

Synthetische DNA und die Biologie (Nobel-Vortrag)**

Michael Smith*

Most of the significant work has been summarized in a number of reviews and articles. In these there was, of necessity, a good deal of simplification and omission of detail.... With the passage of time, even I find myself accepting such simplified accounts.

F. Sanger^[1]

Einleitung

Ich hatte das Glück, im September 1956, gerade einen Monat nach der zufälligen Entdeckung der Phosphodiestermethode für die chemische Synthese von Desoxyribooligonucleotiden^[2], zur Gruppe von Gobind Khorana zu stoßen. Es handelt sich dabei um die Synthesemethode, deren vollständige Ausnutzung zur Aufklärung des genetischen Codes und zur ersten Totalsynthese eines Gens^[3-5] führte. Ein wichtiges Kennzeichen des Khorana-Ansatzes zur Produktion synthetischer Polynucleotide, um mit ihnen biologische Probleme zu lösen, war die Bereitschaft, sowohl chemische als auch enzymatische Verfahren zu nutzen^[5, 6]. Diese Vielseitigkeit ist die Grundlage aller Verfahren, die in der modernen Molekulargenetik angewendet werden^[7-9]. Sie hatte einen wesentlichen Einfluß auf mein Denken.

Während meiner Zeit als Postdoktorand in der Khorana-Gruppe war ich hauptsächlich an der Synthese kleiner Moleküle wie der Nucleosid-5'-triphosphate^[10] und der cyclischen Nucleosid-3',5'-phosphate^[11] beteiligt. Ich konnte jedoch durch die Entwicklung der Methoxytrityl-5'-Hydroxyschutzgruppen^[12] und mit einer ersten Methode zur chemischen Synthese von Ribooligonucleotiden^[13] auch zur Entwicklung der Techniken zur Polynucleotidsynthese beitragen.

1961 verließ ich Khoranas Gruppe und wechselte zum Fisheries Research Board of Canada Vancouver Laboratory. Obwohl sich der größte Teil meiner Forschung auf Studien zur Physiologie und Endokrinologie der Lachse konzentrierte, konnte ich doch auch die Studien zur Chemie der Phosphodiester-Synthese fortsetzen. Diese führten zu einer neuen Methode für die Synthese von cyclischen Nucleosid-3',5'-phosphaten durch wasserfreie alkalische Umesterung, eine Reaktion, die Schutzgruppen an den heterocyclischen Basen unnötig machte^[14, 15].

1966 wurde ich Fakultätsmitglied des Department of Biochemistry der University of British Columbia, die bis heute meine akademische Heimat blieb. Die Studien über Oligonucleotidsynthesen wurden fortgesetzt, vor allem im Hinblick auf die Reaktion von Desoxyribonucleosidphosphorfluoridaten unter wasserfreien, alkalischen Bedingungen^[16]. Dieser Methode, die ohne Schutzgruppen für die Basen auskam und deshalb einen wesentlichen Fortschritt bedeutete, fehlte allerdings die Allgemeingültigkeit, die für eine universelle Synthesemethode unabdingbar ist^[17, 18].

Ein Versuch zur Desoxyribooligonucleotidsynthese, der sich als vielseitig, einfach und nützlich, allerdings ineffizient herausstellte, nutzte die Verlängerung kurzer Primerstücke mit Hilfe der Polynucleotid-Phosphorylase aus *E. coli* in Gegenwart von Mn²⁺ und NaCl und mit Desoxyribonucleosid-5'-diphosphaten als Substraten^[19-22]. Dieses Verfahren ermöglichte die Synthese von Desoxyribooligonucleotiden mit einer Länge von 12 bis 13 Nucleotiden und erwies sich als bedeutsamer Durchbruch für unsere kleine Gruppe, da es uns zwischen 1970 und 1980 (zu einer Zeit, in der Oligonucleotide noch nicht allgemein zugänglich waren) ermöglichte, eine Reihe ziemlich ehrgeiziger molekulärbiologischer Projekte anzugehen. Natürlich hat es inzwischen durch das Aufkommen automatisierter chemischer Synthesen (die immer noch Methoxytrityl als Schutzgruppe nutzen) mit Nucleosid-3'-phosphoroamiditen als wichtigsten Zwischenprodukten^[23-25] als Routineverfahren an Bedeutung verloren.

Modellstudien zur Stabilität und Spezifität von Oligonucleotid-Doppelhelices

1968 wurden geplante Studien zur Biosynthese von Lachsprotein^[26] und zur Sequenz dA,dT-reicher Krabben-DNA^[27] aus personellen und technischen Gründen unmöglich. Auf der Suche nach einem neuen Projekt schlug ich meiner Doktorandin Caroline Astell eine Reihe von Modellstudien mit chemisch synthetisierten Oligonucleotiden vor, um die Stabilität und Spezifität von Oligonucleotid-Doppelsträngen definierter Sequenz zu bestimmen. Ziel war es herauszufinden, ob synthetisch zugängliche Oligonucleotide über die Bildung von Watson-Crick-Paaren Hilfsmittel bei der Identifizierung und Isolierung spezifischer mRNAs sein können. Unter statistischen Gesichtspunkten sollte es möglich sein, denn die für die Einzigartigkeit eines Oligonucleotids in einem gegebenen Genom notwendige Länge reicht von 9 Nucleotiden für λ -Phagen mit einem Genom von 4.6×10^4 Basenpaaren bis zu 18 für höhere Pflanzen wie *A. cepa* mit

[*] Prof. M. Smith
Biotechnology Laboratory and Department of Biochemistry
The University of British Columbia
237-6174 University Boulevard, Vancouver, B.C. V6T 1Z3 (Kanada)

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

Tabelle 1. DNA-Gehalt haploider Genome und die für eine spezifische Erkennung notwendige Oligonucleotidlänge [a].

