

Die Polymerase-Kettenreaktion (Nobel-Vortrag)**

Kary B. Mullis*

1944 erschien von Erwin Schrödinger ein kleines Buch mit dem Titel *What is life?*, zu dem er durch Max Delbrück angeregt worden war. Dieses Buch inspirierte die ersten Molekularbiologen und hat, wohl gemeinsam mit Delbrück selbst, für die Forschung der nächsten zehn Jahre die Richtung vorgegeben, die schließlich zur Antwort auf die Frage führte, warum Gleiches Gleiches zeugt.

Max erhielt den Nobel-Preis 1969, und obwohl er sich sehr darüber freute, klagte er doch zugleich, daß er die Erkenntnisse, für die er vor aller Welt ausgezeichnet worden sei, nur mit einer Handvoll Leute teilen könne. Samuel Becketts Beiträge zur Literatur, die im gleichen Jahr gewürdigt wurden, schienen ihm irgendwie allgemeiner zugänglich zu sein - ganz im Gegensatz zu seinen eigenen Arbeiten. Bei seinem Vortrag anlässlich der Preisverleihung sprach Max davon, daß er sich im Elfenbeinturm der Wissenschaft eingeschlossen fühle.

„Die Bücher der größten Wissenschaftler“ sagte er, „verstauben in den Regalen der Fachbibliotheken, und das zu Recht. Der Wissenschaftler wendet sich an eine sehr kleine Zahl von Fachkollegen. Seiner Botschaft fehlt die Universalität zwar keineswegs, aber während das Werk eines Künstlers auf ewig mit seiner ursprünglichen Form verbunden ist, wird das eines Wissenschaftlers verändert, weiterentwickelt, mit den Ideen und Ergebnissen anderer vereint und vermischt sich mit dem Strom an Wissen und Ideen, der unsere Kultur bildet. Der Wissenschaftler hat mit dem Künstler nur eines gemeinsam: daß er sich nicht besser als durch seine Arbeit aus der Welt zurückziehen kann und daß seine Arbeit zugleich das stärkste Band zwischen ihm und der Welt ist.“

Ich hörte Max Delbrück gerne zu: Er konnte wie meine andere historische Leitfigur, Richard Feynman, der ebenfalls mit dem Nobel-Preis ausgezeichnet wurde, den Kern der Dinge erkennen und ihn für uns andere klar machen. Aber ich bin nicht wie er davon überzeugt, daß die Freude an wissenschaftlichen Entdeckungen für alle außer ein paar speziell informierte Kollegen vollkommen geheimnisvoll und unerklärbar bleiben muß. Vielmehr schließe ich mich hier Feynman an, der vermutlich gesagt hätte, was man verstanden hat, kann man auch erklären.

Darum werde ich nun versuchen zu erklären, wie es dazu kam, daß ich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entdeckt

habe. Dabei wird auch ein kurzer Abschnitt vorkommen, der sich nicht leicht in die Alltagssprache übersetzen läßt. Wenn dieser nicht für mehr als nur eine Handvoll Leute von Interesse wäre, würde ich ihn einfach auslassen. Ich werde aber zumindest darauf hinweisen, wann er anfängt, und auch sagen, wann ich damit fertig bin. Stören Sie sich nicht daran, er ist esoterisch und nicht wesentlich. Ich glaube, Sie können meine Gefühle beim Entdecken der PCR auch nachempfinden, ohne die Details zu verstehen.

1953, als Jim Watson und Francis Crick ihre Beschreibung der DNA-Struktur veröffentlichten, waren ich und das kleine Buch von Schrödinger acht Jahre alt. Ich war zu jung, um zu verstehen, daß die Menschheit endlich den möglichen Grund dafür, daß Gleiches Gleiches zeugt, erkannt hatte. Das Buch war dreimal nachgedruckt worden. Bei mir zu Hause in Columbia, South Carolina, gab es aber niemanden, der bemerkt hätte, daß wir kein Exemplar davon hatten. Unser Haus stand nicht weit entfernt von einem Brachland mit einem kleinen Bach, einem Bahngleis, Opossums, Waschbären, Giftschlangen und Fabelwesen. Wir brauchten das Buch nicht. Die Wildnis in unserer Nähe war für mich und meine Brüder ein geheimnisvoller und unbeaufsichtigter Spielplatz. Und wenn es uns über der Erde zu langweilig wurde, konnten wir in das Netz der Abwasserkanäle unter der Stadt hinabsteigen. Wir lernten, uns in dem dunklen unterirdischen Labyrinth zurechtzufinden. Es flöbte uns immer Angst ein, und doch zog es uns immer wieder an.

Als Watson und Crick 1962 in Stockholm geehrt wurden, hatte ich bereits drei Jahre lang gemeinsam mit meinen Jugendfreunden Raketen gebastelt. Als enorm wirkungsvoller Treibstoff hatte sich eine Mischung aus Kaliumnitrat und Zucker herausgestellt, die zunächst vorsichtig auf einem Holzkohleherd geschmolzen und dann auf besondere Art in ein Metallrohr gegossen wurde. Mit jedem erfolgreichen Experiment wurde unser Metallrohr größer, bis es mehr als einen Meter lang war. Meine Mutter wurde dabei immer ängstlicher, und immer öfter erschien ihr Kopf in einem der oberen Fenster, und sie sagte Dinge, die nicht gerade ermutigend waren. Der Zucker wurde widerwillig aus der Küche geliefert, und das Kaliumnitrat besorgten wir uns beim Drogisten am Ort.

