂O-Wäsche gefolgt von drei Wäschchen (jeweils 10 Minuten) in heißem Laemmli Probenpuffer vorbereitet. Die Röhrchengels wurden auf die SDS-PAGE Gels gesetzt (Hauptgel: 12,5% Acrylamid, 0,8% Methylenbisacrylamid; Stapelgel: 7,5% Acrylamid, 0,21% Methylenbisacrylamid) und mit 3% Agarose in Laemmli Probenpuffer festgehalten. Proteine wurden durch Anfärbung mit Silber visualisiert. In 1D Gels wies die Mono-P Fraktion 16 mit der höchsten enzymatischen Aktivität nur auf Anwesenheit eines Dupletts unter Silberanfärbung hin ([Fig. 2](#)). Die Molekulargewichte dieser Proteine (kD) betrugen ca. 37,6 und 36,1 kD. In 2D Gels trennte sich jedes Gels in zwei Flecken. Der isoelektrische Punkt (IP) des saureren Flecks hatte einen durchschnittlichen Wert über mehrere Gels von 5,2, während der basischere Fleck einen Wert von 5,3 aufwies. Ihre Molekulargewichte lagen nun aber durchschnittlich bei 43,5 kD, wobei die oberen und unteren Peptide ineinander übergingen. Deshalb gibt es einen klaren Unterschied in kD zwischen 1D und 2D Gels. Die ähnliche Migration aller vier Peptide in Mono-P Säulen, 1D und 2D Gels weist darauf hin, dass es Isozyme sind, die nach der Translation modifiziert werden können. Alternativ können sie Produkte einer Genfamilie sein, die sich in ihrer Struktur leicht voneinander unterscheiden können, wodurch die unterschiedlichen beobachteten Isozyme entstehen.

E. Proteinsequenzierung

[0030] Die Gesamtproteinschätzung nach dem Verfahren von Lowry (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193:265 (1951)) für Fraktion 16 von Mono-P wies darauf hin, dass in der 1 ml Fraktion insgesamt 100 µg Protein vorlag. Unsere Erfahrung hat gezeigt, dass bei diesen niedrigen Proteinkonzentrationen die Lowry-Werte die tatsächlich vorliegende Menge eher überschätzen. Wir beschlossen, diesen Umstand durch Verwendung eines erheblichen Teils dieser Fraktion für die Proteinsequenzierung überzukompensieren. Ein 900 µl Teil der Mono-P Fraktion 16 entsprechend 90 µg, wurde in ein steriles 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gelegt und 216 µl 100% Trichloressigsäure (TCA) wurden hinzugefügt. Nach dem Mischen wurde das Röhrchen auf Eis über Nacht inkubiert und dann in einer Mikrozentrifuge 30 Minuten bei 4°C bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Aspiration entfernt und das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, wobei jeder Wäsche ein Zentrifugationsschritt folgte. Das Pellet wurde getrocknet, indem das Röhrchen in einen Speedvac gestellt und 1 Minuten unter Vakuum geschleudert wurde. Dem Präzipitat wurde 20 µl 2 × Laemmli Probenpuffer hinzugefügt. Es wurde dann 5 Minuten in einem Wasserbad gekocht und 1 Minute mikrozentrifugiert. Wenn die Röhrchentemperatur auf 23°C abgekühlt war, wurde die gesamte Menge in eine einzelne Bahn eines 12,5% 1D Gels geladen. Am Ende der Elektrophorese wurden die Proteine visualisiert, indem mit 0,1% Coomassie R-250 in wässrigem 50%igem Methanol und 10% Essigsäure (w:v:v) angefärbt und dann entfärbt wurde. Das gleiche Duplett von 37,6 und 36,1 kD, das in mit Silber angefärbten Gels beobachtet wurde, war auch in den mit Coomassie angefärbten Gels sichtbar. Die Region des Gels, die dieses Duplett enthielt, wurde ausgeschnitten und für die Proteinsequenzierung mit automatischer Edman Degradierung verwendet.

[0031] Die Sequenzierung erfolgte mit dem Standardprotokoll des Protein Structure Laboratory der Universität von Kalifornien, Davis. Das das Duplett enthaltende Gelstück wurde 4 Mal mit je 15 ml H₂O durch vorsichtiges Schwenken für 15 Minuten gewaschen, um die Essigsäure und SDS aus den vorherigen Schritten zu entfernen. Das Gelstück wurde mit einer Rasierklinge in 2 mm große Quadrate geschnitten und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Gelstücke wurden 2 Stunden in einem Speed-Vac dehydriert, bis sie nicht mehr am Röhrchen anhafteten. Als nächstes wurden 30 µl des Gelrehydrierungspuffers (0,1 M tri-HCl, pH 9,0, 0,05% SDS) hinzugefügt und der pH von 8,0 wurde durch Auftupfen von 0,5 µl auf pH-Papier überprüft. Das Aufschlussenzym Lys-C (0,2 µg) von Achromobacter lyticus (Wako) wurde hinzugefügt sowie zusätzlicher Rehydrierungspuffer, um die Gelstücke vollständig zu hydrieren und etwas Extrapuffer zurückzulassen. Das Gemisch wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand in eine frische sterile Mikrozentrifuge überführt und gelagert. Es wurde so viel Wasser zugefügt, dass die Gelstücke bedeckt waren, und diese wurden weitere 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und in derselben Mikrozentrifuge wie zuvor aufbewahrt. Dieser Wäscheschritt wurde noch einmal wiederholt, wobei die Überstände mit den vorherigen zwei Wäschchen kombiniert wurden. Die Gelstücke wurden dann mit einer Lösung aus 0,1%

Trifluoressigsäure (TFA) in 80% Acetonitril bedeckt und 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Der Überstand wurde gesammelt und dem Röhrchen mit allen vorherigen Überständen zugefügt. Die letzte Wäsche wurde noch einmal wiederholt und die zusammengefassten Überstände wurden in einem Speed-vac getrocknet.

[0032] Die getrockneten tryptischen Aufschlussprodukte wurden in 25 µl 6 M Guanidin-HCl, 0,4 M tris (pH 8,2) gelöst und der pH wurde durch Auftrupfen von 0,5 µl auf pH-Papier überprüft. Ein µl 450 mM DTT wurde zugefügt und das Aufschlussprodukt wurde 45 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 µl 500 mM Iodoacetamid zugefügt und weitere 15 Minuten bei 23°C inkubiert. Am Ende dieser Inkubation wurden 72 µl Wasser bis zu einer Endkonzentration von 1,5 M Guanidin und 0,1 M Tris zugefügt. Die Probe wurde dann 5 Minuten bei 14.000 U/Min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Überstand wurde sorgfältig in ein neues Mikrozentrifugenröhrrchen überführt. Dem abgeschiedenen Pellet wurden 25 µl 0,1 % TFA zugefügt und gewirbelt. Das Röhrchen wurde dann wie zuvor erneut zentrifugiert und der Überstand wurde dem des vorherigen Schritts zugefügt.

[0033] Die Spaltfragmente des tryptischen Aufschlusses wurden durch kapillare Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in einer C18 1 mm × 10 cm Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten über 90 Minuten von 5% Lösungsmittel A (0,1% TFA) auf 70% Lösungsmittel B (0,075% Acetonitril) bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 µl pro Minute gelöst. Der UV-Nachweis wurde auf 210 nm gestellt, wobei die Skala von 0 bis 0,1 A reichte. Die Wiedergewinnung einzelner Peaks wies auf die Anwesenheit von mehreren eindeutigen Peptiden wie in [Fig. 3](#) gezeigt hin. Als Kontrolle wurde ein Teil des ursprünglichen BDS-PAGE Gels, das kein Protein enthielt, durch den Aufschlussprozess geführt. Die in [Fig. 3](#) gezeigten gefüllten Peaks waren zwischen dieser Kontrolle und der Probe häufig. Die 3 Peaks A, B und C wurden einer automatischen Edman Degradierung unterworfen. Zwei der Peaks (A und B) ergaben überlappende einzigartige Sequenzen, die dasselbe Proteinfragment darstellten ([Fig. 2](#), Fragmente A und B). Der dritte Peak (C) ergab eine andere einzigartige Sequenz ([Fig. 2](#), Fragment C).