Organismus	Z [b]	N [c]	Organismus	Z [b]	N [c]
Viren			Pflanzen		
λ -Phage	4.6×10^4	9	<i>C. reinhardtii</i>	10^8	14
Bakterien			<i>A. thaliana</i>	10^8	14
<i>D. pneumoniae</i>	1.7×10^6	11	<i>Z. mays</i>	6.6×10^9	17
<i>E. coli</i>	4.1×10^6	12	<i>A. cepa</i>	1.5×10^{10}	18
Pilze			Tiere		
<i>S. cerevisiae</i>	1.7×10^7	13	<i>C. elegans</i>	10^8	14
<i>N. crassa</i>	2.1×10^7	13	<i>D. melanogaster</i>	1.3×10^8	14
			<i>B. rerio</i>	10^9	16
			<i>M. musculus</i>	2.2×10^9	17
			<i>H. sapiens</i>	3.3×10^9	17

[a] Das Oligonucleotid erkennt spezifisch, wenn $4^N \geq 2 \times Z$. [b] Z = Zahl der Basenpaare im Genom. [c] N = Zahl der Nukleotide im Oligonucleotid.

einem Genom von 1.5×10^{10} Basenpaaren (Tabelle 1). Ferner waren die Arbeiten von Michelson und Monny^[28] und von Niyogi und Thomas^[29] über die Wechselwirkungen zwischen Ribooligonucleotiden und Ribopolynucleotiden in diesem Zusammenhang wichtig, denn sie zeigten, daß schon bei sieben Basenpaaren stabile Doppelhelices gebildet werden können und, ebenso wichtig, daß jedes zusätzliche Basenpaar, bis zu 16 Basenpaaren, zu einem deutlichen Anstieg der Duplexstabilität

führt (Abb. 1). Die Arbeiten von Gilham et al. zeigten die potentielle Eignung von kovalent an Cellulose gebundenen Oligothymidylaten willkürlicher Länge für die Affinitätschromatographie^[30, 31], die zu einem wichtigen Verfahren für die Isolierung eukaryontischer mRNAs führte^[32]. Während es Daten über die Duplexstabilität mit DNA für *Mischungen* von Oligonucleotiden definierter Länge gab^[33, 34], waren keine systematischen Untersuchungen mit reinen Oligonucleotiden definierter Sequenz und Länge bekannt.

Wir wollten Desoxyribooligonucleotid-Cellulosen aus einfachen Oligonucleotiden definierter Länge und Sequenz, die nach der Khorana-Methode synthetisiert worden waren, herstellen und diese dann in Säulen dazu verwenden, durch thermisches Eluieren die Stabilität von Doppelsträngen mit einer Vielzahl von komplementären oder teilweise komplementären Desoxyribo- und Ribooligonucleotiden zu bestimmen^[35–38]. Die Ergebnisse und Schlußfolgerungen aus dieser zeitraubenden, aber wichtigen Versuchsreihe wurden bereits ausführlich beschrieben^[39]; hier sollen nur einige besonders interessante Punkte diskutiert werden.

Es zeigte sich, daß bei der richtigen Ionenstärke stabile Doppelstränge bereits bei sechs dA-dT-Basenpaaren entstehen können (Abb. 2) und daß zusätzliche Basenpaare die Stabilität deutlich, aber nicht linear erhöhen, wobei die Stabilitätssteigerung mit zunehmender Länge abnimmt. Außerdem verringerte ein einziger Basenpaarungsfehler (dT mit dT oder dT mit dG) die Duplexstabilität jeweils um den gleichen Betrag (der etwa dem beim Entfernen von zwei Basenpaaren entspricht). Die Duplexbildung ist allerdings trotzdem bei niedrigen Temperaturen noch möglich (Abb. 2). Zusätzlich wurde deutlich, daß sich Oligonucleotiddoppelstränge bei niedrigen Temperaturen schnell bilden, also bei Bedingungen, bei denen denaturierte DNA-Doppelstränge nicht renaturieren.

Diese Experimente überzeugten mich davon, daß es möglich sein müßte, mit Hilfe eines synthetischen Oligonucleotids eine RNA oder DNA mit der nach Watson und Crick exakt komplementären Sequenz zu identifizieren und sie von ähnlichen, aber nicht identischen Sequenzen zu unterscheiden. Eine Möglichkeit, dieses Prinzip zu

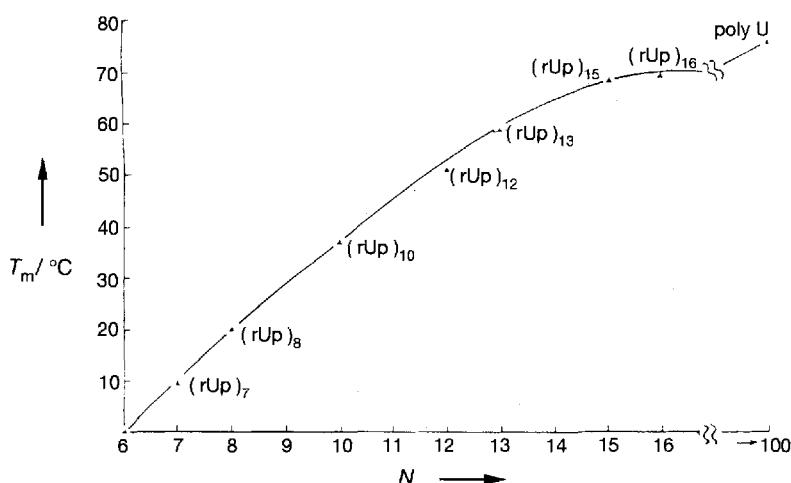


Abb. 1. Die Beziehung zwischen der Länge von Oligouridylyl-Nukleotiden und der T_m von Doppelhelices mit Polyadenylat in 0.02 M NaCl, 0.01 M Natriumkakodylat (= Me₂As(O)ONa), pH 7.0 [28]. N = Zahl der Uridinreste.



Michael Smith, geboren am 26. April 1932 in Blackpool, Großbritannien, studierte von 1950 bis 1953 Chemie an der University of Manchester. 1956 promovierte er dort bei H. B. Henbest über Cyclohexandole. Anschließend ging er als Postdoc zu Gobind Khorana nach Vancouver, um über biologisch wichtige Organophosphate zu arbeiten. 1960 wechselte er gemeinsam mit ihm an das Institute for Enzyme Research an der University of Wisconsin und befaßte sich vor allem mit der Synthese von Ribooligonucleotiden. Von 1961 bis 1966 arbeitete er für das Fisheries Research Board of Canada Laboratory auf dem Gelände der University of British Columbia in Vancouver und wurde dann als Medical Research Associate of the Medical Research Council of Canada an diese Universität berufen. 1986 baute er ein neues interdisziplinäres Institut, das Biotechnology Laboratory, auf. In den letzten Jahren war er vor allem mit administrativen Aufgaben betraut.

