

dann bewältigt werden können, wenn zukünftig strengere Maßstäbe an die Originalität und die Genauigkeit aufzunehmender Befunde angelegt werden.

An der Schaffung auch eines computerisierten „Information Retrievals“ im Beilstein wird gegenwärtig gearbeitet. Hierbei wird auch die Frage mit einbezogen, inwieweit eine für den Beilstein-Benutzer sinnvolle Querbeziehung zu anderen, bereits bestehenden computerorientierten Chemie-Informationssystemen geschaffen werden kann und soll.

Aber auch bei verstärkter Nutzung der EDV in der wissenschaftlichen Dokumentation und Information wird sich an der hier geschilderten Bedeutung einer kritischen Sichtung nichts ändern. Vielmehr wird angesichts der zunehmenden Menge an Informationen über kurz oder lang auch bei der Einspeicherung von Daten in computerabfragbare Informationssysteme eine vorherige kritische Wertung an Bedeutung gewinnen, da nur so eine Begrenzung der anderenfalls unübersehbaren Datenmengen möglich ist. Zu beachten ist dabei, daß diese kritische Wertung immer den Fachwissenschaftler mit entsprechender Ausbildung erfordert, denn nur er vermag die Voraussetzungen und Kriterien für die Aufnahme von Daten zu verwirklichen.

Da viele der genannten Bewertungskriterien, mutatis mutandis, sicherlich weit über den hier diskutierten Bereich der Chemie hinaus Bedeutung haben, stellt das Verfahren der kritischen Sichtung generell auch für andere wissenschaftliche Disziplinen eine Möglichkeit dar, die gegenwärtige (und zukünftige) Informationsflut in geordnete Bahnen zu lenken.

Eingegangen am 16. März 1981 [A 386]

- [1] R. Luckenbach, J. Sunkel, *Naturwissenschaften* 68, 53 (1981).
- [2] R. Luckenbach, *Chem. Unserer Zeit* 15, 46 (1981).
- [3] D. A. O'Sullivan, *Chem. Eng. News* 59 (20), 21 (1981).
- [4] K.-C. Buschbeck, W. Lippert, E. Ühlein, *Naturwissenschaften* 55, 379 (1968).
- [5] CAS Today, American Chemical Society, Columbus, Ohio 1980.
- [6] a) S. A. Goudsmit, *Phys. Today* 19, 52 (1966); b) R. Abbel, *Nachr. Dok.* 21, 95 (1970).
- [7] J. P. Phillips, *Chymia* 11, 89 (1966).
- [8] O. Krätz: Beilstein-Erlenmeyer, Briefe, Neue Münchener Beiträge zur Geschichte der Medizin und Naturwissenschaften, Naturwissenschafts-historische Reihe Bd. 2, Werner Fritsch, München 1972.
- [9] *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 28, 501 (1980).
- [10] E. Ühlein, *Nachr. Dok. Beih.* 14 (1966).
- [11] a) Kennen Sie Beilstein? Erläuterungen zu Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie, Springer-Verlag, Berlin 1979; b) R. Luckenbach, R. Ecker, E. Hoffmann, J. Sunkel, noch unveröffentlicht.
- [12] F. Beilstein: Handbuch der Organischen Chemie, 1. Aufl., L. Voss-Verlag, Hamburg und Leipzig 1881.
- [13] G. Kortüm, W. Vogel, K. Andrusow: Dissoziationskonstanten organi-scher Säuren in wäßriger Lösung, Butterworths, London 1961, S. 191 ff.

## Zerlegung und Rekonstruktion von Genen und Chromosomen (Nobel-Vortrag)<sup>[\*\*]</sup>

Von Paul Berg<sup>[\*]</sup>

### 1. Einleitung

*“Although we are sure not to know everything and rather likely not to know very much, we can know anything that is known to man, and may, with luck and sweat, even find out some things that have not before been known to man.”*

J. Robert Oppenheimer

Obwohl das Konzept, daß Gene erbliche Merkmale weitergeben und kontrollieren, schon seit Anfang des Jahrhunderts bekannt ist, vereitelte die Unkenntnis ihrer chemischen Natur die meisten Untersuchungen über ihre Funktion. Das änderte sich in der Folge einiger dramatischer Entwicklungen in den Jahren zwischen 1940 und 1970. Zuerst stützten die Ergebnisse der Arbeiten von *Beadle* und *Tatum*<sup>[1-3]</sup> sehr stark die ältere<sup>[4]</sup> und weit verbreitete Annahme, daß Gene die Bildung von Proteinen (Enzymen) kontrollieren; die Hypothese „ein Gen – ein Protein“ intensivierte die Suche nach der chemischen

Grundlage eines Gens. Einen ersten Hinweis brachte die Entdeckung von *Avery* et al.<sup>[5]</sup> und später von *Hershey* und *Chase*<sup>[6]</sup>, daß die genetische Information in der chemischen Struktur der Desoxyribonucleinsäure (DNA) enthalten ist. Die Aufklärung der molekularen Struktur der DNA – die dreidimensionale Anordnung der polymerisierten Nucleotiduntereinheiten – durch *Watson* und *Crick*<sup>[7]</sup> ent-hüllte nicht nur den allgemeinen Aufbau von Genstrukturen, sondern offenbarte auch die Art und Weise der Genreplikation und -funktion. Plötzlich waren Gene nicht mehr nur begriffliche und statistische Größen, sie hatten vielmehr eine definierte chemische Identität erlangt. Die Gen-Chemie (genetic chemistry) oder – wie sie häufig genannt wird – die Molekularbiologie war geboren.

Bis vor wenigen Jahren wurde ein großer Teil der Detailkenntnis der molekularen Genstruktur, -organisation und -funktion aus Untersuchungen an prokaryotischen Mikroorganismen und den sie befallenden Viren gewonnen, speziell aus *Escherichia coli* sowie den T- und λ-Bakte-riophagen. Diese wurden von den Molekularbiologen wegen ihrer sehr hohen Vermehrungsrate unter kontrollierbaren Laborbedingungen bevorzugt. Die Kartierung und Manipulation ihrer relativ kleinen Genome wurde zur Routine, nachdem man begonnen hatte, einige der Mittel des

[\*] Prof. Dr. P. Berg

Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine  
Stanford, California 94305 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1981. – Wir danken der Nobel-Stif-tung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

natürlichen Genaustausches zu nutzen, die für diese Organismen und Phagen charakteristisch sind. Es wurden definierte DNA-Moleküle mit einem Gen oder einigen wenigen Genen in genügender Menge und Reinheit isoliert, um die ausführliche Charakterisierung ihrer Nucleotidsequenz und ihrer Chromosomenorganisation zu ermöglichen. Weiter lieferten diese isolierten genetischen Elemente die Modelle, Substrate und Reagentien für die Untersuchung vieler grundsätzlicher Probleme: die chemische Grundlage des genetischen Codes, Mutagenese, Mechanismus der DNA- und Chromosomenreplikation, Details der Genexpression und -regulation.

Die erstaunlichen Erfolge, die bei der Aufklärung der Gen-Chemie von Prokaryoten während der Jahre 1950–1970 erzielt wurden, waren gleichzeitig begeisternd und herausfordernd. Andere Fachkollegen und ich, wir fragten uns, ob die komplexeren Genstrukturen eukaryotischer Organismen – besonders in Säugetierzellen und menschlichen Zellen – analog arbeiten. War für Zelldifferenzierung und interzelluläre Kommunikation – beides charakteristische Merkmale multizellulärer Organismen – eine andere Genom-Struktur, -Organisation, -Funktion und -Regulation erforderlich? Gab es nur Variationen des Prokaryoten-Themas, oder gab es ganz neue Prinzipien, die bei der Erforschung der Gen-Chemie höherer Organismen zu entdecken waren? Es galt auch hier zu suchen, um zu finden.