F. Synthese von Oligonucleotid-DNA-Primern für Xanthosin-N⁷-Methyltransferase.

[0034] Die chemische Synthese von 20 mer Primern für die beiden Aminosäuresequenzen, die durch die Aufschlussfragmente von Xanthosin-N⁷-Methyltransferase erhalten wurden, erfolgte durch The Midland Certified Reagent Company. Regionen der ausgewählten Fragmente zeigten minimale Nukleinsäure-Degeneration und wo möglich wurden Aminosäuren mit ausgedehnter genetischer Coderedundanz vermieden. Wenn dies nicht möglich war, wurde mehr als ein Primer für dasselbe Fragment synthetisiert, um alle möglichen alternativen Codonkombinationen einzuschließen. Ferner synthetisierten wir Primer auch so, dass sie zum kodierenden Strang der DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz kodieren, komplementär waren. Nukleotid-Degenerationen in der dritten Position von drei oder mehr wurden durch Verwendung von Inosin an diesen Stellen überwunden. Bei zweifacher Degeneration eines Nukleotids wurden beide Nukleotide in die Primersynthese aufgenommen ([Fig. 3](#)).

G. Extraktion von RNA aus jungen Kaffeeblättern im Stadium B3.

[0035] Alle Gegenstände, die bei der Extraktion verwendet wurden, waren steril, RNase-frei und durch Behandlung mit 0,1 % DEPC Wasser hergestellt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist.

[0036] Junge Kaffeepflanzen im Stadium B3 wurden gesammelt und wie oben beschrieben aufbewahrt. Die gesamte RNA wurde aus 100 g dieses jungen Blattgewebes isoliert, indem das Gewebe unter Flüssigstickstoff gemahlen und sofort in eine vorgekühlte Haushaltskaffeemühle überführt wurde. Das Gewebe wurde zusammen mit einem kleinen Stück Trockeneis zu einem Pulver gemahlen. Das Gewebe wurde dann zu 200 ml Homogenisierungspuffer aus 100 mM tris-HCl (pH 9,0), 200 mM NaCl, 15 mM Na₂EDTA, 0,5% Sarcosyl und frisch zugefügtem 100 mM β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Diesem Gemisch wurden 200 µl mit Puffer äquilibriertes Phenol und 40 µl eines Gemisches aus Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v:v) zugefügt. Das Gewebe wurde dann in einem Glasbecher in einem Eisbad für 2 Minuten bei hoher Geschwindigkeit in einem Polytron-Homogenisator homogenisiert. Unmittelbar nach der Homogenisierung wurden 14 µl 3M Natriumacetat (pH 4,0) hinzugefügt und durch Laufenlassen des Homogenisators für weitere 1 Minute gemischt. Das Homogenisat wurde dann 15 Minuten auf Eis gelagert und anschließend in zwei 250 µl Polypropylen-Zentrifugenröhrrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte in einem GSA (DuPont Sorvall) Rotor bei 16.000 × g für 10 Minuten. Die wässrige Phase (obere Schicht) wurde in ein neues 250 µl Polypropylen-Zentrifugenröhrrchen überführt und ein gleiches Volumen Isopropanol wurde hinzugefügt.

[0037] Dieses Gemisch wurde über Nacht bei –20°C inkubiert und dann bei 10.000 × g für 10 Minuten zentrifugiert, um die abgeschiedene RNA zu sammeln.

[0038] Das RNA Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 10.000 × g 5 Minuten erneut zentrifugiert. Der Ethanol wurde dekantiert und das Pellet wurde unter Vakuum 5 Minuten getrocknet. Das Pellet wurde in 15 ml mit DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Die RNA-Suspension wurde in ein steriles 40 ml Zentrifugenrörchen mit Schraubkappe überführt und das unlösliche Material wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 × g entfernt. Der Überstand wurde in ein neues 40 ml Zentrifugenrörchen mit Schraubkappe überführt und 5 ml 8M LiCl wurde bis zu einer Endkonzentration von 2M LiCl zugefügt. Das Rörchen wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und die RNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 14.000 × g gewonnen. Das RNA-Pellet wurde dann mit 70%igem Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei 10.000 × g zentrifugiert und kurz unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 15 ml mit DEPC behandeltem Wasser resuspendiert und 5 Minuten bei 10.000 × g zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Der Überstand wurde in vier sterile 1,5 ml Mikrozentrifugenrörchen überführt und auf Eis gelagert. Die Quantifizierung von 10 µl der gesamten RNA-Lösung in einem Shimadzu UV 160 U Spektrophotometer in einem 230 bis 330 nm Spektrum wies darauf hin, dass 42,8 mg RNA vorlag. Die Rörchen mit der RNA wurden bei –70°C aufbewahrt.

H. Reinigung von Poly (A+) mRNA aus Gesamt-RNA

[0039] Das gesamte RNA-Präparat wurde für Poly (A+) RNA (mRNA) mit dem PolyATtract II mRNA Isoliersystemkit (Promega Corporation) angereichert. Ein 600 µl Aliquot der Gesamt-RNA entsprechend 5,1 mg wurde einem Rörchen aus dem oben erwähnten Kit hinzugefügt und das Endvolumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf 2,43 ml gebracht. Nach dem Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten wurden 10 µl 50 pMol/ml biotinyliertes Oligo(dT) und 60 µl 20 × SSC (175,3 g/l NaCl, 88,2 g/l Natriumcitrat, pH 7,0) zugefügt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten langsam abgekühlt. Ein Aliquot der paramagnetischen Streptavidin-Teilchen wurde 3 Mal in 0,5 × SSC (1,5 µl pro Wäsche) gewaschen und in 0,5 ml 0,5 × SSC resuspendiert. Die RNA-Lösung mit dem biotinylierten Oligo(dT) wurde den gewaschenen paramagnetischen Streptavidin-Teilchen zugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die paramagnetischen Teilchen und die eingefangene RNA mit einem Magneten auf der Seite des Rörchens festgehalten. Der Überstand wurde entfernt und die Teilchen wurden vier Mal mit 0,1 × SSC gewaschen (1,5 ml/Wäsche). Die mRNA wurde gewonnen, indem die Teilchen in 1,0 ml RNasefreiem Wasser resuspendiert wurden und das Wasser entfernt wurde, während die Teilchen an der Seite des Rörchens festgehalten wurden. Das Wasser wurde in Portionen von jeweils 500 µl in zwei 1,5 ml sterile Mikrozentrifugationsrörchen überführt. Nach Zufügen von 1/10 des Volumens von 3M Natriumacetat (50 µl pro Rörchen) wurde die mRNA durch Präzipitation mit einem gleichen Volumen Isopropanol (550 µl pro Rörchen) gewonnen. Die Rörchen wurden über Nacht bei –20°C gelagert und dann 30 Minuten bei 14.000 U/Min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 75%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Ethanol wurde dekantiert und das Pellet wurde kurz unter Vakuum getrocknet. Die mRNA wurde in 60 µl mit DEPC behandeltem nucleasefreiem sterilen Wasser gelöst. Die Quantifizierung erfolgte an 15 µl der gelösten mRNA wie für die Gesamt-RNA beschrieben. Ca. 9,6 µg mRNA wurden aus 5 mg Gesamt-RNA gewonnen.

I. Konstruktion der cDNA-Bank

[0040] Erst- und Zweitstrang-cDNA wurde mit dem ZAP-cDNA Synthesekit (Stratagene) synthetisiert. Vier µg mRNA in 25 µl Wasser wurden 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Drei µl 100 mM Methylquecksilber wurden zugefügt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vier µl 700 mM β-Mercaptoethanol wurden zugefügt und die Inkubation wurde weitere 5 Minuten fortgesetzt. Der denaturierten mRNA wurden 5 µl 10 × Erststrang-Puffer, 5 µl 100 mM DTT, 3 µl Nucleotid-Gemisch (je 10 mM dATP, dGTP, TTP und 5-Methyl-dCTP), 2 µl 1,4 µg/ml Linker-Primer, (5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTT 3'), 1 µl RNase Block und 5 µl Wasser zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um den Primer an der mRNA zu befestigen, und 2,5 µl 20 µ/µl M-MuLV Reverse-Transkriptase wurden zugefügt. Fünf µl dieses Reaktionsgemisches wurden entfernt und in ein Rörchen mit 0,5 µl 800 Ci/mMol [α-³²P]dCTP (DuPont NEN) überführt. Beide Reaktionen wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das radioaktiv markierte Reaktionsgemisch wurde für eine spätere Gelanalyse bei –20°C eingefroren.