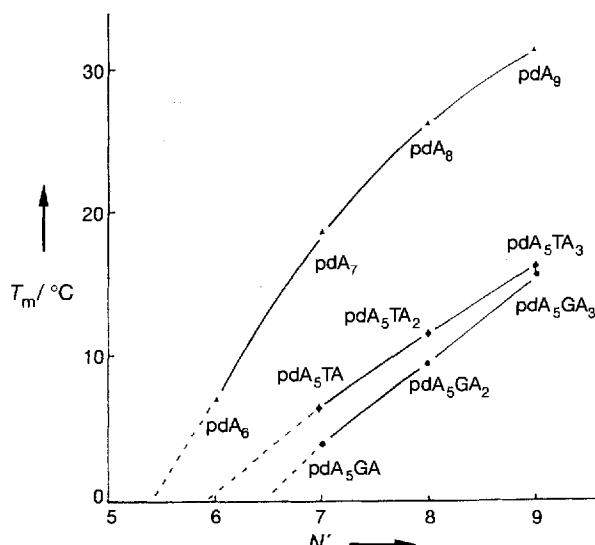


Abb. 2. Die T_m -Werte von Doppelhelices komplementärer Oligodesoxyribonucleotide mit Cellulose-pdT₀ in 1 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, pH 7,0 [38]. Die Oligodesoxyribonucleotide für die beiden unteren Kurven enthielten jeweils eine nicht zu pdT₀ passende Nucleobase. N' = Zahl der Desoxyribonucleotidreste.

demonstrieren, ergab sich durch Mutanten des Lysozym-codierenden Locus des Phagen T4^[40]. Später brachten mich die Daten ferner darauf, daß es möglich sein müßte, kurze synthetische Oligonucleotide als spezifische Mutagene zu nutzen und damit auch zwischen Punktmutanten und Wildtyp-DNA zu unterscheiden.

Unsere Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Desoxyribooligonucleotid-Cellulosen und Ribooligonucleotiden bestätigten die Ergebnisse früherer Studien zur relativen Stabilität von DNA-DNA- und DNA-RNA-Doppelsträngen^[39, 41]. Sie enthüllten außerdem ein weiteres wichtiges Prinzip: Ein dT-rG-Basenpaar ist relativ stabil (Abb. 3). Unterschiede in der Stabilität von dT-dG- und dT-rG-Basenpaaren (vgl. Abb. 2 und 3) spiegeln vermutlich Unterschiede in den in den B- und A-Formen von Doppelhelices erlaubten Basenpaarungen wider^[42].

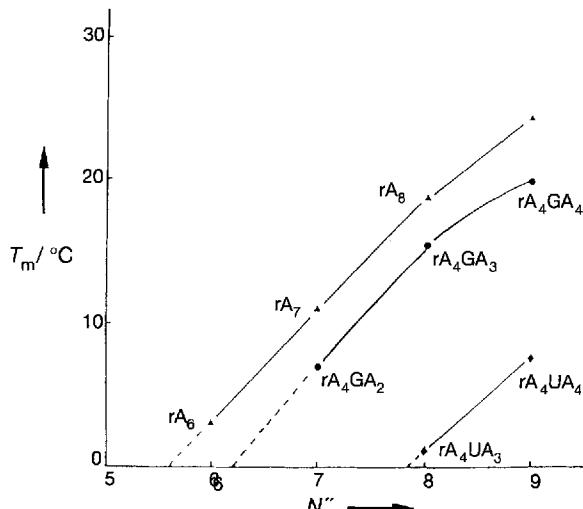


Abb. 3. Die T_m -Werte von Doppelhelices komplementärer Oligoribonucleotide mit Cellulose-pdT₀ in 1 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, pH 7,0 [38]. Die Oligoribonucleotide für die beiden unteren Kurven enthielten jeweils eine nicht zu pdT₀ passende Nucleobase. N'' = Zahl der Ribonucleotidreste.

Diese Beobachtung hat zwei praktische Konsequenzen. Erstens wird die spezifischste und stringenteste Wechselwirkung einer Oligonucleotidsonde diejenige zwischen einem Desoxyribooligonucleotid und DNA sein. Zweitens kann man nicht davon ausgehen, daß Doppelstränge, die von RNA gebildet werden, ebenso von DNA oder Desoxyribooligonucleotiden gebildet werden. Deshalb war ich immer erstaunt über die allgemeine Akzeptanz der Annahme, daß sich Desoxyinosin bei der Basenpaarung ungewöhnlich benimmt, weil Inosin dies bei tRNA-Doppelstrangwechselwirkungen tut. Studien mit Desoxyinosin weisen darauf hin, daß es als ein spezifisches Analogon von Desoxyguanosin fungiert, obwohl es nicht wie Desoxyguanosin mit sich selbst aggregiert^[7, 8, 43].

Die genannten empirischen Studien und verwandte, die ich hier nicht bespreche^[39], inspirierten, ja verpflichteten uns, synthetische Desoxyribooligonucleotide als Sonden für die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente, als Primer für die direkte Sequenzierung doppelsträngiger DNA, als Primer für die genaue Definition der Enden von mRNAs, als spezifische Mutagene und als Werkzeuge für die Identifizierung und Isolierung von Punktmutationen zu nutzen.

Desoxyribooligonucleotide als DNA-Sonden

Am Anfang der im vorigen Abschnitt beschriebenen Modellstudien, 1968, stand die Absicht, eine Methode für die Isolierung spezifischer mRNAs durch Affinitätschromatographie zu entwickeln. Allerdings machte die Entwicklung des vollen Spektrums von DNA-Klonierungstechniken in den frühen siebziger Jahren^[19] deutlich, daß das Hauptziel bei der Arbeit mit synthetischen Desoxyribooligonucleotiden eine Methode zum Verfolgen der Genisolierung sein sollte. Gespräche mit Dr. Benjamin D. Hall machten mich auf die Studien von F. Sherman über doppelte Leserahmen-Mutanten von Hefe-Cytochrom c^[44] aufmerksam. Die Kenntnis der Aminosäuresequenzen dieser Mutanten ermöglichte die eindeutige Voraussage der N-terminalen kodierenden Sequenz und lieferte so ein spezifisches Ziel für ein Oligonucleotid definierter Sequenz. Attraktiv war ein Hefegen als erstes Ziel auch deshalb, weil die für eine spezifische Sonde benötigte Oligonucleotidlänge von 13 Nucleotiden (Tabelle 1) nahe an der Grenze unserer enzymatischen Synthesemethode lag^[19, 21, 22]. Die benötigte Sonde wurde mit der enzymatischen Methode synthetisiert^[45] und, wenn auch mit einigen Schwierigkeiten^[46], zur Isolierung des Gens genutzt. Dies zeigt die Gültigkeit des Prinzips, daß ein synthetisches Oligonucleotid als Sonde bei der Genisolierung dienen kann. Die anschließende Verallgemeinerung der Methode durch den Einsatz von Oligonucleotidmischungen^[47, 48] machte diese Methode der Genisolierung zu einem leistungsfähigen Werkzeug der Molekulargenetik^[7, 8].