## 2. Das Minichromosom von SV40

Irgendwann 1965/66 lernte ich *Renato Dulbeccos* Arbeit über das neu entdeckte Polyoma-Virus kennen. Die wachsende Verfeinerung der Methoden zur Kultivierung von Tierzellen ermöglichte es *Dulbecco et al.*, den Wachstumszyklus des Virus *in vitro* zu verfolgen und zu quantifizieren<sup>[8]</sup>. Besonders wichtig war die Entdeckung, daß das gesamte Virus-Genom aus einem einzigen, relativ kleinen, circulären DNA-Molekül besteht, das nur etwa fünf bis acht Gene enthalten konnte<sup>[9]</sup>. Die Ähnlichkeit zwischen dem Lebenszyklus von Polyoma und dem bestimmter Bakteriophagen beschäftigte mich. Einerseits ähnelte Polyoma lytischen Bakteriophagen darin, daß er sich vegetativ vermehren, seinen Wirt töten und eine große Zahl an Nachkommen erzeugen kann<sup>[8]</sup>. Andererseits bestand auch verblüffende Ähnlichkeit mit lysogenen Bakteriophagen, da manche Infektionen tumorige Zellen hervorbrachten<sup>[10, 11]</sup>. Der Erwerb neuer morphologischer Eigenschaften und Wachstumscharakteristika sowie bestimmter virusspezifischer Eigenschaften ließ vermuten, daß Tumorgenese und Zelltransformation ein Ergebnis der kovalenten Integration viraler DNA in die chromosomale DNA der Zelle ist, und daß die Störung der Kontrolle des Zellwachstums durch die Expression viraler Gene hervorgerufen wird<sup>[12, 13]</sup>.

Diese Entdeckungen und Vermutungen sowie der Wunsch, ein experimentelles Modell zu finden, mit dem der Mechanismus der Genexpression und -regulation in Säugetieren untersucht werden konnte, veranlaßten mich, ein Jahr („sabbatical leave“) in *Dulbeccos* Labor am Salk Institute zu verbringen (1967/68). Die Arbeit und die wertvollen Diskussionen während dieser Zeit<sup>[14]</sup> bekräftigten

meine Überzeugung, daß mit dem Tumor-Virus interessante Eigenschaften der Gen-Chemie von Säugetieren aufgedeckt werden konnten.

Als ich nach Stanford zurückkehrte, bewogen mich technische Gründe, unser eigenes Forschungsprogramm mit dem verwandten Virus SV40 aufzunehmen. SV40-Virionen sind fast sphärische Partikel, deren Capsomere icosaedrische Symmetrie haben (Abb. 1, oben links). Die Virionen enthalten drei viral codierte Polypeptide und ein doppelsträngiges, circuläres DNA-Molekül (Abb. 1, oben rechts), das normalerweise mit den vier Histonen H2a, H2b, H3 und H4 als kondensierte (Abb. 1, unten links) oder perl schnurartige (Abb. 1, unten rechts), chromatin-ähnliche Struktur vorkommt. Die DNA von SV40 enthält 5243 Nucleotidpaare (5.24 kbp, 1 kbp = 1000 Basenpaare), deren vollständige Sequenz von *S. Weissmann et al.*<sup>[15]</sup> und *W. Fiers et al.*<sup>[16]</sup> aufgeklärt wurde. In dieser Nucleotid-Sequenz ist die Information für fünf (oder möglicherweise sechs) Proteine festgelegt. Drei dieser Proteine kommen im reifen Virion vor, und zwar wahrscheinlich als Komponenten des Capsids; eines davon ist jedoch möglicherweise mit der DNA assoziiert und übernimmt eine regulatorische Funktion<sup>[17]</sup>. Von den beiden Proteinen, die in der Sequenz codiert sind und nicht im Virion vorkommen, ist eines im Zellkern lokalisiert (großes T-Antigen) und übernimmt spezielle Funktionen während der viralen DNA-Replikation und Transformation; das andere wurde im Cytoplasma gefunden (kleines t-Antigen), es vergrößert die Effizienz der Zelltransformation<sup>[18]</sup>. Über andere Proteine, die strukturell dem großen T-Antigen ähneln, wurden Vermutungen geäußert, ihre genauen Strukturen und Funktionen sind jedoch unklar.

Eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der strukturellen und genetischen Organisation des SV40-Genoms

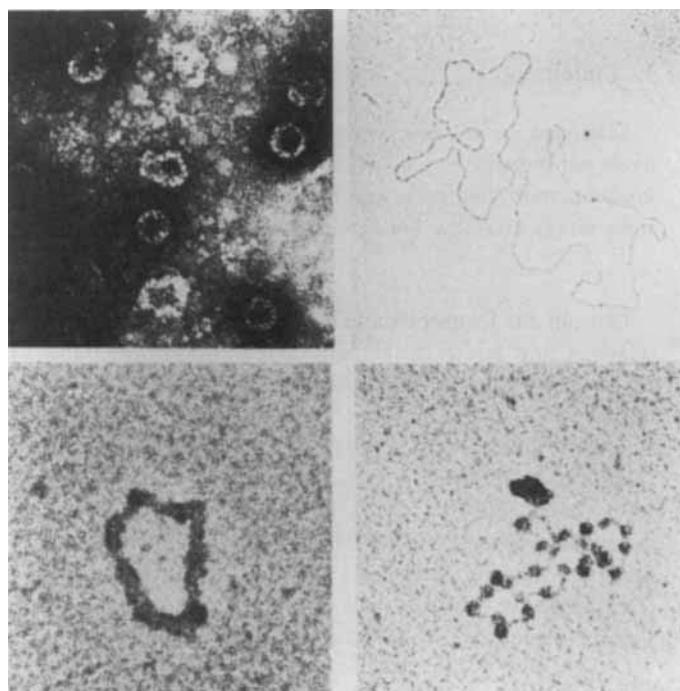


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SV40-Virionen (oben links), von SV40-DNA (oben rechts), von „kondensierten“ SV40-Minichromosomen (unten links) und von „entfaltet-perlschnurartigen“ („relaxed-bead“) SV40-Minichromosomen (unten rechts); Photographie von *J. Griffith*.

spielten Restriktionsendonucleasen<sup>[19, 20]</sup>. Die Restriktions- oder Spaltstellen dienten als Koordinaten bei der Kartierung der viralen DNA; die Verfügbarkeit solcher Koordinaten ermöglichte die genaue Lokalisation spezieller struktureller Eigenschaften und Genorte. Die einzige Spaltstelle der Endonuklease Eco RI diente als Referenz-Marker, ihr wurde die Position 0/1.0 auf der Karte zugewiesen (Abb. 2). Da heute die gesamte Nucleotidsequenz bekannt ist, können durch Numerieren der Basenpaare gegenwärtig präzisere Koordinaten gesetzt werden. Das Nucleotid 0/5243 liegt innerhalb von „Ori“, der Stelle, an der die DNA-Replikation beginnt (Kartenposition 0.67); die anderen Nucleotidpaare werden sukzessive in Richtung des Uhrzeigers nummeriert (Abb. 2).

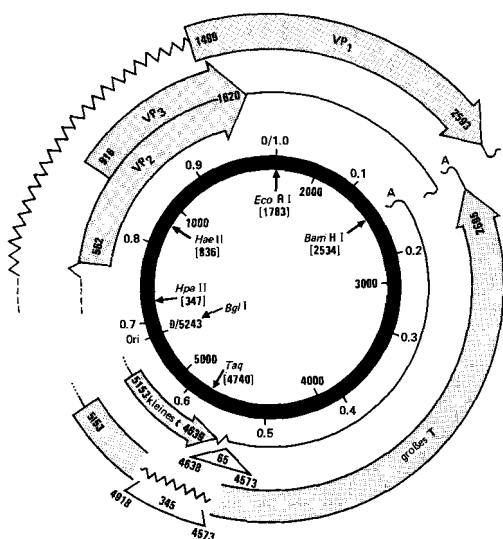


Abb. 2. Genetische und molekulare Karte der SV40-DNA. Der innere Kreis symbolisiert das geschlossene circuläre DNA-Molekül; innerhalb des Kreises sind die Kartenkoordinaten der Nucleotidpaare angegeben, sie beginnen und enden mit 0/5243. Die kleinen Pfeile im Kreis zeigen auf die Stellen, an denen fünf Restriktionsendonucleasen (Eco RI, Bam HI, Tag, Bgl I, Hpa II und Hae II) die DNA einmal spezifisch spalten. Um den Kreis herum sind die Kartenkoordinaten angeordnet – ausgedrückt in Fraktionslängen –, die am Referenzpunkt 0/1.0 beginnen und im Uhrzeigersinn um den Kreis herum zu lesen sind. Die Regionen, die „frühe“ und „späte“ Proteine codieren, sind durch große punktierte Pfeile angedeutet; sie erstrecken sich vom Nucleotidpaar des ersten Codons bis zu dem Nucleotidpaar, das die Termination der Protein-codierenden Sequenz spezifiziert. Jede der codierenden Regionen ist eingefasst in eine mRNA, deren Länge von gepunkteten oder gestrichelten 5'-Enden und gewellten poly-A-Enden angedeutet wird. Die gezackten Teile jeder mRNA werden bei der Bildung der reifen mRNAs gespleißt („splicing“).