Damals waren in South Carolina Jungen, die Chemikalien haben wollten, nicht sofort verdächtig. Wir konnten im Eisenwarenladen sogar Dynamitzünder kaufen, ohne daß man uns gefragt hätte, wozu wir sie brauchten. Das war gut so, denn die Kombination aus sehr zuverlässigem, langsam abbrennendem Dynamitzünder und unserer Fähigkeit, wie Windhunde zu rennen, sobald wir den Zünder angezündet hatten, rettete uns

[*] Dr. K. B. Mullis
6767 Neptune Place, Apartment 4
La Jolla, CA 92037 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1994. - Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

einmal das Leben, als unsere Rakete auf der Startrampe explodierte. Unsere Zünder waren in der Tat sehr viel besser als die, die Alfred Nobel verwendet haben mußte, als er seine Mutter mit seinen Experimenten erschreckte. In einem unserer letzten Experimente, bevor unser Interesse an den jungen Frauen in unserer Umgebung so groß wurde, daß wir die nächsten zehn Jahre nicht mehr gründlich über Raketentreibstoffe nachdenken konnten, schossen wir einen Frosch eine Meile in die Luft und erhielten ihn lebend zurück. Bei einem anderen Versuch erschreckten wir einen Linienflughpiloten, der gerade eine DC-3 auf dem Flughafen von Columbia landen wollte. - Unser Fehler.

An der Dreher High School hatten wir freien, unbeaufsichtigten Zugang zum Chemielabor. Wir verbrachten dort manchen Nachmittag mit Herumexperimentieren. Keiner zog sich Verletzungen zu, und es kam auch zu keiner Klage. Heute dürften wir nicht mehr einfach so ins Labor hinein. Wir würden als eine Gefahr für die Gesellschaft angesehen. Wenn ich mich nicht irre, durfte Alfred Nobel seine schwarze Kunst einige Zeit nicht auf schwedischem Boden ausüben. Schweden war und ist natürlich auf diesem Gebiet den USA weit voraus.

Ich wurde nie müde, im Labor herumzuexperimentieren. Während der Sommerferien an der Georgia Tech richteten Al Montgomery und ich in einem alten Hühnerstall am Stadtrand ein organisch-chemisches Labor ein, in dem wir Chemikalien für die Forschung herstellten, um sie zu verkaufen. Die meisten waren giftig oder explosiv, so daß sie niemand machen wollte, aber es gab Interessenten dafür, und so wurde ihre Herstellung unsere Domäne. Wir litten weder an Langeweile noch unter einem Chef, und wir verdienten genug, um neues Laborgerät zu kaufen. Max Gergel, der Leiter der Columbia Organic Chemicals Company, ein ungewöhnlich freundlicher Mann, ermutigte uns und kaufte die meisten unserer Produkte für den Wiederverkauf. Es gab keine staatlichen Reglementierungen, die unsere Grünschnabel-Bemühungen erstickt hätten - es war eine goldene Zeit, aber wir erkannten es nicht. Wir lernten eine ganze Menge Organische Chemie.

Als ich von der Georgia Tech an die University of California in Berkeley wechselte, um dort Biochemie zu studieren, war der genetische Code entschlüsselt. Die DNA interessierte mich noch nicht; ich war von kleinen Molekülen begeistert. Die DNA war vor der Entdeckung der PCR lang und faserförmig, überhaupt kein richtiges Molekül. Sechs Jahre im Biochemie-Fachbereich änderten meine Meinung über die DNA in keinsten Weise, aber sechs Jahre in Berkeley änderten meine Meinung über sonst fast alles.

Ich gehörte zur Arbeitsgruppe von Joe Neilands, der seinen Doktoranden einen Arbeitsplatz gab und ihnen nur sehr wenige Vorschriften machte. Ich weiß nicht, ob Joe überhaupt andere Regeln kannte als die der sozialen Verantwortung und der Toleranz. Da ich nicht wußte, daß es Studienvorschriften gab, belegte ich Vorlesungen in Astrophysik statt in Molekularbiologie, die ich glaubte von meinen Molekularbiologie-Freunden lernen zu können. Meine erste wissenschaftliche Veröffentlichung erschien 1968 in *Nature*. Es war eine unausgorene astrophysikalische Hypothese mit dem Titel „The Cosmological Significance of Time Reversal“. Ich nehme an, *Nature* ist es immer noch peinlich, diese Arbeit veröffentlicht zu haben, aber für mich war es sehr hilfreich, als meine Doktorprüfung anstand. Das Prüfungskomitee mußte nämlich darüber entscheiden, ob ich die

Prüfung überhaupt ablegen durfte, ohne Vorlesungen in Molekularbiologie gehört zu haben. Meine Arbeit in *Nature* half ihnen, ja zu sagen. Rückblickend war die Zusammensetzung des Prüfungskomitees hochinteressant:

Don Glaser, der 1960 mit 34 Jahren den Nobel-Preis für Physik erhalten hatte, sollte später zu den Gründern der Cetus Corporation gehören, bei der ich arbeitete, als ich die PCR entwickelte. Henry Rapoport, der die Psoralene entdeckte, sollte bei Cetus wissenschaftlicher Berater meiner Abteilung werden und zwei Patente mit mir schreiben. Der inzwischen leider verstorbene Alan Wilson sollte der erste Forscher werden, der außerhalb von Cetus die PCR einsetzte. Und Dan Koshland sollte Herausgeber von *Science* sein, als meine erste Arbeit über die PCR abgelehnt wurde, und auch drei Jahre später, als die PCR zum „Molekül des Jahres“ gewählt wurde. - Ich bestand die Promotionsprüfung. Keiner von uns, nehme ich an, ahnte beim Verlassen des Raumes, wie sich die Dinge zwischen uns entwickeln würden.