Sequenzierung doppelsträngiger DNA mit Oligonucleotid-Primern

Als das Iso-1-cytochrom-c-Gen isoliert wurde, waren die chemische Methode^[49] und die enzymatische Kettenenden-Methode zur DNA-Sequenzbestimmung^[50] gerade entwickelt worden. Die erste ist auf Doppelstrang-, die zweite auf Einzel-

strang-DNA anwendbar. Die Sequenzen der Enden des Eco-RI-Hind-III-DNA-Fragments, das die kodierende Sequenz für das Cytochrom *c* enthält, waren mit der chemischen Methode erhalten worden^[46]. Ich beschloß, die Möglichkeit einer direkten Sequenzierung doppelsträngiger DNA auf enzymatischem Weg mit Hilfe synthetischer Oligonucleotid-Primer zu untersuchen. Dabei folgte ich meiner Überzeugung, daß Oligonucleotide in Lösung mit dem komplementären Strang einer denaturierten DNA-Doppelhelix bei niedrigen Temperaturen hybridisieren sollten, auch wenn der zweite DNA-Strang anwesend ist und eine thermodynamisch viel stabilere Struktur bilden könnte. Die entscheidende Frage war, ob der zweite DNA-Strang unter den Bedingungen von Sangers enzymatischer Sequenzierung^[51] ein kurzes Oligonucleotid aus dem Komplex mit dem komplementären DNA-Strang verdrängen würde. Das erste Experiment war rundum erfolgreich, ein enorm aufregendes Erlebnis. Als Folge davon wurde die Sequenz des Gens vollständig dadurch bestimmt, daß wir mit einer Reihe von kurzen Oligonucleotid-Primern aus neun oder zehn Nucleotiden die Sequenz „entlangwanderten“^[52]. Ich glaube, daß die volle Bedeutung dieser Methode der Gensequenzierung noch nicht erkannt wurde.

Eine andere wichtige Anwendung der Sequenzierung doppelsträngiger DNA mit Oligonucleotid-Primern ist die genaue Identifizierung von Punktmutationen, die durch klassische Gentechniken an einer bestimmten Position hervorgerufen wurden. Ein besonders gutes Beispiel ist die Analyse einer großen Zahl von unabhängig isolierten Punktmutationen in einem Hefe-Suppressor-tRNA-Gen^[53, 54].

Die genaue Bestimmung von mRNA-Enden

Es ist wichtig, die Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden von mRNAs exakt zu bestimmen. Für das 3'-Ende einer mRNA kann dies durch Sequenzierung mit Oligonucleotid-Primern nach Sanger mit reverser Transkriptase und mit einer mit der gewünschten mRNA angereicherten RNA als Matrize geschehen. Die zwölf Desoxyribonucleotide, die aus einer Sequenz von dT-Resten mit zwei anderen terminalen Desoxyribonucleotiden am 3'-Ende entstehen, können mit dem 3'-Ende polyadenylierter eukaryontischer mRNA hybridisiert werden. Wenn die transkribierte Sequenz immer das gleiche 3'-Ende hat, kann nur eines der zwölf Oligonucleotide als spezifischer Primer dienen. Diese Strategie wurde eingesetzt, um die Sequenz des immer gleichen 3'-Endes der mRNA des Rinderwachstumshormons zu bestimmen^[55] und um die Mikroheterogenität am 3'-Ende des Transkripts der Rinder-Prolactin-mRNA zu demonstrieren und genau zu bestimmen^[56]. Es zeigte sich, daß im Fall von Iso-1-cytochrom *c* das 3'-Ende immer gleich ist^[57], während das 5'-Ende der gleichen mRNA sehr unbestimmt ist, wie durch Verlängerung mit Hilfe von Oligonucleotid-Primern und der mRNA als Matrize gezeigt wurde^[58]. Es gibt keine anderen Methoden, um die 5'- und 3'-Enden von mRNAs mit derselben Genauigkeit zu bestimmen. Dieser Genauigkeitsgrad ist für die exakte Bestimmung der Transkriptionsinitiierung und von Terminierungssignalen essentiell^[57, 58].

Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese

Ich glaube fest daran, daß es durch die Resultate organischer Synthese möglich sein wird, die Entwicklung von Organismen zu beeinflussen und Veränderungen zu produzieren, die all das, was durch konventionelle Züchtung erreicht werden kann, übertreffen.

Emil Fischer (1917)^[59]

The „ignis fatuus“ of Genetics has been the specific mutagen, the reagent that would penetrate to a given gene, recognize it, and modify it in an specific way.