Nachdem es den Kern einer infizierten Primatenzelle erreicht hat, wird das Minichromosom von SV40 in regulierter Zeitabfolge exprimiert. Zuerst liefert die Transkription eines Stranges (des E-Stranges) von etwa der Hälfte der DNA (frühe Region) in Gegenrichtung des Uhrzeigers die „frühen mRNAs“ (Abb. 2). Diese mRNAs, die die Polypeptide des großen T- und des kleinen t-Antigens codieren (die punktierten Teile der mRNAs zeigen die Protein-codierenden Regionen), haben 5'-Enden, die von Nucleotidsequenzen abstammen, die nahe der Stelle Ori liegen. Die polyadenylierten (poly-A) 3'-Enden (Schwanz mit A in Abb. 2) kommen von Regionen nahe Kartenposition 0.16. Die Synthese des großen T-Antigens löst die Replikation viraler DNA an Ori aus. Die Replikation schreitet dann bidirektional fort, endet 180° weiter nahe der Position 0.17 und liefert kovalent geschlossene, circuläre Nachkommen-

DNA. Während der DNA-Replikation tauchen gleichzeitig neue virale mRNAs an den Polyribosomen auf; sie werden in Richtung des Uhrzeigers vom L-Strang der anderen Hälfte der viralen DNA (der späten Region) transkribiert und werden „späte mRNAs“ genannt. Späte mRNAs codieren die Virion-Proteine VP1, VP2 und VP3 (die punktierten großen Pfeile zeigen die Protein-codierenden Regionen); ihre Transkription beginnt an verschiedenen Stellen zwischen den Positionen 0.68 und 0.72 und endet etwa an Position 0.16. Die Anhäufung von DNA-Molekülen und Virion-Proteinen bewirkt schließlich den Zelltod und die Freisetzung reifer Virionen.

SV40 hat einen anderen Lebenszyklus, wenn er Nagetiere oder Zellen anderer Nicht-Primaten infiziert. Die gleichen frühen Vorgänge finden statt – die mRNAs vom E-Strang, das große T- und das kleine t-Antigen werden synthetisiert – aber die DNA wird nicht repliziert und späte mRNA-Stränge sowie Virion-Proteine werden nicht hergestellt. Häufig wird nach der Infektion die Replikation der Zell-DNA und die Mitose induziert; die meisten Zellen überleben und lassen wenig von ihrer früheren Infektion erkennen. Ein kleiner Teil der Zellen (weniger als 10%) ist befähigt, unter Kulturbedingungen zu wachsen, die das Wachstum normaler Zellen nicht zulassen; diese transformierten Zellen können nach Injizierung in geeignete Tiere Tumore induzieren. Transformierte Zellen enthalten in ihrer chromosomal DNA die ganze virale DNA – oder einen Teil davon – kovalent gebunden; sie synthetisieren die von frühen Genen codierten mRNAs und Proteine.

Während der siebziger Jahre konnte auf mehreren Wegen in meinen und anderen Laboratorien die Anordnung der SV40-Gene und ihre Funktion während des Lebenszyklus des Virus aufgeklärt werden<sup>[21–23]</sup>. Zuerst wurden die Regionen, von denen frühe und späte mRNAs transkribiert werden, lokalisiert, um die viralen Gene in der DNA relativ zu Restriktionsstellen zu kartieren; dies gelang noch präziser, indem die Position von Deletionen und anderen Veränderungen in der viralen DNA mit spezifischen physiologischen Defekten korreliert wurde. Mit der Kenntnis der Nucleotidsequenz konnte der Umfang eines jeden SV40-Gens und aller Nucleotidsegmente, die Polypeptide codieren, mit beachtlicher Genauigkeit spezifiziert werden (Abb. 2). Wie erwartet, wurde durch die Verfügbarkeit einer präzisen genetischen und strukturellen Karte des Minichromosoms von SV40 der Forschungsschwerpunkt auf die Untersuchung des molekularen Mechanismus verschoben, durch den die Expression und Funktion eines jeden Gens, die Reifung des viralen Minichromosoms und die Rekombination von Virus- und Wirtszell-DNA gesteuert wird; man wollte wissen, wie die Gene von Virus und Wirt interagieren und damit normale Zellen in tumorigene Zellen transformieren. Exzellente detaillierte Zusammenfassungen und Analysen der Molekularbiologie von SV40 und Polyoma, die die wichtigen Beiträge aller auf diesem Gebiet Forschenden berücksichtigen, sind in neueren Monographien zu finden<sup>[21–23]</sup>.

### 3. SV40 als transduzierendes Virus

Die Analyse der Organisation, Expression und Regulation des bakteriellen Genoms wurde durch Anwendung

des Bakteriophagen-vermittelten Transfers von Genen zwischen Zellen erleichtert. Die spezialisierten, transduzierenden Phagen  $\lambda$ ,  $\Phi 80$ , P22 und andere ermöglichen die Cloning und Vermehrung spezifischer Segmente bakterieller DNA und damit die Konstruktion von Zellen mit ungewöhnlichen und informativen Genotypen; durch sie konnten wertvolle Substrate und Proben für die Untersuchung des Transkriptions-, Translations- und Regulationsmechanismus gewonnen werden.

All das ließ mich kurz nach Beginn meiner Arbeit mit Tumor-Viren darüber nachdenken, ob das SV40-Virus dazu geeignet sein könnte, neue Gene in Säugetier-Zellen zu transduzieren. Anfangs glaubte ich nicht sehr an den Erfolg eines solchen Unterfangens, da die vorhersagbare Wahrscheinlichkeit, spezifische Rekombinanten zwischen Virus- und Zell-DNA zu züchten, sehr niedrig war; außerdem war die Möglichkeit, durch „screening“ die Zellen zu selektieren, die spezifische genetische Eigenschaften erworben hatten, sehr begrenzt. Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeit zu umgehen – und sie war es zumindest wert, geprüft zu werden –, bestand darin, die gewünschten transduzierenden Genome von SV40 synthetisch herzustellen. Ungefähr 1970 begann ich, die in-vitro-Konstruktion von Rekombinanten-DNA-Molekülen aus SV40 und bestimmten nichtviralen DNA-Segmenten zu planen. Das Ziel war, solche Rekombinanten-Genome in geeigneten Tierzellen zu vermehren, entweder als autonom replizierende oder als integrierte DNA-Segmente. Zu jener Zeit waren – wenn überhaupt – nur wenige Tiergene verfügbar, die sich für eine Rekombination mit SV40-DNA eigneten; ich nahm aber an, daß eine Anzahl passender Gene in der nahen Zukunft isoliert werden würde. Die wichtigste Aufgabe bestand also darin, eine Methode zu entwickeln, mit der zwei beliebige DNA-Moleküle in vitro zusammengefügt werden können.

Hershey et al. hatten schon gezeigt, daß die DNA des Phagen  $\lambda$  in vitro circularisiert oder an den Enden zusammengefügt werden kann<sup>[24]</sup>. Das ist möglich, da die DNA des Phagen  $\lambda$  cohäsive Enden hat, d. h. einzelsträngige, überlappende, komplementäre DNA-Enden<sup>[25]</sup>. Gelänge es also, DNA-Moleküle mit cohäsiven Enden zu versehen, dann ließen sich diese in vitro durch DNA-Ligase verbinden.