Joe Neilands war der ideale Beistand für seine Leute in jener Zeit sozialer Unruhen in Berkeley. Wir lachten viel beim Vier-Uhr-Tee an dem Teakholztisch, den Joe von zu Hause mitgebracht hatte und den er einmal im Monat ölte. Unser Labor hatte eine ganz besondere Atmosphäre. Ich beschloß, mich der Neurochemie zuzuwenden. Joe wußte alles über mikrobielle Eisentransportmoleküle. Bei uns lief es nicht so ab, wie in vielen anderen Labors, in denen es der Arbeitskreisleiter lieber sieht, wenn man ihm bei seiner Karriere hilft, statt sich eigenen Arbeiten zu widmen. Bei Neilands war das ganz anders: Solange ich eine Doktorarbeit schrieb und die Doktorprüfung bestand, war es ihm egal, was ich sonst noch so trieb. Deshalb war ich in seiner Gruppe glücklich und folgte meiner eigenen Neugier, auch wenn sie mich in Vorlesungen über Musik führte; solange er der Meinung war, wir würden damit durchkommen, war es okay. Der Fachbereich zahlte mir ein monatliches Stipendium von den National Institutes of Health, und irgenvann, wußten wir, würde ich gehen müssen.

Nach sechs Jahren wandte ich mich mit einem Dokortitel und Vertrauen in mein Wissen nach Osten. Meine frisch Angetraute ging nach Kansas, um Medizin zu studieren, und ich folgte ihr. Das war 1972.

Ich hatte keine beruflichen Pläne, die sich in Kansas verwirklichen hätten lassen, und beschloß deshalb, Schriftsteller zu werden. Ich hatte aber noch keine Vorstellung davon, was eine Tragödie ist, und meine Charaktere waren flach. Ich wußte nicht, wie ich einen schlechten Charakter so beschreiben sollte, daß es für andere interessant ist.

Also mußte ich eine Tätigkeit als Wissenschaftler finden. Ich bekam eine Stelle an der Medical School und arbeitete dort mit zwei Kinderherzspezialisten und einem Pathologen zusammen. Es war ein glückliches Zusammentreffen. Zum einen sind Kinderärzte immer die nettesten Ärzte, und zum anderen waren gerade diese Ärzte etwas Besonderes: Leone Mattioli, dessen Frau sehr gut kochen konnte, Agostino Molteni und Richard Zakheim. Zwei Jahre betrieb ich medizinische Forschung, lernte von zwei Italienern und einem New Yorker Juden die Werte der „Alten Welt“ zu schätzen und außerdem etwas Humanbiologie.

Nach dem Scheitern meiner Ehe ging ich nach Berkeley zurück, arbeitete zunächst in einem Restaurant und danach an der University of California in San Francisco, wo ich Ratten für die

Hirnentnahme tötete. Ich hörte einen Vortrag von Max Delbrück, aber ich glaube nicht, daß ich seine Bedeutung verstand. Auch wurde ich durch ihn nicht zu einer Beschäftigung mit der Molekularbiologie angeregt. Ich arbeitete über Enkephaline.

Aber dann besuchte ich ein Seminar, in dem die Synthese und das Klonen eines Gens für Somatostatin beschrieben wurde. Das beeindruckte mich. Zum ersten Mal erkannte ich, daß wesentliche Teile der DNA chemisch synthetisiert werden können und daß diese vermutlich hochinteressant sind. Ich ging in die Bibliothek, um über DNA-Synthesen nachzulesen, und ich fing an, einen Job zu suchen, bei dem ich DNA-Moleküle synthetisieren würde.

Cetus stellte mich im Herbst 1979 ein. Ich arbeitete jeden Tag sehr lange, und das gefiel mir. Die DNA-Synthese machte viel mehr Spaß als das Töten von Ratten, und die Gegend von San Francisco war für solche Arbeiten ideal: Es gab eine ganze Reihe von Biotechnologie-Firmen und Forschungsgruppen, die an Verbesserungen der Methoden zur DNA-Synthese arbeiteten. Nach zwei Jahren stand in meinem Labor ein Gerät von Bioscience in San Rafael, Kalifornien, das Oligonucleotide schneller ausspuckte, als sie die Molekularbiologen bei Cetus verbrauchen konnten. Ich fing an, mit den Oligonucleotiden herumzuspielen, um zu sehen, wozu sie in der Lage sind.

Mein Nachbarlabor leitete Henry Erlich; dort wurde nach Methoden zum Nachweis von Punktmutationen gesucht. Wir hatten eine Reihe von Oligonucleotiden für sie hergestellt. Ich fing an, über ihr Problem nachzudenken und schlug ihnen etwas vor, das sie schließlich Oligomerrestriktion nannten. Es funktionierte, solange die Zielsequenz ziemlich konzentriert vorlag, wie eine Stelle auf einem gereinigten Plasmid, versagte jedoch, wenn die Stelle relativ selten war, wie ein einzelnes Gen in menschlicher DNA.

Ich bitte die unter Ihnen um Entschuldigung, die mir jetzt nicht mehr folgen können, aber ich muß nun auf ein paar Dinge zu sprechen kommen, die schwierig sind. Doch ich werde rasch zu meiner Geschichte zurückkehren.