[0041] Dem 45 µl Reaktionsgemisch wurden 40 µl Zweitstrang-Puffer, 15 µl 100 mM DTT, 6 µl Nucleotid-Gemisch (10 mM dATP, dGTP, TTP und 26 mM dCTP), 268,3 µl Wasser und 2 µl 800 Ci/mMol [α-³²P]dCTP hinzugefügt. Nach dem Mischen wurden 4,5 µl 1 µ/µl RNase H und 19,2 µl 5,2 µ/µl zugefügt. E. coli DNA Polymerase I wurde zugefügt und die Reaktion wurde 2,5 Stunden bei 16°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 400 µl Phenol:Chloroform (1:1) extrahiert und die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt. Die wäss-

lige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde wie oben gewonnen. Die Doppelstrang-cDNA wurde durch Präzipitation über Nacht bei -20°C nach Zufügen von 33,3 µl 3M Natriumacetat und 867 µl 100% Ethanol gewonnen. Das Präzipitat wurde durch 60-minütige Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge bei 4°C gewonnen. Das Präzipitat wurde mit 1 µl 80%igem Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation bei Raumtemperatur bei voller Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge gewonnen. Der Überstand wurde entfernt, das Präzipitat wurde unter Vakuum getrocknet und in 45 µl Wasser gelöst. Drei µl der resuspendierten Doppelstrang-cDNA wurden entfernt und bis zur Analyse durch Gelelektrophorese bei -20°C eingefroren.

[0042] Den restlichen 42 µl der Doppelstrang-cDNA wurden 5 µl 10 × Klenow Puffer (Puffer Nr. 3), 2,5 µl 2,5 mM Nucleotide (dCTP, dGTP, dATP und TTP) und 0,5 µl 5 µg/ml Klenow-Fragment zugefügt. Nach 30 Minuten bei 37°C wurden 50 µl Wasser zugefügt und das Reaktionsgemisch wurde mit einem gleichen Volumen Phenol : Chloroform (1:1) und dann mit Chloroform wie oben extrahiert. Nach Zugabe von 7 µl 3M Natriumacetat und 226 µl 100%igem Ethanol wurde die Doppelstrang-DNA mit stumpfem Ende durch Ausfällen durch Inkubation auf Eis für 30 Minuten und Mikrozentrifugation bei voller Geschwindigkeit bei 4°C für 60 Minuten gewonnen. Das Pellet wurde mit 300 µl 80%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und wie oben getrocknet. Sieben µl der 0,4 µg/ml EcoRI Linker wurden der getrockneten cDNA zugefügt. Die Strukturen der EcoRI Linker sind wie folgt:
 5' AATTCGGCACGAG 3'
 – 3' GCCGTGCTC 5'

[0043] Nach Verwirbeln zur Resuspension der cDNA wurden 1 µl 10 × Ligationspuffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl 4 Weiss µg/ml T4 DNA Ligase zugefügt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 8°C inkubiert. Die Ligase wurde durch Erhitzen bei 70°C für 30 Minuten inaktiviert. Die 5' Enden der an der cDNA anhängenden EcoRI Linker wurden mit Polynukleotidkinase phosphoryliert. Ein µl von 10 × Puffer Nr. 3, 2 µl 10 mM ATP, 6 ml Wasser und 1 ml 10 µg/ml T4 Polynukleotidkinase wurden dem Ligationsreaktionsgemisch zugefügt. Nach 30 Minuten bei 37°C wurde das Kinasereaktionsgemisch durch Erhitzen bei 70°C für 30 Minuten inaktiviert.

[0044] Xhol „Klebeenden“, die dem 3' Ende der mRNA entsprachen, wurden am Ende der cDNA durch Aufschluss der Xhol Stelle im Linker-Primer erzeugt (siehe oben). 28 µl Xhol Puffer und 3 µl 40 µg/ml Xhol wurden der cDNA zugefügt und das Reaktionsgemisch wurde 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die cDNA mit den EcoRI Klebeenden am 5' Ende und den Xhol Klebeenden am 3' Ende (relativ zur ursprünglichen mRNA) wurde großenfraktioniert, indem sie wie folgt durch eine Sephadex 5-400 Spinsäule geführt wurde. 5 µl 10 × STE (100 mM tris (ph 7.0), 5 mM EDTA und 100 mM NaCl) wurden zugefügt und die cDNA wurde auf die Oberseite einer 1 µl Spritze mit Sephadex S-400 aufgebracht. Ein 500 ml Mikrozentrifugenröhrchen wurde auf den Boden der Spritze gelegt und die Säule wurde in ein Zentrifugenröhrchen gestellt und 2 Minuten bei 400 × g zentrifugiert. 60 µl 10 × STE wurden auf die Spritze gegeben, ein neues Mikrozentrifugenröhrchen wurde auf den Boden gestellt und die Säule wurde erneut wie zuvor zentrifugiert. Dieses Verfahren wurden wiederholt, bis sechs Fraktionen gesammelt worden waren.

[0045] Ca. 10% jeder Fraktion wurden einer Elektrophorese auf einem 1% Agarosegel unterworfen, um die Größenverteilung der cDNA in jeder Fraktion zu bestimmen. Der Rest jeder Fraktion wurde mit einem gleichen Volumen Phenol:Chloroform und dann Chloroform wie oben beschrieben extrahiert und dann durch Zugabe von 2 Volumen 100% Ethanol ausgefällt. Nach Inkubation bei -20°C über Nacht wurde die cDNA durch Zentrifugation bei 14.000 U/Min bei 4°C für 60 Minuten in einer Mikrozentrifuge gewonnen. Die cDNA wurde mit 200 µl 80%igem Ethanol wie oben beschrieben gewaschen und getrocknet. Die cDNA wurde in 5 µl Wasser gelöst und 0,5 µl Wasser wurde entnommen, um die cDNA-Konzentration fluorographisch mit einem Hoefer TKO 100 DNA Fluorometer zu bestimmen. Die restlichen 4,5 ml von Fraktion 1, die die größten cDNA-Moleküle enthielt, enthielten ca. 304 ng cDNA.

[0046] Einhundert ng cDNA aus Fraktion 1 wurden in 1 µg Uni-Zap, einem Bakteriophagen Lambda ZAP Vektor, der mit EcoRI und Xhol (Stratagene) aufgeschlossen wurde, ligiert. Fraktion 1 cDNA (2,0 ml) wurden 0,54 µl 10 × Ligationspuffer, 0,5 µl 10mM ATP, 1 µl 1 µg/ml Uni-Zap XR Vektor und 0,5 µl 4 Weiss µg/ml T4 DNA Ligase zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde ca. 44 Stunden bei 8°C inkubiert. Ein µl Aliquot des Ligationsreaktionsgemisches wurde einem Aliquot des „Freeze-Thaw“ Extraks aus dem Gigapack II Gold Verpackungskit (Stratagene) zugefügt. 15 µl sonischer Extrakt wurde zugefügt und der Inhalt wurde vorsichtig vermischt. Die Verpackung erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 2 Stunden wurden 500 µl SM Puffer (0,01 M tris-HCl pH 7,5, 0,01 M MgCl₂, 0,1 mM Na₂EDTA) und 20 µl Chloroform dem Packreaktionsgemisch zugefügt, Trümmer wurden durch eine kurze Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge entfernt und die verpackten Phagen wurden bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

J. Titrierung der Primärbank.

[0047] Ein μl der 500 μl Primärbank wurde mit 9 μl SM Puffer für eine 1/10 Verdünnung gemischt. Mit 1 μl dieser Verdünnung wurden 200 μl E. coli XL1-Blue MRF' Zellen, die bis zu einer Dichte entsprechend einem Außendurchmesser₆₀₀ = 0,5 gezüchtet worden waren, infiziert. Die Zellen wurden 15 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die infizierten Zellen wurden dann mit 2,5 ml 48°C Top Agar mit 15 μl 0,5 M IPTG und 50 μl 250 mg/ml X-gal gemischt und auf 100 \times 15 mm NZY Platten ausgestrichen (5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ \times 7H₂O, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NZ Amin [pH 7,5] und 15 g/l Difco Agar). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Hintergrund-Plaques waren blau, während die rekombinanten Plaques weiß waren. Der Durchschnitt von drei solcher Platten wies darauf hin, dass 1 μl der Primärbank 1.930 weiße rekombinante Plaques und 65 blaue Plaques produzierte. Die gesamte 500 μl Primärbank repräsentierte den Berechnungen nach 965.000 rekombinante Plaques.