In den Jahren 1971 und 1972 entwickelten David A. Jackson, Robert H. Symons und ich<sup>[26]</sup>, sowie – gleichzeitig und unabhängig – Peter E. Lobban und A. D. Kaiser<sup>[27]</sup> eine Methode, die Enden beliebiger DNA-Moleküle mit künstlichen cohäsiven Termini zu versehen, wobei wir Enzyme und relativ einfache enzymologische Verfahren benutzten; damit war der Weg für die Konstruktion von Rekombinanten-DNA in vitro geebnet. Bei der Entwicklung unseres Verfahrens (Abb. 3) benutzten wir ein bakterielles Plasmid als Modell-„Fremd“-DNA; es schloß ein Stück DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  und drei Gene von *E. coli* ein, die die Enzyme für die Verwertung von Galaktose codieren<sup>[28]</sup>. Die circuläre DNA von SV40 (5,24 kbp) und die Plasmid-DNA  $\lambda$ dvgal (etwa 10 kbp) wurden mit einer spezifischen Endonuclease gespalten und in lineare Moleküle umgewandelt. Durch kurze Andauung mit  $\lambda$ -Exonuclease wurden etwa 50 Nucleotide von den 5'-Enden entfernt, danach konnte die Desoxynucleotidyl-Terminal-Transferase kurze Stücke von Desoxyadenylat- oder Des-

oxythymidylatresten an die 3'-Enden anfügen. Nach Mischen und „annealing“ wurden die beiden DNAs verbunden und über die komplementären Enden cyclisiert (Abb. 3). Die Lücken, die entstehen, wo die beiden DNA-Moleküle aufeinanderstoßen, wurden durch die DNA-Polymerase I mit Desoxynucleosidtriphosphaten gefüllt; die Moleküle ließen sich dann durch die DNA-Ligase kovalent verbinden. Exonuclease III wurde dem Ansatz zugefügt, um etwaige Lücken oder Einschnitte, die während der Manipulationen entstehen können, zu reparieren.

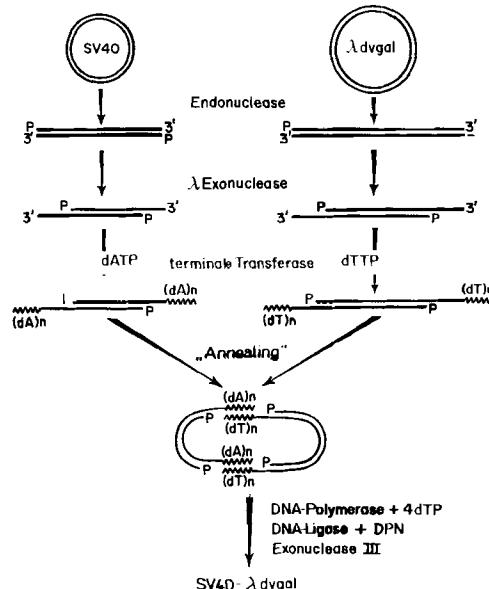


Abb. 3. Die Konstruktion der Rekombinanten-DNA SV40- $\lambda$ dvgal. Zur Erklärung der einzelnen Schritte siehe Text.

Die gebildete Hybrid-DNA war etwa dreimal so lang wie die DNA von SV40 und damit zu groß für ein Chromosom in einem Virus-Capsid. Wir wollten prüfen, ob die Galaktose-Gene von *E. coli* nach Einfügung in die Chromosomen gezüchteter Tierzellen exprimiert würden. Da das Plasmid  $\lambda$ dvgal autonom in *E. coli* replizieren kann<sup>[28]</sup>, planten wir auch zu untersuchen, ob SV40-DNA in Zellen von *E. coli* vermehrt wird und ob SV40-Gene im bakteriellen Wirt exprimiert werden. Die Rekombinanten-DNA SV40- $\lambda$ dvgal (Abb. 3) kann in *E. coli* nicht repliziert werden, da das für die Replikation von Plasmid-DNA in *E. coli* nötige Gen durch die Insertion von SV40-DNA inaktiviert wird; bei Verwendung dimerer  $\lambda$ dvgal-DNA – durch eine relativ einfache Modifikation des Verfahrens herzustellen – wäre diese Schwierigkeit umgangen worden. Da aber viele Kollegen Besorgnis über das potentielle Risiko einer Verbreitung von *E. coli*, das den onkogenen Virus SV40 enthält, äußerten, wurden die Experimente mit dieser Rekombinanten-DNA abgebrochen.

Seit dieser Zeit wuchs die Zahl der Anwendungen der Methoden zur Erzeugung von Rekombinanten-DNA exponentiell. Der beeindruckende Fortschritt beruht auf der wachsenden Kenntnis von Eigenschaften und Gebrauch der Restriktionsendonucleasen, auf der Entwicklung einfacher Methoden zur Rekombination verschiedener DNA-Moleküle, und hauptsächlich auf der Verfügbarkeit von Plasmiden und Phagen, die die Vermehrung und Amplifikation von Rekombinanten-DNAs in vielen mikrobiellen Wirten ermöglichen (eine Zusammenstellung bemerkenswerter Beispiele ist in<sup>[29,30]</sup> gegeben).

Bis 1975 war durch umfassende Clonierungsversuche eine ganze Bibliothek eukaryotischer DNA-Segmente mit einem Gen oder mit Gen-Clustern vieler Spezies geschaffen worden. Untersuchungen über die molekulare Anatomie und chromosomal Anordnung dieser DNA-Segmente brachten wie erwartet neue Erkenntnisse über mögliche Mechanismen der Gen-Regulation in normalen und in entwicklungsmäßig interessanten Tiersystemen mit sich. Es war von Anfang an wahrscheinlich, daß Methoden zur Prüfung der biologischen Aktivität isolierter Gene in vivo benötigt werden. Ich wandte mich deshalb wieder meinem ursprünglichen Ziel zu und benutzte SV40, um clonierte Gene in gezüchtete Säugetierzellen einzuführen, diesmal aber auf einem anderen Weg.

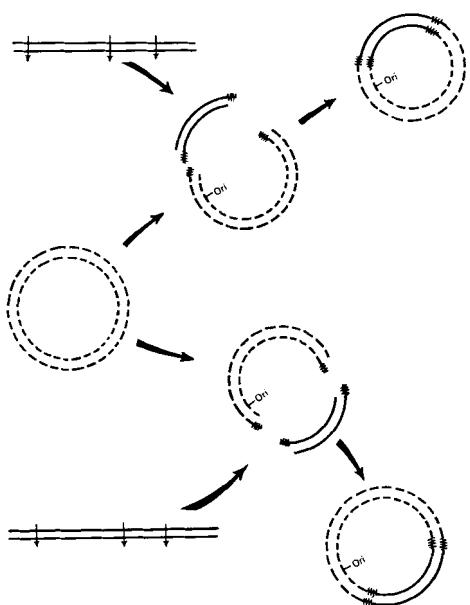


Abb. 4. Das Schema zeigt die in-vitro-Konstruktion von SV40-transduzierenden Genomen. Segmente der späten (nach oben führende Reihe) oder der frühen (nach unten führende Reihe) Regionen der SV40-DNA (der gestrichelte Kreis links) werden durch aufeinanderfolgendes Spalten mit Restriktionsendonukleasen entfernt. DNA-Segmente passender Länge – Restriktionsfragmente oder durch enzymatisches Kopieren von mRNA oder durch chemische Synthese erzeugte DNA-Ketten – werden an Stelle des herausgeschnittenen SV40-DNA-Segmentes eingefügt. Die Verbindung wird über natürliche oder synthetische cohäsive Enden (gezackte Linie) von einer DNA-Ligase geschaffen. Ori bezeichnet die Position des Anfangsortes der SV40-DNA-Replikation.

Zwischen 1972 und 1974 fanden Janet Mertz und ich<sup>[31]</sup>, wie Deletionsmutanten von SV40 durch Komplementierung mit geeigneten temperatursensitiven (ts) Mutanten von SV40 vermehrt werden können. Damit war es möglich, Genome zu vermehren, die exogene DNA an Stelle von spezifischen Regionen der DNA von SV40 enthalten. Mit mir entwickelte Stephen Goff ein Verfahren zur Konstruktion solcher Rekombinanten-DNA, bei dem definierte Segmente von SV40-DNA mit Restriktionsendonukleasen entfernt werden, und die dann – unter Benutzung synthetischer cohäsiver Enden – ersetzt werden durch Segmente „fremder“ DNA<sup>[32,33]</sup> (Abb. 4). In dieser experimentellen Anordnung muß das Rekombinanten-Genom den Replikationsstartpunkt der SV40-DNA (Ori) enthalten, um vermehrt zu werden; die Segmente dürfen außerdem nicht größer als 5.3 kbp sein, d. h. nicht länger als die DNA des reifen Virus, um in die Virus-Partikel inkorporiert zu werden. Weiterhin müssen, da dem SV40-Vektor die auf der

herausgeschnittenen DNA codierten Funktionen fehlen, die defekten Rekombinanten-Genome mit einem Helfer-Virus vermehrt werden, der über die fehlenden Gene oder deren Produkte verfügt. So können z. B. Rekombinanten, in denen die inserierte DNA die ganze späte Region von SV40 oder Teile davon ersetzt, mit SV40-Mutanten vermehrt werden, die eine defekte frühe Region haben (z. B. bei hoher Temperatur mit ts-Mutanten, die Mutationen in der frühen Region haben). Rekombinanten mit eingefügten DNA-Segmenten an Stelle der frühen Region können mit Helfer-Genomen vermehrt werden, die in der späten Region defekt sind (in diesem Fall mit ts-Mutanten, die Mutationen in der späten Region haben).