J. Lederberg^[60]

Beim Start des Projekts zur Isolierung des Gens von Hefe-Cytochrom *c* wurde mir klar, daß ich die DNA-Sequenzbestimmung erlernen mußte. Glücklicherweise hatte ich ab dem Herbst 1975 ein Jahr lang die Möglichkeit, in Fred Sangers Labor als Teil des Teams, das versuchte, die Sequenz des *E.-coli*-Phagen φX174 aufzuklären^[61, 62], mit der „Plus-minus“-Sequenzierungsmethode zu arbeiten. Es gibt in diesem Genom aus 5386 Nucleotiden drei Paare überlappender Gene^[63–65], die sich alle auf denselben DNA-Strang befinden, wobei jedes überlappende Paar verschiedene Codon-Leserahmen nutzt. Wesentlich für die Bestimmung der Positionen und Leserahmen dieser Gene war das Vorhandensein von Nonsense-Mutanten, die durch Amber- oder Ochre-Suppressoren hemmbar waren. Dieses Nutzen von genau lokalisierten Mutanten eines bestimmten Phänotyps unterstrich die Notwendigkeit einer spezifischen mutagenen Methode, die ein bestimmtes Basenpaar des Genoms als Ziel definieren und eine vorbestimmte Änderung mit für ein Genom-Screening genügend hoher Effizienz einführen würde, um phänotypisch stille Mutanten identifizieren zu können. Da die DNA das Phagen φX174 einzelsträngig ist und die komplette Sequenz seines Genoms bekannt war, war aufgrund unserer früheren Studien, die gezeigt hatten, daß kleine Oligonucleotide aus nur sieben Nucleotiden auch bei einer Fehlpaarung bei niedrigen Temperaturen stabile Doppelstränge bilden können (siehe Abb. 2), anzunehmen, daß Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese möglich sein sollte. Es gab überdies noch weitere nützliche Informationen. So war bekannt, daß Punktmutationen, wenn auch mit niedriger Effizienz, rückgängig gemacht werden können. Dazu muß mutierte DNA des Phagen φX174 mit dem komplementären Strang der DNA des Wildtyps vor der Transfektion hybridisiert werden^[66, 67]. Allerdings sind die benötigten Fragmente viel länger als die, die wir bereits synthetisieren konnten, und die niedrige Effizienz schloß ein Genotyp-Screening aus^[66, 67]. Bei Gesprächen über dieses Problem erkannten Clyde Hutchison (der ebenfalls ein Jahr in Fred Sangers Gruppe verbrachte und dessen Kenntnis der Biologie von φX174 für das Sequenzierungsprojekt unschätzbar war) und ich, daß die Studien von Kornberg und Goulian^[43, 68–70] einen Zugang zu einer mutagenen Methode eröffneten. Sie hatten nämlich gezeigt, daß ein Oligonucleotid aus nur neun Nucleotiden an einer kreisförmigen Einzelstrangmatrize als Primer für *E.-coli*-DNA-Polymerase I fungieren und daß das Produkt durch enzymatische Ligation in eine geschlossene kreisförmige Doppelhelix überführt werden kann. Des Weiteren war bekannt, daß der Großteil des Primermoleküls, wahrscheinlich wegen der 5'-Exonuclease-Aktivität der *E.-coli*

DNA-Polymerase I^[71], aus dem Produkt herausgeschnitten ist^[72]. Diese Informationen und unser Wissen über die Stabilität von Doppelsträngen mit einer Fehlpaarung führten zu dem Entschluß, ein Oligomer aus zwölf Nucleotiden mit einem einzigen, zentral positionierten falschen Nucleotid als Primer zu verwenden, um mit ϕ X174-DNA als Matrize und *E.-coli*-DNA-Polymerase I, in der die 5'-Exonuclease durch Subtilisin inaktiviert worden war^[73–75], eine geschlossene kreisförmige Doppelstrang-DNA mit dem Oligonucleotid in einem Strang herzustellen.

Die Transfektion von *E. coli* mit dieser DNA sollte Phagen vom Wildtyp und mutierte Phagen hervorbringen. Die für dieses erste Experiment ausgewählten Mutationen waren das Erzeugen und Rückgängigmachen einer bekannten Nonsense-Mutation *am3* in der lytischen Funktion, Gen E, von ϕ X174, da hierfür brauchbare Phänotyp-Screens existierten. Die Mutationen beinhalteten die Umwandlung eines Trp-Codons, TGG, und eines Amber-Codons, TAG, ineinander durch G-T- und A-C-Fehlpaarungen^[76]. In den ersten Experimenten gelang das Einführen der Mutationen nur mit niedriger Effizienz. Sie konnte auf ein ermutigendes Niveau von etwa 15% nach dem Entfernen unvollständig geschlossener Doppelstränge durch Adsorption an Nitrocellulose oder Behandlung mit einer Einzelstrangspezifischen Nuclease unter Bedingungen, bei denen eine einzelne Basenfehlpaarung nicht abgebaut wird, angehoben werden^[76]. Weitere Studien zur Optimierung der mutagenen Bedingungen erbrachten Ausbeuten bis zu 39% mit einem mutagenen Primer aus zwölf Nucleotiden und meßbare Mengen an Mutanten mit einem mutagenen Heptamer-Primer^[77]. Daß die Verwendung von Subtilisin-behandelter DNA ein kluger Schachzug war, zeigen Vergleiche dieser Ergebnisse mit denen anderer Studien, in denen intakte *E.-coli*-DNA-Polymerase I verwendet wurde^[78].

Folgestudien zur Mutagenese des Phagen ϕ X174 zeigten, daß mit sehr kurzen Oligonucleotiden außer den beiden Transitionsmutationen des ersten Experiments auch Transversionsmutationen und Deletionen einzelner Nucleotide möglich waren^[79]. Bezogen auf das Genom von ϕ X174 war die Methode also sicherlich hochspezifisch leistungsfähig und allgemeingültig. Nun wurde es Zeit, die Methode weiter zu verallgemeinern, so daß sie auf jedes klonierte DNA-Fragment angewendet werden konnte. Die icosaedrischen Bakteriophagen wie ϕ X174 sind keine potentiellen Vektoren für rekombinante DNA, da die Menge an DNA, die in ihnen angesammelt werden kann, begrenzt ist. Filamentöse Bakteriophagen können dagegen zusätzlich in das Genom eingebaute DNA unterbringen. Zu der Zeit, als Mark Zoller und ich die Verallgemeinerung unserer Methode planten, favorisierten viele Leute ein Verfahren, das doppelsträngige rekombinante Plasmide verwendete. Uns schien die Biologie der filamentösen Bakteriophagen, die einzelsträngige circuläre DNA produzieren und sie dann als Phagenpartikel reinigen, überwältigend für Phagen-DNA als Vektor zu sprechen. Nachfolgende Entwicklungen in der Biologie rekombinanter Phagen und der Konstruktion von Phagemiden^[7, 8] haben diese strategische Entscheidung gerechtfertigt, obwohl auch für Plasmid-Mutagenese geeignete Prozeduren existieren^[80–82]. Die Oligonucleotid-Mutagenese mit filamentöser Phagen-DNA als Matrize erwies sich als schwieriger als die mit ϕ X174-DNA, wahrscheinlich durch die ausgeprätere Sekundärstruktur bedingt, die die Erzeugung eines ringförmigen Doppelstranges der vollen Länge

verhinderte. Folglich mußten neue mutagene Methoden mit höherer Ausbeute entwickelt werden^[83–86]. Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde durch unsere erste Beteiligung am Protein-Engineering in Zusammenarbeit mit Greg Winter und Alan Fersht anschaulich gezeigt^[87]. Dies kündigte natürlich auch die enorme Häufigkeit an, mit der diese Methode bei Struktur-Funktions-Analysen von Proteinen heute eingesetzt wird, was ein Merkmal der modernen Biochemie geworden ist.