K. Amplifikation der Primärbank

[0048] In 20 sterile Röhrchen wurden 300 μl E. coli XL1-Blue MRF' Zellen, die bis zu einem Außendurchmesser₆₀₀ = 0,5 gezüchtet worden waren, zugefügt. Jedem Röhrchen wurden 12,5 μl Primärbank und 90 μl SM Puffer zugefügt und die Röhrchen wurden 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 2 1/2 ml 48°C Top Agar wurden jedem Röhrchen zugefügt und die Zellen wurden auf 100 \times 15 mm NZY Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Fünf ml SM Puffer wurden jeder Platte zugefügt und die Platten wurden weitere 8 Stunden bei 4°C inkubiert. Der SM Puffer wurde mit einer sterilen Pipette gesammelt und in einem sterilen 250 ml Zentrifugenröhren aufbewahrt. Jede Platte wurde mit ca. 4 ml frischem SM Puffer gewaschen, der dem zuvor gesammelten Material zugefügt wurde. Chloroform wurde bis zu einem Endvolumen von 5% der amplifizierten Bank zugefügt. Die Bank wurde dann 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 10 Minuten bei 2.000 \times g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand (114,5 ml) wurde gewonnen und dann in eine sterile Polypropylenflasche überführt. Chloroform wurde bis zu einem Endvolumen von 0,3% zugefügt und die amplifizierte Bank wurde bei 4°C aufbewahrt.

L. Titration der amplifizierten Bank.

[0049] Ein μl einer 10⁻¹¹ Verdünnung der amplifizierten Bank in SM Puffer enthielt 192 rekombinante Plaques, wenn sie wie oben ausgestrichen wurde. Um 50.000 rekombinante Plaques zu erhalten, wurden 25 μl einer 10⁻⁷ Verdünnung verwendet, um 600 μl E. coli XL1-Blue MRF' Zellen, die bis zu einem Außendurchmesser₆₀₀ 0,5 gezüchtet worden waren, zu infizieren, die dann 15 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Diese Zellen wurden 6,5 ml 48°C Top Agar zugefügt und die Bank wurde auf 150 \times 15 mm NZY Platten ausgestrichen. Vier solche Platten entsprechend 200.000 rekombinanten Plaques wurden hergestellt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Platten wurde dann 4 Stunden bei 4°C gekühlt und anschließend für das DNA-Screening der Bank verwendet.

M. Amplifikation mit Polymerasekettenreaktion (PCR) von Xanthosin-N⁷-Methyltransferase cDNA.

[0050] Die Synthese der Erststrang-cDNA erfolgte wie im Stratagene-Protokoll oben beschrieben. Die beiden durch tryptischen Aufschluss erhaltenen einzigartigen Peptidsequenzen ermöglichen die Synthese der in [Fig. 4](#) gezeigten degenerierten Primer. Eine Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A., *Science* 239:487 (1988) zwischen Paaren dieser Primer (1-6, 2-6, 3-5 oder 4-5) mit 4 ng cDNA, 1 μl 20 μM Primer, je 0,5 μl 1 mM Deoxyribonucleotidtriphosphat, 1,5-MM MgCl₂, 0,3 μl Taq DNA Polymerase [5.000 μml], 2,5 μl 10 \times PCR Puffer [10 mM tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100] und steriles H₂O bis zu einem Endvolumen von 25 μl wurde durchgeführt. Die PCR Bedingungen waren 94°C für 4 Minuten [1 Cyclus]; 94°C für 1 Minute, 43°C für 1 Minute, 72°C für 1-Minute [35 Cyclen]; 72°C für 5 Minuten [1 Cyclus]. Die Reaktionen erfolgten in 500 μl sterilen Mikrozentrifugenröhren mit einem Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480. Nur die Primerkombination 1 und 6 führte zu einem einzelnen Produkt bei einer Glühtemperatur von 43°C. Das Produkt wurde durch Agarosegelektrophorese mit SeaPlaque Agarose (FMC) gemessen und enthielt ca. 750 Basenpaare. Eine handelsübliche 100 bp Leiter wurde als Größenmarker verwendet (Promega Corporation).

M. Klonen von kaffeespezifischem Xanthosin-N⁷-Methyltransferase-PCR-Genprodukt.

[0051] Dem mit Primer 1 und 6 ([Fig. 4](#)) in einer 50 μl PCR Reaktion erhaltenen 750 bp Fragment wurden 50 μl Chloroform und 100 μl steriles Wasser zugefügt. Das Gemisch wurde verwirbelt und dann in einer Mikrozentrifuge 2 Minuten bei 14.000 U/Min zentrifugiert. Die obere wässrige Schicht mit der DNA wurde entfernt und

in ein steriles Röhrchen überführt. Die Quantifizierung der Platte mit Ethidiumbromid wies auf das Vorliegen von ca. 5 ng von PCR-amplifizierter DNA/ μ l hin. Das PCR-Produkt wurde dann in einen TA Cloning Kit pCR II Vektor (Invitrogen Corporation) in einem 10 μ l Ligationsreaktionsgemisch mit 1 μ l 10 \times Ligationspuffer, 2 μ l pCR II Vektor (25 ng/ μ l), 3 μ l frischem PCR-Produkt (5 ng/ μ l), 1 μ l T4 DNA Ligase und 3 μ l sterilem Wasser ligiert. Das Ligationsreaktionsprodukt wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Ligationsreaktionsprodukte wurden 2 Minuten bei 14.000 U/Min zentrifugiert und auf Eis gelegt. Einem frisch angetauten Fläschchen mit *E. coli* XL1-Blue kompetenten Zellen wurden 2 μ l 0,5 M a-Mercaptoethanol zugefügt und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Zwei μ l des Ligationsreaktionsgemisches wurden in die Zellen pipettiert und die Zellen wurden vorsichtig mit der Pipettenspitze zum Vermischen gerührt. Das Fläschchen wurde dann 30 Minuten auf Eis inkubiert und exakt 30 Sekunden in einem 42°C Wärmeblock einem Hitzeschock unterzogen. Das Fläschchen wurde auf Eis gelegt. Nach 2 Minuten wurden 450 μ l steriles SOC Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 ml/l 250 mM KCl, 10 ml/l MgCl₂, 20 ml/l 1 M Glucose [pH 7.0] zugefügt. Das Fläschchen wurde dann bei 225 U/Min in einem rotierenden Schüttler 1 Stunde geschüttelt und dann auf Eis gelegt.

[0052] Die transformierten Zellen wurden durch Pipettieren von 50 μ l und/oder 200 μ l der Zellsuspension auf ein von zwei LB Platten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Difco Agar, pH 7,5) mit 50 μ g/ml Ampicillin und 40 μ g/ml X-Gal ausgestrichen. Die Platten wurden 20 Stunden bei 37°C inkubiert und dann 3 Stunden auf 4°C gebracht, um die Farbentwicklung zu ermöglichen. Sechs weiße Transformantenkolonien wurden auf Anwesenheit und Orientierung des PCR-Fragments untersucht.

N. Kochen von Plasmid Mini-Prep.

[0053] Jede Transformantenkolonie wurde in 5 ml steriler Nährbrühe (12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml/l Glycerol, 100 ml/l 10 \times TB Phosphat [0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄]), ergänzt mit 50 μ g/ml Ampicillin, gezüchtet. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C in einem rotierenden Schüttler inkubiert. Drei ml jeder Kolonie wurden in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrlchen überführt, jeweils 1 ml, und die durch die Zellen wurde durch Zentrifugieren bei 14.000 U/Min für 2 Minuten konzentriert. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen und das Zellpellet wurde möglichst trocken gelassen. Die Zellen wurden einmal mit 1 ml steriles H₂O gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 320 μ l STET Puffer (8% Saccharose, 0,5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Diesen Zellen wurde 32 μ l 10 mg/ml Lysozym in TE Puffer (10 ml/l 1 M tris-HCl pH 8,0, 2 ml/l 0,5 M EDTA pH 8,0) zugefügt und durch mehrmaliges Umdrehen des Röhrchens gemischt. Die Röhrchen wurden 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt und dann sofort auf Eis gelegt. Nach dem Abkühlen wurden sie 30 Minuten bei 14.000 U/Min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher aus jedem Röhrchen entfernt. Dem Überstand wurden 170 μ l 7,5 M NH₄OAc und 550 μ l eiskalter Isopropanol zugefügt und die DNA wurde über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die Röhrchen wurden 30 Minuten bei 14.000 U/Min und 4°C zentrifugiert und das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und 1 Minute in einem Speed-Vac getrocknet. Die DNA wurde in 50 μ l steriles H₂O mit 1 μ l 5 mg/ml RNase A resuspendiert.