Unsere ersten Versuche<sup>[32,33]</sup>, clonierte Segmente nach Einfügung der Rekombinanten-Genome in gezüchtete Zellen als mRNAs und Proteine zu exprimieren, schlugen fehl. Aber als wir erkannten, daß zur Expression der neuen genetischen Information das Transkript – beginnend an SV40-Promotoren und terminierend an von SV40-spezifisierten poly-A-Stücken – gespleißt werden muß, wendete sich unser Schicksal. Mit einem DNA-Segment, das das  $\beta$ -Globin in Hasen codiert, gelang es uns erstmals – nach einer Transfektion von gezüchteten Affenzellen – die eingefügten genetischen Elemente als mRNAs und Proteine zu exprimieren<sup>[34]</sup>. Bald danach wurde ein bakterielles Gen (*Ecogpt*), das die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (XGPRT)<sup>[35]</sup> codiert, ein Mäuse-Gen für die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)<sup>[36]</sup> und ein bakterielles Gen (*neo<sup>R</sup>*) für die Aminoglycosid-Phosphotransferase<sup>[37]</sup> erfolgreich mit SV40-DNA-Vektoren in Säugetierzellen transduziert. Allgemein ist die Geschwindigkeit der Expression der transduzierten DNA-Segmente ähnlich groß wie die der ersetzenen SV40-Gene; es wurden jedoch einige Anomalien im „processing“ der RNA beobachtet.

Hamer und Leder haben ebenfalls Rekombinanten aus SV40-DNA und clonierten Mäuse- $\beta$ -Globin<sup>[38]</sup> oder  $\alpha$ -Globin-Genen<sup>[39]</sup> hergestellt und vermehrt. Bei bestimmten Rekombinanten wurden die transduzierten Gene durch späte SV40-Promotorsignale exprimiert, an anderen konnten sie jedoch zeigen, daß die Transkription auch am  $\alpha$ -Globin-Promotor beginnen kann<sup>[39]</sup>. Ihre Experimente demonstrierten außerdem, daß richtiges Spleißen der eingeschobenen Sequenzen (Introns) des Globins und die Translation der entstandenen mRNAs auch in heterologen Wirtszellen vor sich gehen kann.

#### 4. Neue transduzierende Vektoren für Säugetierzellen

Bei den oben genannten Experimenten war unser grundlegendes Ziel, die Fähigkeit der Rekombinanten-Gene zu nutzen, sich in Virus-permissiven Wirtszellen zu replizieren. So wurden z. B. nach Infektion von Affenzellen die SV40-Rekombinanten-Genome auf etwa das  $10^4$ – $10^5$ -fache vermehrt; das garantierte eine hohe Ausbeute an Expressionsprodukten transduzierter Gene. Dieses System lehrte uns viel über die Notwendigkeit und die Feinheiten des Spleiß-Mechanismus von RNA<sup>[40]</sup>, über die Regeln bei der Expression codierender, an verschiedenen Stellen der SV40-DNA inserierter Sequenzen<sup>[41]</sup> und auch über die Expression der SV40-Gene selbst<sup>[42]</sup>. Von Nachteil war jedoch,

daß während der Infektion die Zellen getötet werden; es besteht also keine Möglichkeit, die Expression der transduzierten Gene in sich kontinuierlich vermehrenden Zellpopulationen zu verfolgen. Außerdem können nur die Zellen, die die Fähigkeit haben, SV40-DNA zu replizieren, auch die cotransduzierten Gene vermehren. Das schloß viele spezialisierte und differenzierte Tierzellen als Wirte für transduzierte Gene aus.

Replikation an Ori zu initiieren. Durch die Insertion von DNA-Elementen, die entweder eine vollständige frühe Region der SV40-DNA (pSV3) oder die frühe Region von Polyoma (pSV5) enthalten, in die einzige Spaltstelle von *BamH* I in pSV2, kann dieses Problem gelöst werden (Abb. 5). Die in die Vektoren pSV3 und pSV5 inserierten frühen viralen Regionen codieren Proteine, die die DNA-Replikation von den entsprechenden Startstellen aus initi-

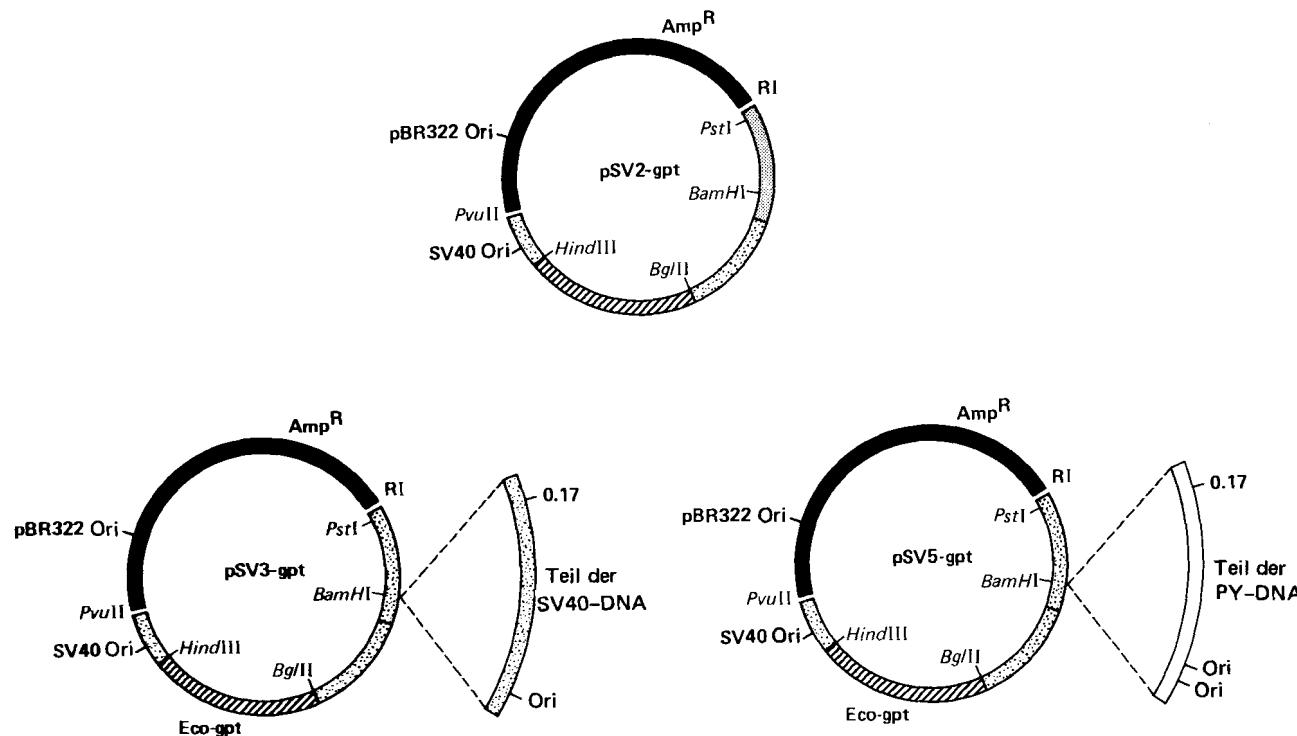


Abb. 5. Struktur von Plasmid-transformierenden Vektoren. Die schwarzen Segmente in den Diagrammen repräsentieren 2.3 kbp der DNA-Sequenz des *E. coli*-Plasmids pBR322, die den Anfangsort der pBR322-DNA-Replikation und das Ampicillinase-Gen enthalten. Die punktierten Regionen repräsentieren die von SV40-DNA stammenden Segmente, die helle Region (in pSV5-gpt) kommt aus Polyoma-DNA und die schraffierten Segmente stellen die Eco-gpt-DNA dar, die das Gen enthält, das XGPRT in *E. coli* codiert. *Pst* I, *Bam* H I, *Bgl* I und *Hind* III sind Restriktionsendonukleasen.