Voraussetzung für die Methode der Oligomerrestriktion ist, daß das interessierende Zielsystem eine polymorphe Restriktionsstelle aufweist. Daher ist das Verfahren nicht auf alle Punktmutationen anwendbar. Ich fing an, über Experimente nachzudenken, mit denen ein Oligonucleotid, das mit einer bestimmten Stelle der DNA hybridisiert ist, durch DNA-Polymerase nur in Gegenwart von Didesoxynucleosidtriphosphaten verlängert werden könnte. Ich überlegte mir, daß bei vier parallelen Ansätzen, bei denen jeweils eines der Triphosphate radioaktiv markiert wäre, mit Hilfe eines Sequenzierungsgels anschließend festgestellt werden könnte, welches der Triphosphate an das hybridisierte Oligonucleotid gebunden hat und damit welche Nucleobase dem 3'-Ende des Oligonucleotids benachbart ist. Das wäre so etwas wie eine Sanger-Sequenzierung an einem einzigen Basenpaar.

Mit Human-DNA würde ein solcher Versuch nicht funktionieren, denn das Oligonucleotid würde nicht spezifisch an eine Stelle binden. Bei einer so komplexen DNA wie der menschlichen würde es vielmehr an Hunderte oder sogar Tausende von Stellen binden, je nachdem, welche Sequenz untersucht und unter welchen Bedingungen gearbeitet würde. Was ich brauchte, um das Verfahren durchführbar zu machen, war eine Methode, mit der die Konzentration der interessierenden Stelle gezielt er-

höht werden konnte. Was ich brauchte, war die PCR, aber ich hatte über diese Möglichkeit noch nicht nachgedacht. Ich kannte den zahlenmäßigen Unterschied zwischen 5000 Basenpaaren in einem Plasmid und den 3 Milliarden Basenpaaren des menschlichen Genoms, aber irgendwie wurde mir seine Bedeutung nicht richtig bewußt. Diese Ignoranz war hier jedoch von Nutzen. Ich dachte weiter über mein Experiment nach, ohne daß mir klar wurde, daß es nie funktionieren würde. Und es entwickelte sich die PCR daraus.

Eines Freitagnachts fuhr ich wie üblich von Berkeley hinauf nach Mendocino, wo ich eine kleine Hütte ganz abgelegen in den Wäldern hatte. Meine Freundin, Jennifer Barnett, schlief neben mir. Ich dachte nach. Da Oligonucleotide inzwischen recht einfach zugänglich waren, sollte nichts leichter sein, als zwei statt einem in der Reaktion einzusetzen. Eines müßte an den oberen, das andere an den unteren Strang binden, und zwar so, daß ihre 3'-Enden jeweils einer der beiden Basen des interessierenden Basenpaares benachbart wären. Wenn eines der beiden Oligonucleotide länger wäre als das andere, ließen sich die durch Anbinden einer weiteren Base entstandenen Produkte durch Gelelektrophorese trennen und als wechselseitige Kontrollverbindungen nutzen. Ich würde sie sowieso auf einem Gel von den in großem Überschuß vorhandenen radioaktiven Nucleosidtriphosphaten trennen müssen. Was ich dann hoffentlich sehen würde, wäre, daß das eine Oligonucleotid eines der radioaktiven Nucleotide und das andere das komplementäre enthielte. Jede andere Kombination würde bedeuten, daß etwas schief gegangen war. Es wäre keine perfekte, aber dafür eine leicht durchzuführende Kontrolle. Diese Überlegungen sollten mich zur PCR führen.

Ich mochte die Idee einer Kontrolle, die fast nichts kosten würde - weder an Geld noch an Zeit. Und es würde dazu beitragen, die Oligonucleotide zu verbrauchen, die in meinem Labor nun schneller produziert wurden, als sie eingesetzt werden konnten.

Bei dieser nächtlichen Fahrt durch die Berge hingen die Blütenstände der voll aufgeblühten kalifornischen Roßkastanien über die Straße, und die Luft war feucht, kühl und mit ihrem schweren Duft erfüllt.

Ermutigt durch die Fortschritte bei meinem Gedankenexperiment dachte ich weiter darüber nach und auch über die Dinge, die möglicherweise schief gehen könnten. Was würde zum Beispiel passieren, wenn die DNA-Probe Desoxynucleosidtriphosphate enthielte? Sicherlich würde eines oder mehrere durch die Polymerase an das Oligonucleotid gebunden, bevor durch Anbinden des Didesoxynucleosidtriphosphats der Kettenabbruch ausgelöst würde. Dabei könnte natürlich leicht auch das falsche Didesoxynucleosidtriphosphat gebunden werden, das Produkt der Verlängerung hätte die falsche Länge, und es resultierten falsche Ergebnisse. Es würde nicht funktionieren. Ich mußte einen Weg finden, um sicherzustellen, daß die Probe keine Desoxynucleosidtriphosphate enthielt. Ich könnte die Probe vor der Verlängerung mit bakterieller alkalischer Phosphatase behandeln. Das Enzym würde alle Triphosphate zu Nucleosiden abbauen, die bei der Hauptreaktion nicht mehr stören würden. Doch dann müßte ich die Phosphatase deaktivieren, bevor ich die Didesoxynucleosidtriphosphate zugeben könnte. Damals wußte jeder, daß BAP, wie wir das Enzym nannten, durch Erhitzen nicht irreversibel denaturiert werden kann. Wir wußten es