O. Restriktionsaufschluss zur Entfernung des Einschubs aus pCR II Plasmid

[0054] Ein Reaktionsgemisch von 25 μ l wurde durch Zufügen von 15 μ l Plasmid mini-prep DNA, die wie oben erhalten wurde, 2,5 μ l Puffer H (90 mM tris-HCl [pH 7,5], 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl), 1 μ l EcoRI (8-12 μ / μ l) und 6,5 μ l steriles H₂O hergestellt. Das Gemisch wurde in einem gerüttelten Wasserbad für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann 1 Minute in einem Wasserbad gekocht. Die Röhrchen wurden 15 Sekunden bei 14.000 U/Min zentrifugiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu 10 μ l jedes Gemisches wurden 2 μ l Beladungsfarbstoff zugefügt und die Aufschlussprodukte wurden durch 1,5% Agarosegelektrophorese mit ultraroter Agarose (GibcoBRL) und einer 100 bp Leiter als Größenmarker (Promega Corporation) analysiert.

[0055] Nur eines der sechs Reaktionsgemische wies auf das Vorliegen eines aufgeschlossenen Einschubs von ca. 750 bp hin. Die dem Plasmid entsprechende ursprüngliche Bakterienkolonie mit dem 750 bp Xanthosin-N⁷-Methyltransferase-PCR-Produkt wurde in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml sterilem LB Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5) ergänzt mit 50 μ g/ml Ampicillin geimpft. Der Kolben wurde in einem Drehen-Schüttler bei 30°C über Nacht inkubiert. In einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrlchen wurden 18 ml des resultierenden Zellmediums durch Zentrifugation wie oben konzentriert.

[0056] Plasmid-DNA wurde mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit Verfahren (Qiagen Inc.) gereinigt. Das gewaschene Bakterienpellet wurde in 0,3 ml Puffer P1 mit der gelieferten RNase resuspendiert. Dazu wurden 0,3 ml alkalischer Lysepuffer P2 zugefügt, vorsichtig gemischt und für höchstens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nächsten 0,3 ml des gekühlten Puffers P3 wurden zugefügt und durch 6-maliges Umdrehen des

Röhrchens gemischt. Nach 10 Minuten auf Eis wurde der Extrakt bei 14.000 U/Min 15 Minuten in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und auf eine QIAGEN-Spitze 20 aufgebracht, die zuvor durch Aufbringen von 1 ml QBT Puffer durch Schwerkraft äquilibriert worden war. Der aufgebrachte Zellextrakt-Überstand konnte durch Schwerkraftströmung auch in das Harz der Säule fließen. Sobald der Fluss durch die Säule beendet war, wurde die QIAGEN-Spitze 20 4 Mal mit einem ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde durch Waschen der QIAGEN-Spitze 20 mit 0,8 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 0,7 Volumen (560 µl) Isopropanol bei Raumtemperatur ausgefällt. Das Röhrchen wurde sofort bei 14.000 U/Min 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde sorgfältig entfernt. Die ausgefällte DNA wurde mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, wie oben zentrifugiert und 5 Minuten an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl sterilem H₂O resuspendiert. UV-Spektrometrie wie oben beschrieben an 1 µl der DNA Resuspension wies darauf hin, dass 55 µg gereinigte rekombinante pCRII Plasmid DNA pro 100 µl vorlag.

[0057] Die automatische DNA-Sequenzierung des Einschubs im pCRII Plasmid vom 5' Ende erfolgte mit dem M13 Reverse Primer, der an eine Referenz in pCRII direkt neben der Stelle, an der das PCR Produkt eingefügt wurde, bindet. Die Sequenzierung erfolgte in der biotechnologischen Serviceeinrichtung der University of Hawaii. Das Sequenzierungsreaktionsgemisch enthielt 1 µg Plasmid-Matrize und 3,2 pmol M13 Primer. Die erhaltene Sequenz wies darauf hin, dass das PCR Produkt für die DNA-Sequenz der ersten 6 Aminosäuren der Peptidfragmente A und B ([Fig. 4](#)) kodierte, aus deren Sequenz die degenerierten DNA-Primer 1 und 2 ([Fig. 4](#)) bestanden. Darüber hinaus kodierte die Sequenz auch für die folgenden 7 Aminosäuren des Peptidfragments, deren DNA-Sequenz nicht bei der Konstruktion des Primers verwendet worden war. Tatsächlich wurde somit die DNA-Sequenz für das korrekte Protein geklont.

P. Herstellung einer willkürlich geprägten Sonde für das cDNA-Screening mit dem PCR-Produkt.

[0058] Zwei 25 µl Restriktionsaufschlüsse mit EcoR1 wurden an zwei 17,5 µl Aliquoten des gereinigten pCRII Plasmids wie oben beschrieben durchgeführt. Die Produkte wurden wie zuvor auf 1% Agarosegel getrennt und der 750 bp Einschub wurde aseptisch aus zwei Bahnen des Gels ausgeschnitten. Die Gelstücke mit einem Gewicht von 0,65 g wurden in ein steriles 40 ml Polypropylenrörchen überführt und einer Geneclean II Kit Reinigung (BIO 101, Inc.) unterworfen. Viereinhalb Volumen NaI (2,93 ml) Stammlösung wurden den Gelscheiben zugefügt. Die Hälfte des Volumens des Gel TBE Modifikators (325 µl) wurde zugefügt und das Röhrchen wurde 5 Minuten bei 45°C inkubiert. Dazu wurden 15 µl Glasmilchsuspension zugefügt und weitere 5 Minuten inkubiert. Der Glasmilch/DNA-Komplex wurde durch Zentrifugation bei 1.000 U/Min 10 Sekunden pelletiert und der Überstand wurde entfernt. Das Glasmilchpellet wurde 3 Mal mit 1 ml New Wash Lösung gewaschen und die DNA wurde mit 50 µl sterilem H₂O eluiert. Ethidiumbromid-Platten wiesen darauf hin, dass die DNA-Konzentration 10 ng/µl betrug.

[0059] Eine willkürlich geprägte Sonde wurde aus 30 ng (3 µl) der gereinigten DNA synthetisiert. Drei µl der DNA wurde 27 µl steriles Wasser zugefügt und die DNA wurde durch Erhitzen in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Dazu wurden die Bestandteile des Promega Corporations Prime-a-Gene Kit (10 µl 5 × Markierpuffer, 2 µl unmarkierte dNTP [jeweils 20 µM dCTP, dGTP, TTP], 2 µl 1 mg/ml acetyliertes BSA, 1 µl 5 µl Kleenow-Enzym) und 5 µl [α -³²P]dATP (50 µCi, 3.000 Ci/mmol; DuPont NEN) bis zu einem Endvolumen von 50 µl zugefügt und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M Na₂EDTA (20 mM Endkonzentration) beendet und 2 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt.