Um diese Nachteile zu umgehen, entwickelten wir eine neue Gruppe transduzierender Vektoren, mit denen genetische Information in eine Reihe von Säugetierzellen einge-führt und erhalten werden kann (Abb. 5). pSV2<sup>[43]</sup> sowie seine Abkömmlinge pSV3 und pSV5<sup>[35, 44]</sup> enthalten ein DNA-Segment (schwarze Region in Abb. 5) aus einem *E. coli*-Plasmid (pBR322), das es diesen DNAs ermöglicht, sich in *E. coli*-Zellen zu vermehren; dadurch werden die nötigen genetischen Manipulationen sehr vereinfacht. Jeder Vektor enthält ein Marker-Gen (schraffierte Segmente in Abb. 5), an dessen 5'-Ende sich ein DNA-Segment anschließt, das den frühen Promotor von SV40 und den Anfangsort der DNA-Replikation trägt (Ori); ein weiteres DNA-Segment von SV40, das Spleißen und Polyadenylierung des Transkriptes garantiert, befindet sich am 3'-Ende des Marker-Segmentes (die von SV40 stammenden DNA-Segmente sind in Abb. 5 punktiert). Zusätzliche DNA-Segmente können an jedem der spezifischen Restriktionsorte in die DNA-Vektoren eingeschoben werden. Auf diese Weise kann ein einziges DNA-Molekül mehrere Gene gleichzeitig transduzieren.

pSV2 kann nicht in Säugetierzellen repliziert werden, da ihm selbst und der Zelle die Möglichkeit fehlt, die DNA-

ieren; pSV3-DNA kann deswegen in Affenzellen und pSV5-DNA in Mäusezellen repliziert werden<sup>[44]</sup>.

Bisher wurden drei Marker-DNA-Segmente in Verbindung mit pSV2-, -3- und -5-Vektor-DNAs benutzt: Eco-gpt, ein Gen aus *E. coli*, welches das Enzym XGPRT codiert<sup>[35, 44]</sup>, ein cDNA-Segment aus Mäusen, das die DHFR codiert und neo<sup>R</sup>, ein Gen aus einem bakteriellen Plasmid, das eine Aminoglycosid-Phosphotransferase spezifiziert, die die antibakteriellen Neomycin-Kanamycin-Derivate inaktiviert<sup>[37]</sup>. Ich werde hier nur einige neuere Befunde mit Eco-gpt als Marker-Gen zusammenfassen; es genügt darauf hinzuweisen, daß die Transfektion mit den Vektor-DHFR- oder Vektor-neo<sup>R</sup>-Derivaten die Expression der Mäuse-DHFR bzw. des neo<sup>R</sup>-Phänotyps zur Folge hat.

Richard Mulligan isolierte das Eco-gpt-Gen<sup>[35]</sup>, um zu klären, ob es für den Nachweis und das selektive Wachstum der Säugetierzellen brauchbar ist, die dieses Gen aufnehmen. Zuerst mußte sichergestellt werden, daß durch Einfügung von Eco-gpt in Säugetierzellen die Produktion von *E. coli*-XGPRT ausgelöst wird. Wir fanden, daß Extrakte von kultivierten Affenzellen, die pSV2-gpt-, pSV3-gpt- und pSV5-gpt-DNA ausgesetzt waren, zwei GPRT-Enzyme enthielten (Abb. 6 oben); eines entsprach in sei-

nem elektrophoretischen Verhalten in Polyacrylamid-Gel der HGPRT von Säugetierzellen und das andere hatte die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie die XGPRT aus *E. coli*. Auch nach anderen Kriterien was das in Affenzellen synthetisierte XGPRT nicht von dem gleichen Enzym aus *E. coli* zu unterscheiden.

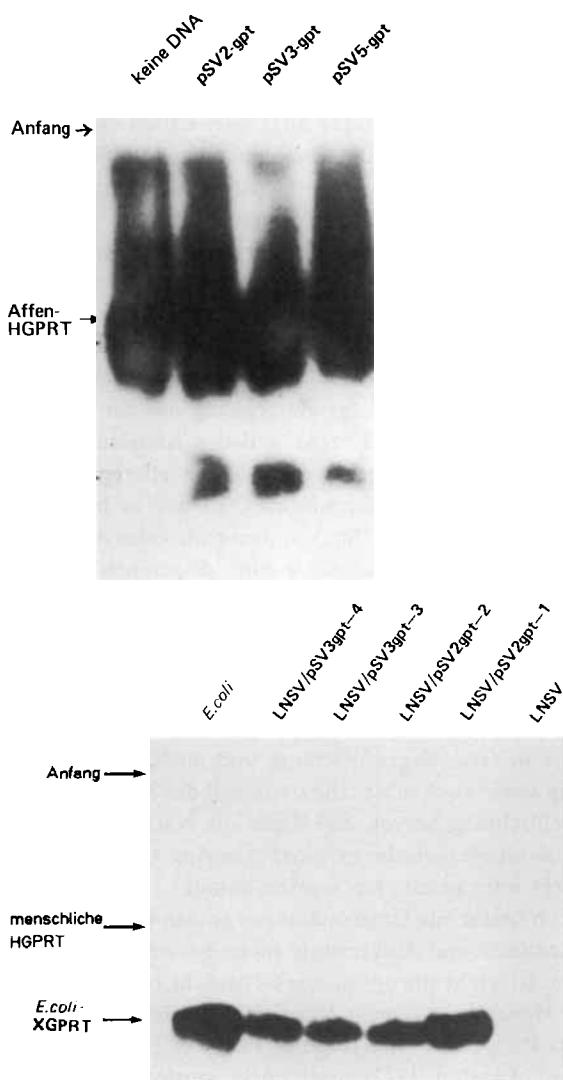


Abb. 6. Nachweis von GPRT-Aktivität nach Elektrophorese von Zellextrakten in Polyacrylamid-Gel. Oben: Extrakte aus etwa  $5 \cdot 10^6$  CV1-Zellen, die drei Tage nach Transfektion mit 10  $\mu$ g pSV2-, -3- oder -5-gpt-DNA gewonnen wurden, werden gelektrophoretisch in Polyacrylamid getrennt und auf GPRT-Aktivität in situ durch Inkubation mit  $^3\text{H}$ -markiertem Guanin und Nachweis des markierten GMP-Produktes durch fluorographische Autoradiographie untersucht<sup>[35]</sup>. Die schwarzen Bereiche entsprechen der Lage der Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Aktivität auf dem Gel; die Pfeile zeigen die bekannten Positionen, an denen die Bänder der GPRT-Enzyme aus Affe und *E. coli* auftreten. Unten: Extrakte aus unbehandelten (LNSV) und pSV-gpt-transformierten Lesch-Nyhan-Zellen wurden wie oben beschrieben analysiert. Die mit *E. coli* beschriftete Reihe enthielt einen Extrakt aus XGPRT-produzierenden Bakterien.

XGPRT aus *E. coli* ist dem Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) in Säugetieren analog. Beide brauchen Guanin als Substrat für die Purin-nucleotid-Biosynthese. XGPRT aus *E. coli* unterscheidet sich aber von seinem Gegenstück in Säugetieren darin, daß es Xanthin besser als Hypoxanthin als Substrat nutzt<sup>[45]</sup>; das Enzym aus Säugern setzt hingegen Hypoxanthin viel schneller um als Xanthin<sup>[46]</sup>.

Nachdem sichergestellt war, daß nach Einfügung des Eco-gpt-Gens in Affenzellen *E. coli*-XGPRT synthetisiert wird, war es wichtig zu wissen, ob das bakterielle Enzym die Funktion des zellulären HGPRT übernehmen kann. Das konnte an menschlichen Lesch-Nyhan-Zellen überprüft werden, denen HGPRT fehlt, und die deswegen nicht in einem Kulturmedium wachsen, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium)<sup>[47]</sup>. Es schien wahrscheinlich, daß die Transfektion von Lesch-Nyhan-Zellen mit pSV-gpt-DNA zeigen würde, ob die Bildung von *E. coli*-XGPRT diesen Mutantenzellen ein Überleben im HAT-Medium ermöglicht.