deshalb, weil die Renaturierung von hitzedenaturierter BAP in klassischen Experimenten gezeigt worden war, die bewiesen hatten, daß die Gestalt eines Proteins durch seine Sequenz festgelegt ist. In diesen Experimenten war die Renaturierung in einem Puffer, der große Mengen an Zink enthielt, durchgeführt worden. Was weder mir noch offenbar anderen in den Sinn gekommen war, war die Tatsache, daß BAP möglicherweise irreversibel denaturiert werden konnte, wenn der Puffer zinkfrei war, und daß Zink im Puffer nicht nötig war, solange das Enzym nur kurze Zeit verwendet werden sollte und zu Beginn sein eigenes, fest gebundenes Zink enthielt. Damals gab es auf dem Markt ein Produkt namens matBAP, in dem das Enzym an eine unlösliche Matrix gebunden vorlag, so daß es nach seiner Verwendung von der Lösung abfiltriert werden konnte. Es verkaufte sich gut, weil die Leute der Meinung waren, daß man BAP nicht irreversibel denaturieren kann. Wir hatten alle von den klassischen Arbeiten gehört, aber wir hatten sie nicht gelesen.

Das sagt etwas aus über die Zufälle, die bei der Aufnahme wissenschaftlicher Ergebnisse in den Erfahrungsschatz eine Rolle spielen; für meine Geschichte ist davon jedoch nur wichtig, daß ich, hätte ich damals gewußt, daß BAP durch Erhitzen irreversibel denaturiert werden kann, möglicherweise die PCR nicht entdeckt hätte. Ich entschied mich also gegen die Verwendung der BAP und suchte nach anderen Wegen, um Desoxynucleosidtriphosphate aus der Probe zu entfernen.

Wie wäre es damit, dachte ich: Ich verzichte auf die radioaktiven Didesoxynucleosidtriphosphate, mische die DNA-Probe einfach mit den Oligonucleotiden, tropfe die Polymerase zu und warte. Die Polymerase sollte alle in der Probe vorhandenen Desoxynucleosidtriphosphate aufbrauchen, indem sie sie an das hybridisierte Oligonucleotid band. Anschließend könnte ich die Mischung erhitzen, so das verlängerte Oligonucleotid von der Zielsequenz trennen und dann die Mischung wieder abkühlen, damit neues unverlängertes Oligonucleotid hybridisieren könnte. Die verlängerten Oligonucleotide wären gegenüber den nicht verlängerten in verschwindend kleiner Zahl vorhanden und würden deshalb nicht in nennenswertem Umfang mit der Zielsequenz rehybridisieren. Anschließend würde ich die Mischung der Didesoxynucleosidtriphosphate und ein weiteres Äquivalent Polymerase zugeben, und die Sache würde funktionieren.

Aber was würde passieren, wenn die Oligonucleotide in der ersten Verlängerungsreaktion so stark verlängert würden, daß sie im zweiten Durchgang mit unverlängerten Oligonucleotiden der entgegengesetzten Polarität hybridisierten. Die Sequenz ihrer Verlängerung würde das ermöglichen.

HEUREKA!!! Das Ergebnis wäre genau das gleiche, nur die Signalintensität würde verdoppelt.

Noch einmal HEUREKA!!! Ich könnte absichtlich dafür sorgen, indem ich meine eigenen Desoxynucleosidtriphosphate zugebe, die recht gut wasserlöslich und in Kalifornien legal sind.

Und noch einmal HEUREKA!!! Ich könnte es immer wieder machen, und jedesmal würde sich die Signalintensität verdoppeln. Für alle, die mir nicht mehr folgen konnten, jetzt wird's wieder leichter verständlich.

Ich hielt beim Meilenstein 46.7 auf dem Highway 128. Im Handschuhfach fand ich etwas Papier und einen Stift. Ich rechnete nach, daß zwei hoch zehn etwa tausend ist, zwei hoch zwanzig etwa eine Million und zwei hoch dreißig ungefähr eine

Milliarde, d. h. nahe der Zahl an Basenpaaren im menschlichen Genom. Nach dreißig Durchgängen könnte ich die Sequenz einer Probe mit einer enormen Signalintensität und nahezu ohne Rauschen lesen.

Jennifer wollte, daß wir weiterfahren. Ich fuhr die Straße entlang und nach etwa einer Meile kam mir in den Sinn, daß man die Oligonucleotide eigentlich auch in beliebigem Abstand voneinander, nicht nur als Nachbarn eines einzelnen Basenpaares, anordnen könnte, daß man damit jede beliebige Sequenz beliebig oft kopieren könnte, und vor allem, daß die meisten Kopien nach ein paar Durchgängen dieselbe Länge hätten. Die Entscheidung über diese Größe läge bei mir. Die Sequenzen würden auf einem Gel wie Restriktionsfragmente aussehen. Ich hielt wieder an.

„Beim Zeus!“, rief ich. Ich hatte die zwei ärgerlichsten Probleme der DNA-Chemie auf einen Schlag gelöst: das Problem der großen Zahl und das der Unterscheidung. Mit zwei Oligonucleotiden, DNA-Polymerase und den vier Nucleosidtriphosphaten würde ich so viel von einer DNA-Sequenz machen können, wie ich nur wollte, und ich könnte sie mit einem Fragment definierter Länge machen, das ich leicht erkennen würde.