Q. Screening der amplifizierten Bank mit einer willkürlich geprägten Sonde

[0060] Die vier 150 × 15 mm NZY-Platten mit ca. 50.000 rekombinanten Klons pro Platte wurde auf 4°C gekühlt (Ausstreich- und Wachstumsbedingungen siehe oben) und die rekombinanten Plaques wurden angehoben, indem zunächst 132 mm Magna Nylon-Transfermembranen (MSI Corporation) auf 10 Sekunden mit 5 × SSC Puffer gesättigtem Chromatographiepapier vorgewiegt wurden. Die Membranen wurden 5 Minuten auf die Platten mit den rekombinanten Plaques gelegt, dann angehoben und mit der die Phagen enthaltenden Seite nach oben 2 Minuten auf Chromatographiepapier gelegt, das mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl gesättigt war. Die Membranen wurden durch Überführung auf Chromatographiepapier, das mit 0,5 M tris-HCl (pH 8,0) und 1,5 M NaCl gesättigt war, für 5 Minuten neutralisiert. Sie wurden dann 20 Sekunden auf Chromatographiepapier gelegt, das mit 2 × SSC Puffer, 0,2 M tris-HCl (pH 7,5) gesättigt war, und dann trocken getupft. Nach 1 Stunde Lufttrocknen wurde die DNA durch Exposition gegenüber 12.000 µJoules UV mit einem UV Stratalinker 1800 (Stratagene Corporation) mit den Membranen vernetzt. Die vier Membranen wurden bei 65°C 2 Stunden in 100 ml 6 × SSPE (52,2 g/l NaCl, 8,3 g/l NaH₂PO₄ × H₂O, 2,2 g/l Na₂EDTA [pH 7,4], 5 × Denhardt Lösung (1 g/l Ficoll, 1 g/l Polyvinylpyrrolidon, 1 g/l BSA [Pentaxfraktion V]), 0,5% SDS und 100 µg/ml denaturierte Herringssperma-DNA in einem Hybrid Mark II Hybridisierungsofen vorhybridisiert.

[0061] Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C für 12 Stunden in 10 ml 6 × SSPE, 0,5% SDS, 100 µg/ml pulverisierter/denaturierter Heringssperma-DNA und 52 µl 15 × 10⁶ dpm/ml der oben beschriebenen willkürlichen geprimten Sonde. Am Ende des Hybridisierungszeitraums wurde die Sonde entfernt und die Membranen wurden 30 Sekunden kurz mit 100 ml 65°C 2 × SSC mit 0,5% SDS gewaschen. Die Membranen wurden dann weitere 30 Minuten mit der gleichen Menge und der gleichen Konzentration frischem Puffer gewaschen. Die Membranen wurden zwei weiteren Wäschen mit jeweils 100 ml für 30 Minuten mit 65°C, 0,2 × SSC, 0,5% SDS unterworfen und dann in eine Zellophanhülle gewickelt und mit einem vorgeblitzten Fuji RX_{GCU} Röntgenfilm bei -70°C für 24 Stunden belichtet. Fünfzehn positive Klone wurden beobachtet. Diese Plaques wurden aufgenommen und in 1 ml SM Puffer mit 20 µl Chloroform (Phagenstamm) gelegt. Davon wurden 11 bis zum sekundären oder tertiären Screening aufbereitet, bis einzelne individuelle Plaques erhalten wurden.

R. Charakterisierung von Xanthosin-N⁷-Methyltransferase-cDNA-Klons

[0062] Die Größen der putativen Xanthosin-N⁷-Methyltransferase-cDNA-Klons wurden mit Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Primern bestimmt, die zu den T3 und T7 Promotern homolog sind, die auf dem Klonvektor vorliegen und die cDNA-Einschubstelle flankieren. Die Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion waren wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass der Cyclus wie folgt aussah: 35 Cyclen bei 95°C für 1 Minute, 50°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten. Die Analyse erfolgte mittels Agarosegelektrophorese wie zuvor. Die drei größten erhaltenen Klone wurden in vivo ausgeschnitten, indem in einem sterilen Röhrchen 200 µl Einzelplaque-Phagenstamm mit 200 µl frischen XL1-Blue MRF' Zellen, die bis zu einem Außendurchmesser₆₀₀ = 1,0 gezüchtet wurden, gemischt wurden. Diesem Gemisch wurde 1 µl ExAssist (Stratagene Corporation) Helperphage (> 1 × 10⁶ pfu/µl) zugefügt und die Röhrchen wurden 15-Minuten bei 37°C inkubiert. Drei ml sterile LB Brühe wurde zugefügt und die Inkubation wurde 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln fortgesetzt. Die Kulturen wurden in einem 70°C warmen Wasserbad 20 Minuten erhitzt und anschließend wurden die Röhrchen bei 1.000 × g 15 Minuten zentrifugiert. Ein ml des Überstands mit dem ausgeschnittenen pBluescript Phagemid, verpackt als filamentöser Phagenpartikel, wurde in ein steriles 1,5 ml Mikrozentrifugenröhren überführt und bei 4°C als Stammlösung aufbewahrt. 25 µl der Stammlösung wurden 200 µl E. coli Solar Zellen, die bis zu einem Außendurchmesser₆₀₀ = 1 gezüchtet worden waren, in einem Mikrozentrifugenröhren zugefügt. Nach Inkubation bei 37°C für 15 Minuten wurden die 200 µl Zellen auf 100 × 15 mm NZY Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, bis Kationen erschienen. Eine einzelne Kolonie wurde in 10 ml sterile LB Brühe mit 50 µg/ml Ampicillin geimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln gezüchtet. Die 10 ml Zellkultur wurden in einem 1,5 ml sterilen Mikrozentrifugenröhren konzentriert und die pelletierten Zellen wurden einer QIAGEN Plasmidreinigung wie oben beschrieben unterworfen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl steriles H₂O resuspendiert. Automatische DNA-Sequenzierungsreaktionen erfolgten durch Mischen von 8 µl dieser DNA-Probe (0,8 µg) mit 4 µl T3 oder T7 Sequenzierungsprimern (0,8 pmol/µl). Der Rest des Verfahrens war wie bereits beschrieben. Jede Sequenzierungsreaktion ergab ca. 350 Sequenzbasen. Die Sequenz ist in [Fig. 5](#) gezeigt. Die Aminosäuresequenz von Xanthosin-N⁷-Methyltransferase wie von der Basensequenz der cDNA vorhergesagt ist in [Fig. 6](#) gezeigt.

[0063] Die vorstehenden Beispiele sind nur zur Veranschaulichung bestimmt und sollten den Umfang der Erfindung der Anmelderin, die in den anhängenden Beispielen aufgeführt ist, nicht einschränken.

SEQUENCE LISTING

<110> University of Hawaii
<120> Purified proteins, recombinant DNA sequences and processes for producing caffeine free beverages
<130> J100054PCEP
<140> EP97919934.6
<141> 1997-03-24
<160> 12
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> X means undetermined
<400> 1

Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Xaa Gly
1 5 10 15

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Coffea arabica
<400> 2

Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr
1 5 10

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(18)
<223> N denotes inosine
<400> 3

atnaaytayg cntcnggngc
20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<223> N denotes inosine
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(18)
<223> N denotes inosine
<400> 4

atnaaytayg cnagyggngc
20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(18)
<223> N denotes inosine
<400> 5

cgnccngang cwtawttnat
20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(18)
<223> N denotes inosine
<400> 6

cgnccgctng cwtawttnat
20

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)

<223> X is either Thr or Asp
<400> 7

Gln Tyr Val Pro Cys Tyr Phe Xaa Phe Ile Asp Asp Gln Asp
1 5 10

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(12)
<223> N denotes inosine
<400> 8

cawtatgtnc cntgttattt
20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Coffea arabica
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(12)
<223> N denotes inosine
<400> 9

aawtawcang gnacwtattg
20

<210> 10
<211> 371
<212> PRT
<213> Coffea arabica
<400> 10

Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile Ile Asn Val
1 5 10 15

Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala Leu Gly Glu Gln Gln Val
20 25 30

Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn
35 40 45

Asn His Leu Asn Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile
50 55 60

Asp Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg Asn His
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp Ser Tyr Ile Pro Pro
85 90 95

Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala
100 105 110

Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp
115 120 125

Leu Phe Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile Ser
130 135 140

Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr Lys Glu Tyr Leu
145 150 155 160

Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn
 165 170 175

Asn Tyr Leu Leu Pro Glu Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro
 180 185 190

Arg Glu Phe Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 195 200 205

Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe Gly Leu Gly
 210 215 220

Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser Thr Asp Gly Asn Cys Val
 225 230 235 240

Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro
 245 250 255

Leu Val Asp Glu Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr
 260 265 270

Val Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro Ala Glu
 275 280 285

Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val Ser Ala Ala Val Ala
 290 295 300

Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln
 305 310 315 320

Tyr Tyr Phe Trp Asp Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala
 325 330 335