Genotyp-Selektion oder das Suchen nach Mutanten

Da das erste Produkt des enzymatischen Einbaus mutagener Oligonucleotide in doppelsträngige, rekombinante DNA ein Hetero-Doppelstrang ist, erzeugt die biologische Replikation der DNA mutierte und nichtmutierte DNA-Nachkommen, vorausgesetzt, es gibt keine Asymmetrie im DNA-Replikationsmechanismus oder asymmetrische Fehlpaarungsreparaturmechanismen. Tatsächlich ist es mit Standardmethoden möglich, eine mutagene Ausbeute von bis zu 50% zu erzielen^[77, 85]. Bei diesem Ausbeuteniveau ist die DNA-Sequenzbestimmung die wirksamste Methode, um die gewünschte mutierte DNA zu finden. Doch oft ist die Ausbeute an Mutanten viel geringer als 50%. Meiner Meinung nach liegt das hauptsächlich an der Verwendung von Matrizen-DNA, die mit irgendwelchen Oligonucleotiden aus dem bakteriellen DNA-Abbau kontaminiert ist; andere führen es auf die biologische Reparatur von Fehlpaarungen zurück, die die Sequenz der Matrizen-DNA begünstigt^[80]. Was auch immer der Grund für die reduzierte Mutantenausbeute ist, es werden andere Methoden als die Sequenzbestimmung für die Mutanten-identifizierung gebraucht. Die bekannten Methoden lassen sich in zwei Kategorien einordnen: solche, die mutagene Oligonucleotide zur Identifizierung mutierter DNA nutzen, und solche, die nach Nachkommen des neu synthetisierten, das Oligonucleotid enthaltenden DNA-Strangs suchen.

Die deutlich höhere Stabilität eines perfekt passenden Oligonucleotid-Doppelstrangs relativ zu einem Doppelstrang mit einer Fehlpaarung (siehe Abb. 2) zeigt, daß ein mutagenes Oligonucleotid eine komplementäre mutierte DNA identifizieren können sollte. Dieses Prinzip wurde für die Entwicklung einer Methode zur Selektion von mutierter DNA genutzt. Bei dieser Methode wird die durch Oligonucleotid-Mutagenese hergestellte Mischung von einzelsträngiger Wildtyp- und mutierter Phagen-DNA als Matrize für die Synthese doppelsträngiger DNA mit mutagenen Oligonucleotiden als Primern unter Bedingungen genutzt, bei denen keine Doppelhelix mit Fehlpaarungen entstehen sollte^[88]. Nach Transfektion in *E. coli* kann mit dieser Methode mutierte DNA in nahezu 100% Ausbeute selektiert werden.

Eine alternative Methode ist die Verwendung eines mutagenen Oligonucleotids als Sonde für mutierte DNA in Plaques, die von *E. coli* mit mutierten Phagen produziert wurden^[83, 84]. Wiederum ist die Methode bei der Identifizierung mutierter DNA sehr zuverlässig. Das gleiche Prinzip wird bei der Identifizierung von Punktmutationen in menschlicher DNA genutzt^[89], wobei die Komplexität des Human-Genoms Sonden aus mindestens 17 Nucleotiden verlangt (siehe Tabelle 1).

Es wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, um die Nachkommen eines DNA-Strangs, der das mutagene Oligonucleotid

enthält, zu selektieren^[80]. Zwei davon, die eine basiert auf In-vivo-, die andere auf In-vitro-Selektion, sind die populärsten und am weitesten verbreitet. Bei der In-vivo-Selektion wird eine DNA-Matrize verwendet, in der etwa 1 % der Desoxythymidinreste durch Desoxyuridinreste ersetzt wurde. Diese Matrize wird in doppelsträngige DNA eingebaut, die das mutagene Oligonucleotid als Teil des in vitro synthetisierten zweiten Strangs enthält. Bei der Transfektion eines passenden *E.-coli*-Wirts wird der Desoxyuridinstrang durch das DNA-Reparatursystem des Bakteriums selektiv abgebaut, so daß sich die Nachkommen hauptsächlich vom mutierten Strang herleiten^[90]. Bei der In-vitro-Selektion wird als Matrize normale DNA des rekombinanten Phagen eingesetzt, in deren zweiten Strang das mutagene Oligonucleotid mit enzymatisch synthetisierten Thiophosphatbrücken zwischen den Nucleotiden eingebaut wurde. Diese sind gegen eine Spaltung durch Restriktions-Endonukleaseen resistent, wodurch die Matrize eine Kerbe erhält. Die eingekerbte Matrize wird daraufhin von einer Exonuclease partiell abgebaut und mit Hilfe einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase repariert. Das Ergebnis ist eine doppelsträngige DNA, die in beiden Strängen im wesentlichen mutiert ist und die nach Transfektion in *E. coli* hauptsächlich mutierte rekombinante Phagen produziert^[91].

Schlußfolgerung

Damit schließt mein Bericht über die Nutzung synthetischer Desoxyribonucleotide zur Charakterisierung natürlich vorkommender Nucleinsäuren, den ich so genau, wie ich es vermochte, verfaßt habe, wobei ich immer das diesem Beitrag vorangestellte Zitat von Fred Sanger im Auge behielt. Sicher gibt es viele andere Anwendungen von Oligonucleotiden in der Biologie, besonders die Polymerase-Kettenreaktion^[92] mit ihren zahlreichen Varianten, aber ebenso bei der Synthese von doppelsträngiger DNA und bei der Verwendung von Oligonucleotidsäuren in vitro und in vivo. Im letzteren Bereich besteht die Möglichkeit zur Entwicklung einer ganz neuen Chemie, die auf Pharmazeutika, die die Expression bestimmter Gene blockieren, und auf Diagnostika gerichtet ist^[93, 94].