Irgendwie, dachte ich, mußte das ein Traum sein. Wenn nicht, würde meine Idee die DNA-Chemie revolutionieren, und sie würde mich berühmt machen. Es war zu einfach. Irgend jemand hätte es sicherlich schon versucht, und ich hätte davon gehört. Wir würden es ständig machen. Was hatte ich übersehen? „Jennifer, wach auf, ich hab' mir etwas Unglaubliches ausgedacht.“

Sie wachte nicht auf. Ich hatte auch früher schon über unglaubliche Dinge nachgedacht, die jedoch bei Tageslicht immer einiges von ihrem Glanz verloren hatten. Die neue Idee konnte bis morgen warten. Aber ich schlief in jener Nacht nicht. Wir kamen zu meiner Hütte, und ich fing an, auf jede waagrechte Fläche, die beschreibbar war, sei es mit Kugelschreiber, Bleistift oder Kreide, bis zum Morgengrauen kleine Diagramme zu zeichnen. Erst dann fiel ich mit Hilfe einer letzten Flasche guten Cabernets aus dem Mendocino County in einen Halbschlaf.

Der Nachmittag kam und noch einige Flaschen der berühmten roten Flüssigkeiten aus Jack's Valley Store, aber ich war immer noch verwirrt und schwankte zwischen dem Gefühl absoluter Zufriedenheit mit meinem Schicksal und meinem Verstand und dem des Ärgers über mich und Jennifer Barnett, weil wir zu dumm waren, den Fehler zu entdecken, der irgendwo stecken mußte. Ich hatte kein Telefon in meiner Hütte, und es gab im ganzen Anderson Valley keine Biochemiker außer Jennifer und mir. Das Rätsel, das mich das ganze Wochenende nicht losließ und in mir den nicht gekannten Wunsch weckte, möglichst schnell wieder an die Arbeit zu kommen, war faszinierend. Wenn die Reaktionscyclen, die inzwischen auf viele Arten überall in der Hütte veranschaulicht waren, wirklich funktionierten, warum hatte ich nie davon gehört, daß sie jemand durchgeführt hätte. Wenn sie durchgeführt worden wären, hätte ich sicherlich davon gehört, und auch alle anderen, einschließlich Jennifer, die sich gerade am Teich sonnte und sich nicht für die Explosionen in meinem Gehirn interessierte, hätten es mitbekommen.

Warum sollten diese Reaktionen nicht möglich sein?

Am Montagmorgen war ich in der Bibliothek. Der Augenblick der Wahrheit. Am Nachmittag war es sicher. Aus welchen Gründen auch immer, es gab in der Abstracts-Literatur keine

Hinweise auf Erfolge oder Mißerfolge bei Versuchen, DNA durch wiederholte reziproke Verlängerung zweier Primer-Oligonucleotide, die mit den DNA-Einzelsträngen einer bestimmten Sequenz hybridisiert sind, zu vermehren. Am Ende der Woche hatte ich mit genug Molekularbiologen gesprochen, um sicher zu sein, daß ich nichts wirklich Offensichtliches übersehen hatte. Niemand konnte sich daran erinnern, daß ein solcher Versuch jemals durchgeführt worden wäre.

Was mich jedoch schockierte, war die Tatsache, daß keiner meiner Freunde oder Kollegen von den Möglichkeiten eines solchen Prozesses begeistert war. Es stimmt schon, ich hatte immer wieder verrückte Ideen, und diese wirkte vielleicht nicht so viel anders als die der letzten Woche. Aber sie **war** anders. In den ganzen Überlegungen gab es nicht eine Unbekannte. Jeder Teilschritt war bereits durchgeführt worden. Jeder gab zu, daß man einen Primer an einem DNA-Templat verlängern kann, und jeder wußte, daß man doppelsträngige DNA aufschmelzen kann. Jeder stimmte mir zu, daß man etwas, das man einmal machen kann, auch öfter machen kann. Die meisten Menschen, und ich im besonderen, machen ungern Dinge immer wieder. Wenn ich etwas zweimal rechnen mußte, schrieb ich lieber ein Programm dafür. Aber niemand war der Meinung, daß es unmöglich sei. Es sollte machbar sein, und später konnte man ja dann an Automatisierung denken. Die Ergebnisse sahen auf dem Papier so phantastisch aus, daß sogar mir ab und zu Zweifel daran kamen, daß es auch im Reagensglas funktionieren würde. Und so ziemlich jeder, der sich die Zeit nahm, mit mir darüber zu reden, sah sich gezwungen, irgendeinen Grund zu nennen, warum es nicht funktionieren würde. Es war nicht einfach, in dieser Zeit nach den Erfolgen des Klonens und vor der PCR die Tatsache zu akzeptieren, daß man alle DNA haben kann, die man will. Und daß es auch noch einfach möglich ist.

In meinem Computer gab es ein Verzeichnis ungeprüfter Ideen. Ich eröffnete eine neue Datei und nannte sie „polymerase chain reaction“. Ich wagte mich nicht sofort an ein Experiment, aber den ganzen Sommer über sprach ich darüber mit Leuten innerhalb und außerhalb der Firma. Etwa im August beschrieb ich das Konzept in einem internen Seminar. Jeder wissenschaftliche Mitarbeiter bei Cetus mußte zweimal im Jahr einen Vortrag halten. Aber niemand mußte zuhören. Die meisten Vorträge waren trockene Versuchsbeschreibungen, und die meisten Zuhörer gingen früh und ohne Kommentare abzugeben.