Tyr Ser Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala Asp
 340 345 350

Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys His Asp Lys Val
 355 360 365

Lys Ile Gln
 370

<210> 11
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Coffea arabica
 <220>
 <221> CDS
 <222> (53)..(1168)
 <223> coding sequence
 <400> 11

cctctgactt gctaaaccta ccattacctt tttcttcttg tcatctgcat tc atg gct

58

Met Ala

1

ttt gta gcc agg caa tgg ttt ctc cta tcc atc att aat gta gtg gtt

106

Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile Ile Asn Val Val Val

5

10

15

gtc tgt ttc ttg aaa cca ttt gcc cta ggc gaa caa cag gtc cct tgc

154

Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys

20

25

30

tac ttc att ttt gga gac tca caa gat gac aat ggc aac aat aat cac
202

Tyr Phe Ile Phe Gly Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His

35

40

45

50

ctg aac acc act gcc agg gca aat tat cca cct tac ggc att gat ttc
250

Leu Asn Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp Phe

55

60

65

cca gaa ggt cca act ggt cgc ttc acc aat ggt cga aat cat gca gac
 298
 Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg Asn His Ala Asp
 70 75 80

ttc att ggt gag ctc ctt gga ttt gac agc tac ata cct cca ttt gca
 346
 Phe Ile Glu Leu Leu Gly Phe Asp Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala
 85 90 95

aat aca aaa ggc cgg gat atc act aaa ggc att aat tat gct tcg gga
 394
 Asn Thr Lys Gly Arg Asp Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly
 100 105 110

gca tct gga att ctt gat cag acc ggt cgt cac ctg ggc gat ctc ttc
 442
 Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe
 115 120 125 130

agc ttc aac gaa caa ttg cac aat cac gag aga gca att tcg cgc atc
 490
 Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile Ser Arg Ile
 135 140 145

gtg cgg ttg att gga aac aga tct gca aca aaa gaa tat cta gcc aaa
 538
 Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr Lys Glu Tyr Leu Ala Lys
 150 155 160

tgt ctg tac act gtt gca ttg ggg aat aat gat tac atc aac aac tac
 586
 Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr
 165 170 175

ttg ttg cca gaa tat tat cct acc agc cac cta tat act cca aga gaa
 634
 Leu Leu Pro Glu Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu

180

185

190

ttt gcc agc ttg tta att agg cat tat tct cag caa cta cgg act ttg
 682

Phe Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg Thr Leu

195

200

205

210

tac aga ttg ggg gca aga aaa ata gcc gtt ttt ggg ctt ggt tgg ctt
 730

Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe Gly Leu Gly Trp Leu

215

220

225

ggc tgc ata cct gct gag tta tct aca gat ggt aac tgt gtg gat tct
 778

Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser

230

235

240

att aac gag gaa gtt ctg tta ttc aat gac aag ctc aag cca ctg gtt
 826

Ile Asn Glu Glu Val Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro Leu Val

245

250

255

gat gaa ctg aat acc gag tta agc ggt gca caa ttt ctt tat gta gat
 874

Asp Glu Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val Asp

260

265

270

gtg ata gca atc aat ttg aac aat tta tcc acc cct gca gaa att aca
 922

Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro Ala Glu Ile Thr

275

280

285

290

att ggc aat gca cca tgc tgc aac gtg tct gca gca gtt gct ggt gga
 970

Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly

295

300

305

cag tgt att cct ggg caa att ccc tgc agc aac agg aac caa tat tat
 1018
 Gln Cys Ile Pro Gly Gln Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr

310 315 320

ttt tgg gat gat ttc cat ccc agt gaa gta gtc aat gaa gca tat tca
 1066
 Phe Trp Asp Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser

325 330 335

aga tta gca tat tct gcg tta tcc tca tta ctt gat gct gat cct ctt
 1114
 Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala Asp Pro Leu

340 345 350

gcc att ggc ggc cta aca ggc aaa aac tgt cat gat aaa gtg aag ata
 1162
 Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys His Asp Lys Val Lys Ile

355 360 365 370

caa tag actgtatcta tgtgtcccat gatatttcta tattccaagt ttccgacaag
 1218

Gln

tcaaactcaa tgtaataaaa cttgagagtc cgaatgtgct agtgtgatgt tatctcctca
 1278

atggaaacaa tatgttatca ttaatctcag actatttata attactatta aaaaaaaaaa
 1338

aaaaaaaaaa
 1347

<210> 12
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Coffea arabica
 <400> 12

Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile Ile Asn Val
 1 5 10 15

Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala Leu Gly Glu Gln Gln Val
 20 25 30

Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn
 35 40 45

Asn His Leu Asn Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile
 50 55 60

Asp Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg Asn His
 65 70 75 80

Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp Ser Tyr Ile Pro Pro
 85 90 95

Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala
 100 105 110

Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp
 115 120 125

Leu Phe Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile Ser
 130 135 140

Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr Lys Glu Tyr Leu
 145 150 155 160

Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn
 165 170 175

Asn Tyr Leu Leu Pro Glu Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro
 180 185 190

Arg Glu Phe Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 195 200 205

Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe Gly Leu Gly
 210 215 220

Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser Thr Asp Gly Asn Cys Val
 225 230 235 240

* Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro
 245 250 255

Leu Val Asp Glu Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr
 260 265 270

Val Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro Ala Glu
 275 280 285

Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val Ser Ala Ala Val Ala
 290 295 300

Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln
 305 310 315 320

Tyr Tyr Phe Trp Asp Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala
 325 330 335

Tyr Ser Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala Asp
 340 345 350

Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys His Asp Lys Val
 355 360 365

Lys Ile Gln
 370

Patentansprüche

1. Im Wesentlichen reine Xanthosin-N⁷-methyltransferase unter Verwendung von S-Adenosylmethionin als ein Substrat charakterisiert durch tryptische Fragmente A, B oder C gemäß der folgenden Formeln:

Fragment A. — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln — Gly

Fragment B. — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr

Fragment C. — Gln Tyr Val Pro Cys Tyr Phe ^{Thr} Phe Ile Asp (Asp) (Gln) Asp

2. Transferase nach Anspruch 1, im Wesentlichen bestehend aus der Aminosäuresequenz gemäß [Fig. 6](#).

3. Genetisch veränderte Kaffeepflanze, dadurch gekennzeichnet, dass die Veränderung auf der Transformation mit einer DNA-Sequenz beruht, die die Synthese von Xanthosin-N⁷-methyltransferase gemäß Anspruch 1 oder 2 unterdrückt.

4. Genetisch veränderte Frucht oder Bohne der Kaffeepflanze, welche sich von der Pflanze nach Anspruch 3 ableitet, enthaltend ein DNA-Molekül, welches die Synthese von Xanthosin-N⁷-methyltransferase gemäß Anspruch 1 oder 2 unterdrückt.

5. Genetisch veränderte Kaffeepflanze, Frucht oder Bohne der Pflanze enthaltend ein DNA-Molekül, das bei der Transkription für mRNA codiert, welches gegensinnig (antisense) zur mRNA vorliegt, welche bei der Expression für Xanthosin-N⁷-methyltransferase gemäß Anspruch 1 oder 2 codiert.

6. Im Wesentlichen reine DNA-Sequenz, welche bei der Expression für Xanthosin-N⁷-methyltransferase codiert, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus

a) einer Sequenz gemäß [Fig. 5](#):

b) DNA-Sequenzen, welche zur Sequenz gemäß [Fig. 5](#) hybridisieren, wobei besagte hybridisierende Sequenzen im Wesentlichen aus Sequenzen bestehen, welche komplementär zur Sequenz nach [Fig. 5](#) sind; und

c) DNA-Sequenzen, welche bezüglich der Sequenz gemäß [Fig. 5](#) degeneriert sind.