Im Hinblick auf unsere eigenen Arbeiten ist es sehr befriedigend, daß die 1968 begonnenen Modellstudien Ausgangspunkt für so viele Anwendungen und wissenschaftliche Zusammenarbeiten waren (wovon nur wenige in diesem Artikel zitiert sind). Das Potential der Oligonucleotid-gerichteten regiospezifischen Mutagenese war von Anfang an erkennbar, wie folgendes Zitat belegt:

„This new method of mutagenesis has considerable potential...to define the role of...origins of DNA replication, promoters and the sequences for ribosome-building sites. ... specific mutation within protein structural genes...will allow precise studies of protein structure-function relationships“
Hutchison et al.^[76]

Wir konnten jedoch nicht die Explosion der Zahl der Genisolierungen, die Verbesserungen der DNA-Sequenzierungsmethoden und die Fortschritte in der chemischen Nucleinsäuresynthese voraussehen, die seit 1978 stattgefunden haben. Diese führten zu einem erstaunlichen Anstieg der Verwendung von regiospezifi-

scher Mutagenese als analytischem Werkzeug in der Biochemie und der Biologie. Dies wurde von kontinuierlichen Verbesserungen der grundlegenden Methoden und der Vielseitigkeit der regiospezifischen Mutagenese^[80–82] begleitet und löste neue Arten wissenschaftlicher Publikationen wie Protein Engineering und Protein Science aus. Es ist keine zu große Übertreibung, wenn man sagt, daß die Vorhersage von Emil Fischer von 1917 erfüllt und das von Joshua Lederberg 1959 aufgezeigte Dilemma gelöst ist.

Meine Karriere in der Nucleinsäureforschung gäbe es nicht ohne das Beispiel und die Inspiration von Gobind Khorana. Außerdem stehe ich in der Schuld vieler junger Wissenschaftler, die in den letzten dreißig Jahren Mitglieder meiner Gruppe waren. Insbesondere möchte ich Caroline Astell, Shirley Gillam, Patricia Jahnke und Mark Zoller nennen, die für die hier vorgestellten Studien hauptsächlich verantwortlich waren, sowie Tom Atkinson, der die mühsame Aufgabe der manuellen chemischen Synthese von Oligonucleotiden auf sich genommen hatte, als es noch keine Synthesearmaten gab. Zwei wichtige und unentbehrliche Kollegen, deren biologische Sachkenntnis und Engagement für diese Studien wesentlich waren, waren Ben Hall bei der Isolierung des Cytochrome-c-Gens aus Hefe und Clyde Hutchison bei der Entwicklung der Oligonucleotid-gerichteten Mutagenese. Mein Jahr in Fred Sangers Gruppe war in seiner Aufregung und Zeitlosigkeit wunderbar. Die Unterstützung durch den Forschungsfonds der National Institutes of Health war wesentlich, weil sie es mir in den ersten Jahren nach dem Verlassen der Khorana-Gruppe ermöglichte, die chemische Synthese der Nucleotide weiter zu erforschen. Seit 1966 hat mir der Medical Research Council of Canada kontinuierlich die finanzielle Unterstützung gewährt, die die zuverlässige und hochwillkommene Grundlage meiner eher spekulativen Forschungsaktivitäten war. Zeitweise wurde ich auch von der British Columbia Health Research Foundation und vom National Cancer Institute of Canada unterstützt. Während der letzten vier Jahre war ich wissenschaftlicher Leiter des Canadian Protein Engineering Network of Centres of Excellence, einer landesweiten Zusammenarbeit zu Protein-Struktur-Funktions-Analysen, die großzügig durch das Network-of-Centres-of-Excellence-Programm gefördert wurde. Schließlich war der Campus der University of British Columbia seit 1956 zuerst beim British Columbia Research Council, dann beim Fisheries Board of Canada Vancouver Laboratory, meistens im Department of Biochemistry und seit kurzem im Biotechnology Laboratory, mein wissenschaftliches Zuhause. Ich bin sehr dankbar für die Atmosphäre und Ausstattung, besonders im Department of Biochemistry, in dem die hier beschriebenen Studien durchgeführt wurden.

Ein eingegangen am 19. Januar 1994 [A 50]
Übersetzt von Dr. Anne-Elisabeth Pakusch, Ludwigshafen