Wie erwartet überlebten Lesch-Nyhan-Zellen im HAT-Medium ohne Vektor-gpt-DNA nicht. Nahmen die Lesch-Nyhan-Zellkulturen jedoch pSV2-gpt- oder pSV3-gpt-DNA auf, dann überlebten die Kolonien mit einer Häufigkeit von etwa  $10^{-4}$ <sup>[35]</sup>. Repräsentative überlebende Clone – im HAT-Medium über 40 Generationen gezüchtet – enthielten nur *E. coli*-XGPRT (Abb. 6 unten). Die Einführung von Eco-gpt-DNA und die Expression von *E. coli*-XGPRT machte einen Defekt wett, der durch die Abwesenheit zellulärer HGPRT verursacht war.

Durch die Expression von Eco-gpt erlangen Säugetierzellen eine neue Fähigkeit; normale Säugerzellen nutzen praktisch kein Xanthin zur Purin-nucleotid-Bildung; Zellen, die Eco-gpt exprimieren und *E. coli*-XGPRT synthetisieren, verwerten jedoch auch Xanthin. Der Erwerb und die Expression von Eco-gpt kann so zur Grundlage einer effektiven und entscheidenden Selektion von Säugerzellen werden<sup>[48]</sup>.

Purin-nucleotide werden durch „de-novo“- oder „Salvage-Synthese“<sup>[4]</sup> hergestellt (Abb. 7). Durch de-novo-Synthese wird Inosinsäure (IMP) – das erste Nucleotid-Intermediat – in Adenylsäure (AMP) via Adenylosuccinat und in Guanylsäure (GMP) via Xanthylsäure (XMP) umgewandelt. Freie Purine werden wiederverwertet, indem sie mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) kondensieren:

Synthese von Purin-nucleotiden

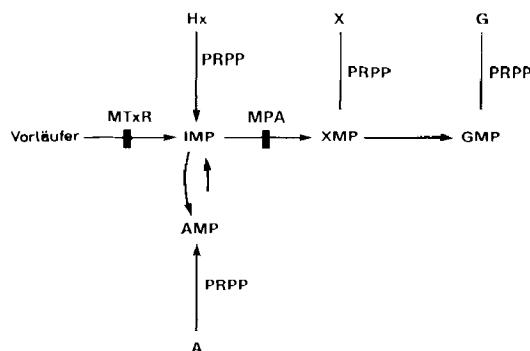


Abb. 7. Synthesewege für Purin-nucleotide. Methotrexat (MTxR) inhibiert die de-novo-Synthese von Purinen, und Mycophenolsäure (MPA) inhibiert spezifisch die Umwandlung von IMP in XMP<sup>[49]</sup>. Die Pfeile zwischen den Purin-basen (Hx = Hypoxanthin, X = Xanthin, G = Guanin und A = Adenin) und ihren entsprechenden Mononucleotiden bezeichnen die Reaktionen der Basen mit 5-Phospho- $\alpha$ -D-ribose-1-pyrophosphat (PRPP), die von der Purin-Phosphoribosyl-Transferase katalysiert werden. Ein Pfeil deutet außerdem an, daß AMP zu IMP desaminiert werden kann.

[\*] Unter „de-novo-Synthese“ versteht man eine Synthese unter Verwendung von biologischem Neubaumaterial; unter „Salvage-Synthese“ versteht man eine Synthese unter Wiederverwendung von biologischem Abbau-material.

die Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) katalysiert die Bildung von AMP aus Adenin (A); mit Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) entstehen aus Hypoxanthin (Hx) und Guanin (G) IMP bzw. GMP. Es ist kein Säugerenzym bekannt, das – wie das bakterielle Enzym XGRRT – Xanthin (X) in XMP überführt.

Mycophenolsäure (MPA), ein Inhibitor der IMP-Dehydrogenase<sup>[49]</sup>, verhindert die Bildung von XMP und daher auch die von GMP. Die Hemmung des Zellwachstums durch Mycophenolsäure kann durch Zugabe von Guanin zum Medium aufgehoben werden, da Guanin durch HGPRT in sein Mononucleotid umgewandelt wird. Da in normalen Säugerzellen aus Xanthin nur sehr langsam XMP entsteht, können sie nicht wachsen, wenn dem Mycophenolsäure-enthaltenden Medium Xanthin zugesetzt wird. Zellen, die *E. coli*-XGPRT enthalten, sollten hingegen unter diesen Bedingungen wachsen.

Durch Transfektion von Mäuse- oder Affenzellen mit pSV2-, -3- und -5-gpt-DNA und anschließendem Transfer in ein Mycophenolsäure- und Xanthin-enthaltendes Medium konnten überlebende Kolonien mit einer Häufigkeit von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  erhalten werden<sup>[48]</sup>. Durch Transfektion mit pSV2-, -3- und -5-DNA mit anderen Marker-Segmenten (z. B.  $\beta$ -Globin- oder Mäuse-DHFR-DNA), durch Entfernung des Ori-Segmentes aus der pSV2-gpt-DNA oder völlig ohne fremde DNAs entstanden weniger als  $10^{-7}$  überlebende Kolonien. Die mit Eco-gpt transformierten Clone enthalten Zellen, die sowohl das normale HGPRT als auch XGPRT – das Produkt von Eco-gpt – synthetisieren. Analysen der transformierten Zell-DNA deuten darauf hin, daß sie eine bis mehrere Kopien der pSV-gpt-DNA enthält, wahrscheinlich integriert in die chromosomale DNA. Die Struktur, Organisation und Expression dieser integrierten Gene wird gegenwärtig untersucht.

Unsere laufenden Arbeiten zeigen, daß die Voraussetzungen für eine Expression prokaryotischer Gene nicht sehr groß sind. Es gibt keinen Grund zur Annahme, daß die bakteriellen Gene Eco-gpt und neo<sup>R</sup> als einzige in Säugetierzellen exprimiert werden. Ich glaube, daß Bakterien, ihre Viren und einfache Eukaryoten eine sehr ertragreiche Genquelle werden, mit denen Säugetierzellen modifiziert werden können.

## 5. Ausblick

Die Entwicklung und Anwendung der Rekombinations-techniken hat eine neue Ära wissenschaftlicher Entdeckungen eingeleitet, die unsere Zukunft auf vielfache Weise beeinflussen wird. Weitreichende Folgen für die Genetik und die gesamte Molekularbiologie sind schon zu verzeichnen. Durch molekulares Clonieren können die Organisation und die detaillierte molekulare Struktur großer Chromosomenregionen aufgeklärt werden, vielleicht sogar die ganzen Genome von Organismen, einschließlich des Menschen. Es wurde schon eine Anzahl von Säugetiergenen und menschlichen Genen isoliert und teilweise deren chromosomal Anordnung und exakte Nucleotidsequenz bestimmt. Solche genaue Kenntnis ist bedeutsam für die zukünftige Medizin. So wie der gegenwärtige Wissensstand der Medizin und ihre Ausübung auf einer genauen Kenntnis der menschlichen Anatomie, Physiologie und

Biochemie beruhen, so werden künftige Therapien ein detailliertes Verständnis der molekularen Anatomie und Physiologie des menschlichen Genoms voraussetzen. Es besteht kein Zweifel, daß wir mit der Entwicklung und Anwendung von Rekombinationstechniken an der Schwelle zu neuen Formen der Medizin stehen. Es gibt viele, die eine Behandlung genetischer Erkrankungen durch Ersatz der defekten Gene durch ihre normalen Gegenstücke – erhalten durch Clonierung – erwägen. Nur wenige der weitreichenden Spekulationen sind plausibel und durchführbar. Gen-Ersatz als Therapie birgt viele Fallen und Unbekannte, zu denen auch die Frage nach der Durchführbarkeit und Erwünschtheit einer solchen Behandlung gehört; ganz zu schweigen von den Risiken. Es scheint mir, daß wir, wenn wir diesen Weg weiterverfolgen wollen, detaillierte Kenntnisse über die Organisation, Funktion und Regulation menschlicher Gene benötigen. Wir werden auch Ärzte brauchen, die in gleicher Weise mit der molekularen Anatomie und Physiologie der Chromosomen und Gene vertraut sind, wie der Herzchirurg mit der Struktur und Arbeitsweise des Herzens und des Kreislaufs. Gen-Therapie muß abgewogen werden gegen alternative und konventionelle Behandlungsformen, so wie es heute gemacht wird, bevor ein Herzklappenersatz oder eine Nierentransplantation durchgeführt wird. Abgesehen von den wissenschaftlichen Problemen wirft ein solches Vorgehen ethische und moralische Fragen auf. Es mag nicht zu früh sein, ernsthafte Diskussionen über die wissenschaftlichen, medizinischen und ethischen Probleme zu beginnen, mit denen wir sicherlich bald konfrontiert werden.