7. DNA nach Anspruch 6, welche ein Kloniergehikel ist.

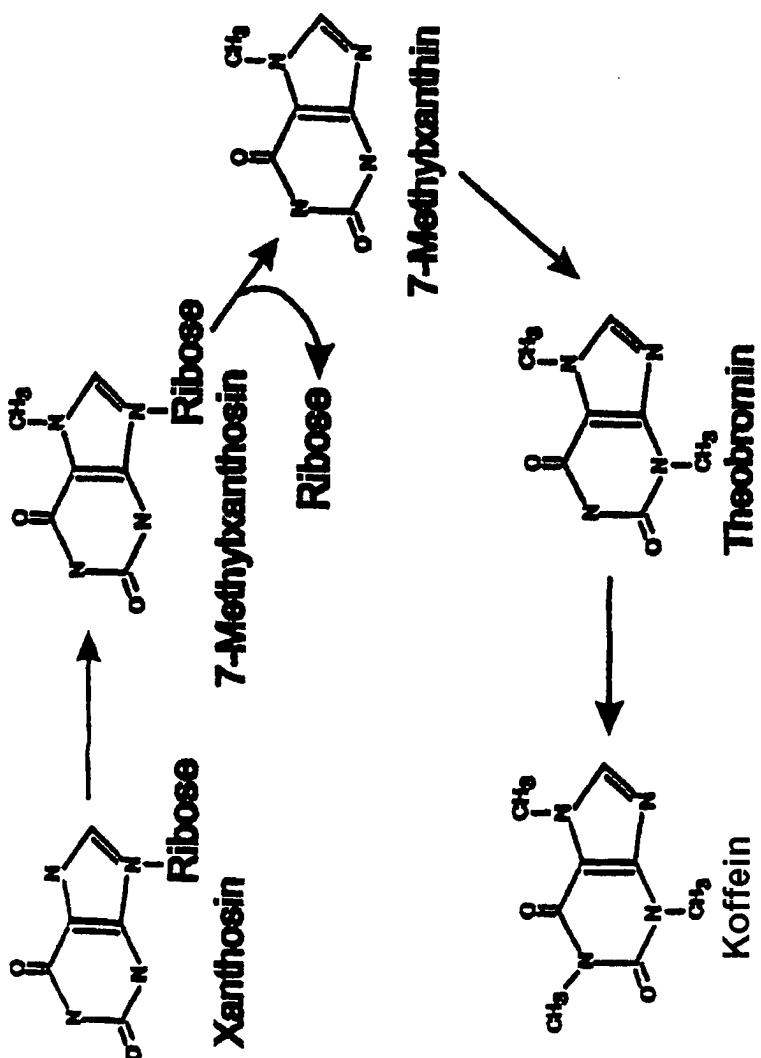
8. Verfahren zur Herstellung von Kaffeebohnen, welche frei sind von Koffein, umfassend:

a) Transformieren der Kaffeepflanzen mit einer DNA-Sequenz, die entweder gegensinnig zu einer zweiten DNA-Sequenz ist, oder welche bei der Transkription für eine mRNA codiert, die gegensinnig zu einer zweiten DNA-Sequenz ist, wobei besagte zweite DNA-Sequenz entweder die DNA-Sequenz gemäß [Fig. 5](#) ist oder eine DNA-Sequenz, welche bei der Expression für eine Proteinsequenz gemäß [Fig. 6](#) codiert; und gegebenenfalls

b) Ernten der Frucht von den transformierten Kaffeepflanzen.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

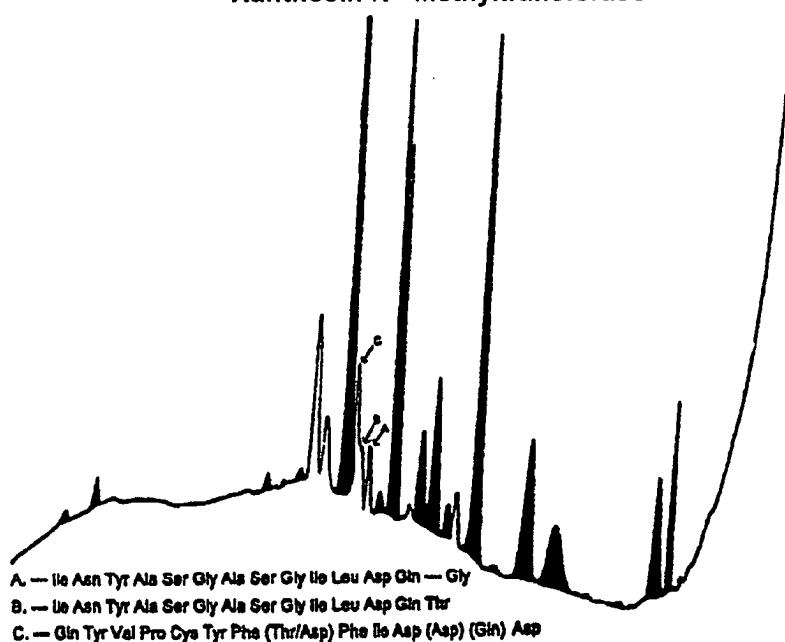
Figur 1. Koffein-Biosyntheseweg



**Figur 2. Polyacrylamidgel von gereinigter
Xanthosin-N⁷-Methyltransferase**

94 kD •
67 kD •
43 kD • 
30 kD •
14.4 kD •

Figur 3. HPLC-Trennung des tryptischen Aufschlussprodukts von Xanthosin-N⁷-Methyltransferase



Figur 4. Aus Peptiden synthetisierte Oligonucleotide

Fragment A. --- Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln — Gly

Fragment B. — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr

Primer 1 5'ATI AA^G TAC GCI TCI GGI GC

Primer 2 5'ATI AA^G TAC GCI AG^G GGI GC

Primer 3 3'TAI TT^G AT^G CCGI AGI CCI GC

Primer 4 3'TAI TT^G AT^G CCGI TC^G CCI GC

Fragment C. — Gln Tyr Val Pro Cys Tyr Phe ^{Thr}_{Asp} Phe Ile Asp (Asp) (Gln) Asp

Primer 5 5'CAG^G TAT GTI CCI TGT TAT TT

Primer 6 3'GTT AT^G CAI GGI AC^G AT^G AA

FIGUR 5

1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
 51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGTA
 101 GTGGTTGTCT GTTTCTTGAA ACCATTTGCC CTAGGCGAAC AACAGGTCCC
 151 TTGCTACTTC ATTTTGGAG ACTCACAAGA TGACAATGCC AACAAATAATC
 201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAAATTATC CACCTTACGG CATTGATTTC
 251 CCAGAAGGTC CAACTGGTGC CTTCACCAAT GGTCGAAATC ATGCAGACTT
 301 CATTGGTGAG CTCCCTGGAT TTGACAGCTA CATAACCTCCA TTTGCAAATA
 351 CAAAAGGCCG GGATATCACT AAAGGCATTA ATTATGCTTC GGGAGCATCT
 401 GGAATTCTTG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GGCGATCTCT TCAGCTTC
 451 CGAACAAATTG CACAATCACG AGAGAGCAAT TTGCGCCTAC GTGCCGTTGA
 501 TTGGAAACAG ATCTGCAACA AAAGAAATATC TAGCCAAATG TCTGTACACT
 551 GTTGCATTGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
 601 TTATCCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTGCCC AGCTTGTAA
 651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GGGGGCAAGA
 701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GGCTGCATAC CTGCTGAGTT
 751 ATCTACAGAT GGTAACGTG TGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTTAT
 801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAC
 851 GGTGCACAAT TTCTTTATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATTT
 901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCAACGTGT
 951 CTGCAAGCAGT TGCTGGTGA CAGTGTATTC CTGGGCAAAT TCCCTGCAGC
 1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
 1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TCGGTTATCC TCATTACTTG
 1101 ATGCTGATCC TCTTGCCTT GGCGGCCTAA CAGGCAAAAA CTGTCATGAT
 1151 AAAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTCTATA
 1201 TTCCAAGTTT CCGACAGTC AACTCAATG TAATAAAACT TGAGAGTCCG
 1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GCAAACAATA TGTTATCATT
 1301 AATCTCAGAC TATTATAAT TACTATTAAA AAAAAAAA AAAAAAA

FIGUR 6

1 Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile
 14 Ile Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala
 27 Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly
 40 Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn
 53 Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp
 66 Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg
 79 Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp
 92 Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp
 105 Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly
 118 Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe
 131 Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile
 144 Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr
 157 Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu
 170 Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu Pro Glu
 183 Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 196 Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 209 Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe
 222 Gly Leu Gly Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser
 235 Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val
 248 Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro Leu Val Asp Glu
 261 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val
 274 Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro
 287 Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val
 300 Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln
 313 Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp
 326 Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser
 339 Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala
 352 Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys
 365 His Asp Lys Val Lys Ile Gln