Ein oder zwei Techniker zeigten Interesse, und an den Tagen, an denen Jennifer und ich uns noch verstanden, glaubte auch sie, daß es funktionieren könnte. An den immer zahlreicher werdenden Tagen aber, an denen Jennifer mich haßte, ernteten meine Ideen und ich nur Hohn und Spott.

Ich redete weiter darüber, und im Spätsommer hatte ich dann den Plan, ein Fragment des menschlichen Nervenwachstumsfaktors mit einer Länge von 400 Basenpaaren zu amplifizieren. Dieses Fragment war bei der Firma Genentech geklont und das Ergebnis in *Nature* veröffentlicht worden. Ich würde mit vollständiger menschlicher DNA aus der Placenta, die von der Firma Sigma vertrieben wurde, anfangen und darauf hoffen, daß die cDNA-Sequenz von einem einzigen Exon stammte. Ich würde keine cDNA-Bibliothek, keine Kolonien, überhaupt nichts brauchen. Es würde dramatisch sein. Ich würde alles auf eine Karte setzen. An Primer kam ich in meinem Labor, das Oligonucleotide für die ganze Firma herstellte, problemlos. Ich gab

die Sequenzen, die ich brauchte, in den Computer ein und stellte sie an den Anfang der Warteliste.

Mein Freund Ron Cook, der Gründer von Biosearch und Produzent des ersten erfolgreichen kommerziellen DNA-Synthetizers, war, soweit ich mich erinnern kann, der einzige Mensch, der in jenem Sommer meinen Enthusiasmus hinsichtlich dieser Reaktion teilte. Er wußte, sie würde dem Oligonucleotidgeschäft gut tun. Vielleicht glaubte er deshalb daran. Oder vielleicht ist er ein vernünftiger Chemiker mit klarem Verstand. Er gehört heute zu meinen besten Freunden, und deshalb ist mir ein objektives Urteil über ihn sicherlich nicht möglich. Vielleicht hätte ich seinem Rat folgen sollen, aber dann wäre alles anders gekommen, und ich würde wahrscheinlich nicht am Strand von La Jolla diese Zeilen schreiben, was mir viel Spaß macht. Vielleicht lebte ich statt dessen reich auf Tahiti. Denn er schlug eines Nachts in seinem Haus vor, ich solle doch, da mich bei Cetus niemand ernst nehme, kündigen, etwas warten, das Verfahren zum Laufen bringen, ein Patent schreiben und reich werden. Bei Reichtum dachte er nicht an 300 Millionen Dollar, sondern vielleicht an ein oder zwei Millionen. An jenem Abend war auch der berühmte Chemiker Albert Hofmann bei Ron eingeladen, der 1943 als erster LSD synthetisiert hatte. Damals verstand er nicht, was ihm gelungen war. Es dämmerte ihm erst allmählich, und dann entwickelten sich die Dinge in einer Weise, wie sie niemand vorhersehen oder mit Verstand und Vorbedacht kontrollieren hätte können.

Ich antwortete zurückhaltend auf Rons Vorschlag. Ich hatte meine Idee bei Cetus bereits vorgestellt, und wenn sie sich als kommerziell erfolgreich herausstellen würde, hätte ich ihre Rechtsanwälte mein Leben lang auf dem Hals. Ron war nicht davon überzeugt, daß Cetus Rechte an meinen Ideen hatte, solange sie nicht direkt mit meiner Tätigkeit zusammenhingen. Ich kannte die Gesetzeslage nicht genau, aber ich arbeitete gerne bei Cetus und hoffte naiverweise, daß mein Arbeitgeber sich schon großzügig zeigen würde, sollte die Reaktion ein Erfolg sein.

Das Thema PCR war damals noch nichts für ein Partysprach, auch nicht unter Biochemikern, und wurde deshalb rasch fallengelassen. Albert war viel interessanter, auch für mich. Er hatte an jenem Nachmittag einen sehr guten Vortrag bei Biosearch gehalten.

Meine Probleme mit Jennifer wurden auch nicht geringer. Diese Nacht war keine Ausnahme. Ich fuhr allein nach Hause und fühlte mich ziemlich elend, auf keinen Fall in der Stimmung, meine Arbeit aufzugeben oder groß etwas an dem, was noch an Stabilität in meinem Leben geblieben war, zu ändern. Die PCR schien, verglichen mit unserem entsetzlich leeren Haus, weit weg und sehr klein zu sein.

Im September führte ich das erste Experiment durch. Ich versuche immer gern zunächst den einfachsten Weg. Daher gab ich eines Nachts menschliche DNA und die Primer für den Nervenwachstumsfaktor in ein kleines Schraubglas mit O-Ring und purpurfarbenem Verschuß, kochte die Mischung einige Minuten, kühlte sie ab, gab etwa zehn Einheiten DNA-Polymerase zu, verschloß das Glas und ließ es bei 37°C stehen. Es war Mitternacht, der 9. September. Ich goß ein kühles Becks-Bier in ein 400mL-Becherglas, startete ein paar Minuten in mein Notizbuch und verließ dann das Labor.