Die schon breite Anwendung der Rekombinanten-Technologie in Grundlagenforschung und medizinischer Forschung sowie auch in der Industrie und der Pharmazie rief die Befürchtung hervor, daß damit die Natur des Lebens selbst angetastet würde; es wird – aus Angst vor dem, was entdeckt oder geschaffen werden könnte – die Frage gestellt, ob bestimmte Untersuchungen an den Grenzen unserer Kenntnis und Unkenntnis nicht besser unterbleiben sollten. Ich ziehe die optimistische Ansicht vor, die von Sir Peter Medawar in seinem Essay "On the Effecting of All Things Possible" ("The Hope of Progress", Methuen and Co. Ltd., London, 1972) ausgedrückt wurde:

*"If we imagine the evolution of living organisms compressed into a year of cosmic time, then the evolution of man has occupied a day. Only during the past 10 to 15 minutes of the human day has our life been anything but precarious. We are still beginners and may hope to improve. To deride the hope of progress is the ultimate fatuity, the last word in the poverty of spirit and meanness of mind."*

In diesem Abschnitt wird von der Notwendigkeit gesprochen, fortzuschreiten. Die Rekombinanten-Technologie hat einen neuen und wirksamen Weg zur Lösung von Problemen gewiesen, die seit Jahrhunderten die Menschheit beschäftigen. Ich persönlich würde vor dieser Herausforderung nicht zurückschrecken.

*Der Nobel-Vortrag bietet mir die willkommene Gelegenheit, meine Dankbarkeit und Bewunderung den zahlreichen Studenten und Kollegen auszusprechen, mit denen ich gearbeitet und die Freude und auch die Enttäuschungen geteilt*

habe, die das Vortasten in unbekannte Gebiete mit sich bringt. Ohne ihre Begabung, Beharrlichkeit und Anregung wäre ein großer Teil unserer Arbeit nicht gediehen. Denjenigen, die mit Studenten gearbeitet haben und die Unbequemlichkeit ihrer Neugier und Hartnäckigkeit sowie die Freude über ihre Entwicklung kennen, dürfte das Ausmaß von deren Beitrages bekannt sein. Die gemeinsamen Anstrengungen prägten die jeweils Beteiligten und bescherten ihnen eine Menge an Erfahrung. Ich hatte außerdem das Glück, zwei tüchtige Forschungsassistentinnen zu beschäftigen, meine Mitarbeiterin Ms. Marianne Dieckmann und Ms. June Hoshi.

Ich durfte an der Stanford University auch mit hervorragenden Kollegen arbeiten, die die stimulierendste und befreiendste Umgebung schufen, die man erhoffen konnte. Ihre Leistungen waren inspirierend und ohne ihre intellektuelle und materielle Hilfe wären meine Bemühungen stark beeinträchtigt gewesen. Besonders dankbar bin ich Arthur Kornberg und Charles Yanofsky – beide langjährige enge Freunde – für ihr uneingeschränktes Interesse, ihre Ermutigung, Unterstützung und Kritik für meine Arbeit. Und schließlich möchte ich besonders meine Frau Millie erwähnen, ohne die die seltenen Erfolge ihren Glanz verloren hätten. Ihre Stärke, Zustimmung und Ermutigung erlaubten mir, mich ganz der Forschung zu widmen.

Sicherlich wäre meine Arbeit nicht erfolgreich gewesen ohne die großzügige Unterstützung der U. S. National Institutes of Health, der National Science Foundation, der American Cancer Society und vieler anderer Stiftungen und Personen, die unsere Forschung finanziell unterstützten.

Eingegangen am 31. März 1981 [A 382]  
Übersetzt von Christiane Koszka, Hamburg

- 
- [1] G. W. Beadle, E. L. Tatum, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 27, 499 (1941).  
 [2] G. W. Beadle, Chem. Rev. 37, 15 (1945).  
 [3] G. W. Beadle, Harvey Lect. 40, 179 (1945).  
 [4] A. E. Garrod: Inborn Errors of Metabolism, Frowde, Hodder and Stoughton, London 1941.  
 [5] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, J. Exp. Med. 79, 137 (1944).  
 [6] A. D. Hershey, M. Chase, J. Gen. Physiol. 36, 39 (1952).  
 [7] J. D. Watson, F. H. C. Crick, Nature 171, 737, 964 (1953).

- [8] R. Dulbecco, G. Freeman, Virology 8, 396 (1959).  
 [9] R. Dulbecco, M. Vogt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 236 (1963).  
 [10] M. Vogt, R. Dulbecco, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 365 (1960).  
 [11] R. Dulbecco, M. Vogt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 1617 (1960).  
 [12] J. Sambrook, H. Westphal, P. R. Srinivasan, R. Dulbecco, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1288 (1968).  
 [13] K. Oda, R. Dulbecco, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 525 (1968).  
 [14] F. Cuzin, M. Vogt, M. Dieckmann, P. Berg, J. Mol. Biol. 47, 317 (1970).  
 [15] V. B. Reddy, B. Thimappaya, R. Dhar, K. M. Subramanian, B. S. Zain, J. Pan, P. K. Ghosh, M. L. Celma, S. M. Weismann, Science 200, 494 (1978).  
 [16] W. Fiers, R. Contreras, G. Haegeman, R. Rogiers, A. van der Vordre, H. van Heuverswyn, J. van Heerewaghe, G. Volckgert, M. Ysebaert, Nature 273, 113 (1978).  
 [17] R. Llopis, G. R. A. Stark, J. Virol., im Druck, 1981.  
 [18] N. Bouck, N. Beales, T. Shenk, P. Berg, G. DiMayorca, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2473 (1978).  
 [19] D. Nathans, Harvey Lect. 70, 111 (1976).  
 [20] D. Nathans, Les Prix Nobel, Almqvist und Wiksell International, Stockholm 1978, S. 198.  
 [21] T. J. Kelly Jr., D. Nathans, Adv. Virus Res. 21, 85 (1977).  
 [22] M. Fried, B. E. Griffin, Adv. Cancer Res. 24, 67 (1977).  
 [23] J. Tooze: DNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1980, Kap. 2-5.  
 [24] A. D. Hershey, E. Burgi, L. Ingraham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49, 748 (1963).  
 [25] R. Wu, A. D. Kaiser, J. Mol. Biol. 35, 523 (1968).  
 [26] D. A. Jackson, R. H. Symons, P. Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2904 (1972).  
 [27] P. E. Lobban, A. D. Kaiser, J. Mol. Biol. 78, 453 (1973).  
 [28] D. E. Berg, D. A. Jackson, J. E. Mertz, J. Virol. 14, 1063 (1974).  
 [29] Science 196, No. 183 (1977).  
 [30] Science 209, No. 4463 (1980).  
 [31] J. E. Mertz, P. Berg, Virology 62, 112 (1974).  
 [32] S. P. Goff, P. Berg, Cell 9, 695 (1976).  
 [33] S. P. Goff, P. Berg, J. Mol. Biol. 133, 359 (1979).  
 [34] R. C. Mulligan, B. H. Howard, P. Berg, Nature London 277, 108 (1979).  
 [35] R. C. Mulligan, P. Berg, Science 209, 1422 (1980).  
 [36] S. Subramani, R. C. Mulligan, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [37] P. J. Southern, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [38] D. H. Hamer, P. Leder, Nature London 281, 35 (1979).  
 [39] D. H. Hamer, M. Kaehler, P. Leder, Cell 21, 697 (1980).  
 [40] A. Buchman, P. Berg, unveröffentlichte Ergebnisse.  
 [41] P. J. Southern, B. H. Howard, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [42] R. T. White, L. P. Villarreal, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [43] B. H. Howard, P. J. Southern, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [44] R. C. Mulligan, P. J. Southern, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [45] R. L. Miller, G. A. Ramsey, T. A. Krenitsky, G. B. Elion, Biochemistry 11, 4723 (1979).  
 [46] T. A. Krenitsky, R. Papaioannou, G. B. Elion, J. Biol. Chem. 244, 1263 (1969).  
 [47] E. H. Szybalski, W. Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 2026 (1962).  
 [48] R. C. Mulligan, P. Berg, noch unveröffentlicht.  
 [49] T. J. Franklin, J. M. Cook, Biochem. J. 113, 515 (1969).