Auf dem Nachhauseweg stellte ich mir vor, wie die Primer sofort verlängert würden, und ich hoffte, daß sich die verlänger-

ten Oligonucleotide mit einer endlichen Geschwindigkeit von ihren Templaten lösen, wieder mit einem Primer reagieren und wieder kopiert würden und daß das immer so weiter gehen würde. Mir behagte die Vorstellung, immer wieder erhitzen, abkühlen und Polymerase zugeben zu müssen, überhaupt nicht, und ich hielt das nur für die letzte Möglichkeit, die Kettenreaktion zu erreichen. Ich dachte an DNA-DNA-Wechselwirkungen als etwas Reversibles mit allen dazugehörigen Verzweigungen. Ich machte mir keine Sorgen über die absolute Dissoziationsgeschwindigkeit, weil mir egal war, wie lange die Reaktion brauchte, solange niemand dabei etwas tun mußte. Ich nahm an, daß es immer eine gewisse Konzentration an Einzelstrang-DNA gäbe, die für eine Reaktion mit dem in relativ hoher Konzentration vorliegenden Primer nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung zur Verfügung stünde.

Bei einer Reaktion mit dem Potential, das ich für diese erträumte, sollte die Zeit nur von geringer Bedeutung sein, vor allem angesichts der Tatsache, daß kein anderes Verfahren dasselbe ermöglichte. Daß es überhaupt funktionierte, das wäre das Entscheidende. Am zweitwichtigsten wäre dann, ob es leicht durchzuführen ist. Erst dann käme der Zeitbedarf ins Spiel.

Am nächsten Mittag ging ich ins Labor und nahm eine Zwölf-Stunden-Probe. Mit Ethidiumbromid ließ sich nicht die Spur einer 400-Basenpaar-Bande nachweisen. Ich hätte nochmal hundert Jahre warten können, da ich keine Ahnung hatte, wie groß die absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten waren. Aber ich beugte mich langsam der Einsicht, daß mir nichts anderes übrig blieb, als die Reaktionstemperatur zwischen der Temperatur für den Einzelstrang- und der für den Doppelstrangzustand hin und her zu wechseln. Das bedeutete zugleich, daß die thermisch nicht stabile Polymerase nach jedem Zyklus neu zugegeben werden mußte.

Die nächsten drei Monate, in denen mein Leben mit Jennifer zu Hause und in der Arbeit immer mehr zerbrach, machte ich sporadisch weitere Versuche. Es ging langsam voran. Schließlich gab ich den Plan auf, mit menschlicher DNA anzufangen. Ich war mir nicht einmal ganz sicher, daß die Genentech-Sequenz aus dem *Nature*-Artikel von einem einzigen Exon stammte. Ich wandte mich deshalb einem etwas kleiner dimensionierten Ziel zu, einem kleinen Fragment von pBR322, einem gereinigten Plasmid. Das erste erfolgreiche Experiment machte ich am 16. Dezember. Ich erinnere mich an dieses Datum, weil es der Geburtstag meiner früheren Frau Cynthia aus Kansas City war,

die mich ermutigt hatte, Romane zu schreiben und die mir zwei Söhne geschenkt hatte. Ich hatte sie schließlich verlassen, um zwei aufreibende Jahre mit Jennifer zusammen zu sein. Wenn ich aus irgendeinem Grund traurig war, trauerte ich immer auch um Cynthia. Es gibt anscheinend eine Stelle im Kopf, die für die „Trauer um vergangene Beziehungen“ reserviert ist. Dieser Bereich wird im Laufe des Lebens immer größer und bringt einen schließlich gegen seinen Willen dazu, Country Music anzuhören.

Und nun im Dezember, als Weihnachten vor der Tür stand, hatte Jennifer, diese verrückte, wunderbare Chemikerin, unser Haus und unser Labor verlassen und war zu ihrer Mutter nach New York gegangen, aus Gründen, die irgendwie mit mir zu tun haben mußten, die ich aber nicht verstand. Ich fing statt dessen an zu verstehen, was eine Tragödie ist. Sie unterscheidet sich stark von dem Pathos, das man in Büchern findet. Eine Tragödie ist etwas Persönliches. Sie würde meinen Charakter festigen und eines Tages meinem Schreiben Tiefe geben. Damals hätte ich jedoch eine warmherzige Freundin, mit der zusammen ich kochen hätte können, vorgezogen. Merke: Der Dezember ist ein bescheuerter Monat, um Dein Liebesleben aus der Distanz zu betrachten.

Ich feierte meinen Erfolg mit Fred Faloona, einem jungen Mathematiker und Tausendsassa, den ich als Techniker eingestellt hatte. Fred hatte mir an jenem Nachmittag geholfen, diese erste erfolgreiche PCR in Gang zu bringen, und ich hielt auf dem Nachhauseweg bei seinem Haus an. Da er alles, was er über Biochemie wußte, von mir gelernt hatte, wußte er nicht, ob er mir glauben sollte oder nicht, als ich ihm sagte, daß wir gerade die Regeln der Molekularbiologie umgestoßen hätten. „Okay, Doc, if you say so.“ Er wußte, daß ich mir mehr Gedanken über mein Privatleben als über diese niedlichen kleinen Gläser mit ihren purpurfarbenen Verschlüssen machte.

In Berkeley nieselt es im Winter häufig. Avocados reifen zu unüblichen Zeiten, und der Baum in Freds Vorgarten war naß und wurde von der Last seiner Früchte beinahe erdrückt. Ich fühlte mich ebenfalls sehr niedergedrückt, als ich zu meinem kleinen silberfarbenen Honda Civic hinausging, der immer ganz brav ansprang. Weder Fred noch mehrere geleerte Flaschen Becks-Bier oder der süße Duft des heraufziehenden PCR-Zeitalters konnten Jenny ersetzen. Ich war allein.

Eingegangen am 17. Januar 1994 [A 49]
Übersetzt von Dr. Elisabeth Weber, Weinheim