- [1] Sequences, sequences and sequences: F. Sanger, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 1–28.
- [2] A new approach to the synthesis of polynucleotides: H. G. Khorana, G. M. Tener, J. G. Moffatt, E. H. Pol, *Chem. Ind. London* **1956**, 1523.
- [3] H. G. Khorana, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*, J. Wiley, New York, 1961.
- [4] Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code: H. G. Khorana in *Les Prix Nobel en 1968*, P. A. Nerstede, Stockholm, **1969**, S. 196–200.
- [5] Total synthesis of a gene: H. G. Khorana, *Science* **1979**, 203, 614–625.
- [6] A new synthesis of guanosine-5'-phosphate: R. W. Chambers, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3747–3752.
- [7] F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology* (2 Bände, vierteljährlich ergänzt), Wiley Interscience, New York, 1987.
- [8] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2. Aufl. (3 Bände), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- [9] J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkawski, M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2. Aufl., Scientific American Books, New York, 1993.
- [10] An improved and general method for the synthesis of ribo- and deoxyribo-nucleoside-5' triphosphates: M. Smith, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1141–1145.
- [11] The synthesis and properties of ribonucleoside-3',5' cyclic phosphates: M. Smith, G. I. Drummond, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 698–706.
- [12] Synthesis of uridylyl-(3' → 5')-Uridine and uridylyl-(3' → 5')-adenosine: M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430–440.
- [13] Specific synthesis of the C5'-C3' interribonucleotide linkage: the synthesis of uridylyl-(3' → 5')-uridine: M. Smith, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 2911.
- [14] Synthesis of deoxyribonucleoside-3',5' cyclic phosphates by base-catalysed trans-esterification: M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3586.
- [15] Preparation of nucleoside-3',5' cyclic phosphates in strong base: R. K. Borden, M. Smith, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3247–3253.
- [16] Oligodeoxyribo-nucleotides: chemical synthesis in anhydrous base: R. von Tigerstrom, M. Smith, *Science* **1970**, *167*, 1266–1268.
- [17] The synthesis of the internucleotide bond by a base-catalysed reaction: R. von Tigerstrom, P. Jahnke, M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1727–1736.
- [18] Application of base-catalysed reaction to the synthesis of dinucleotides containing the four common deoxyribonucleosides and of oligodeoxythymidylates: R. von Tigerstrom, P. Jahnke, V. Wylie, M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1737–1743.
- [19] Enzymatic synthesis of deoxyribo-oligonucleotides of defined sequence: S. Gillam, M. Smith, *Nature (London) New Biol.* **1972**, *238*, 233–234.
- [20] Enzymatic synthesis of deoxyribo-oligonucleotides of defined sequence. Properties of the enzyme: S. Gillam, M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1974**, *1*, 1631–1648.
- [21] Use of *E. coli* polynucleotide phosphorylase for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides of defined sequence: S. Gillam, M. Smith, *Methods Enzymol.* **1980**, *65*, 687–701.
- [22] Enzymatic synthesis of oligo-deoxyribonucleotides of defined sequence: S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 2532–2539.
- [23] Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers: S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder, G. R. Galluppi, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 661–663.
- [24] Solid-phase synthesis of oligodeoxyribo-nucleotides by the phosphite-triester method: T. Atkinson, M. Smith in *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach* (Hrsg.: M. J. Gait), IRL, Oxford, 1984, S. 35–81.
- [25] An investigation of several deoxyribonucleoside phosphoramidates useful for synthesizing deoxyoligonucleotides: L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 245–248.
- [26] Biosynthesis of protamine during spermatogenesis in salmonid fish: C. J. Ingles, J. R. Trevithick, M. Smith, G. H. Dixon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *22*, 627–634.
- [27] The intracellular location of the adenine- and thymine-rich component of deoxyribonucleate in testicular cells of the crab, *Cancer productus*: C. R. Astell, D. T. Suzuki, R. P. Klett, M. Smith, I. H. Goldberg, *Exp. Cell Res.* **1969**, *54*, 3–10.
- [28] Oligonucleotides and their association with polynucleotides: A. M. Michelson, C. Monny, *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *149*, 107–126.
- [29] The stability of oligoadenylate-polyuridylate complexes as measured by thermal chromatography: S. K. Niyogi, C. A. Thomas, Jr., *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1220–1223.
- [30] Complex formation in polynucleotides and its application to the separation of polynucleotides: P. T. Gilham, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1311–1312.
- [31] The use of polynucleotide-celluloses in sequence studies of nucleic acids: P. T. Gilham, W. E. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4985–4989.
- [32] Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidyl acid-cellulose: H. Aviv, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 1408–1412.
- [33] The interaction of oligodeoxyribonucleotides with denatured DNA: B. L. McConaughay, B. J. McCarthy, *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *149*, 180–189.
- [34] The influence of chain length and base composition on the specific association of oligoribonucleotides with denatured deoxyribonucleic acid: S. K. Niyogi, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1576–1581.
- [35] Further studies on the properties of oligonucleotide cellulose columns: C. R. Astell, M. T. Doel, P. A. Jahnke, M. Smith, *Biochemistry* **1973**, *12*, 5068–5074.
- [36] Thermal elution of complementary sequences of nucleic acids from cellulose columns with covalently attached oligonucleotides of known length and sequence: C. R. Astell, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1944–1946.
- [37] Synthesis and properties of oligonucleotide-cellulose columns: C. R. Astell, M. Smith, *Biochemistry* **1972**, *11*, 4114–4120.
- [38] The base-pairing specificity of cellulose-pdT_n: S. Gillam, K. Waterman, M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 625–634.
- [39] Synthetic oligodeoxyribonucleotides as probes for nucleic acids and as primers in sequence determination: M. Smith in *Methods of DNA and RNA Sequencing* (Hrsg.: S. M. Weissman), Praeger, New York, 1983, S. 23–68.
- [40] The chemical synthesis of deoxyribo-oligonucleotides complementary to a portion of the lysozyme gene of phage T4 and their hybridization to phage-specific RNA and phage DNA: M. T. Doel, M. Smith, *FEBS Lett.* **1973**, *34*, 99–102.
- [41] Cooperative properties of DNA, RNA and hybrid homopolymer pairs: M. J. Chamberlin, *Fed. Proc.* **1965**, *24*, 1446–1457.
- [42] J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, 4. Aufl., Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 1987.
- [43] A. Kornberg, W. H. Freeman, *DNA Replication*, San Francisco, CA, 1980.
- [44] Yeast frameshift mutations identified by sequence changes in iso-1-cytochrome c: J. W. Stewart, F. Sherman in *Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis* (Hrsg.: L. Prakash, F. Sherman, M. W. Miller, C. W. Lawrence, H. W. Taber), Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1974, S. 102–107.
- [45] Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence: synthesis of a segment of yeast iso-1-cytochrome c gene: S. Gillam, F. Rottman, P. Jahnke, M. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 96–100.
- [46] Identification and isolation of the yeast cytochrome c gene: D. L. Montgomery, B. D. Hall, S. Gillam, M. Smith, *Cell* **1978**, *14*, 673–680.
- [47] Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β-globin DNA: R. B. Wallace, M. J. Johnson, T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 3647–3656.
- [48] Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human β₂-microglobulin: S. V. Suggs, R. B. Wallace, T. Hirose, E. H. Kawashima, K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6613–6617.
- [49] A new method for sequencing DNA: A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560–564.
- [50] DNA sequencing with chain terminating inhibitors: F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [51] Determination of nucleotide sequences in DNA: F. Sanger in *Les Prix Nobel En 1980*, Norstedt, Stockholm, 1981, S. 143–159.
- [52] Sequence of the gene for iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*: M. Smith, D. W. Leung, S. Gillam, C. R. Astell, D. L. Montgomery, B. D. Hall, *Cell* **1979**, *16*, 753–761.
- [53] Mutations at the yeast SUP4 tRNA^{Trp} locus; transcription of the mutant genes in vitro: R. A. Koski, S. G. Clarkson, J. Kurjan, B. D. Hall, M. Smith, *Cell* **1980**, *22*, 415–425.
- [54] Mutations at the yeast SUP4 tRNA^{Trp} locus: DNA sequence changes in mutants lacking suppressor activity: J. Kurjan, B. D. Hall, S. Gillam, M. Smith, *Cell* **1980**, *20*, 701–709.
- [55] Use of oligodeoxynucleotide primers to determine poly(adenylic acid) adjacent sequences in messenger ribonucleic acid: N. L. Sasavage, M. Smith, S. Gillam, C. Astell, J. H. Nilson, F. Rottman, *Biochemistry* **1980**, *19*, 1737–1743.
- [56] Variation in the polyadenylation site of prolactin messenger RNA: N. L. Sasavage, M. Smith, S. Gillam, R. P. Woychik, F. M. Rottman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 223–227.
- [57] Sequence of the yeast iso-1-cytochrome c mRNA: J. M. Boss, S. Gillam, R. S. Zitomer, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 12958–12961.
- [58] *Saccharomyces cerevisiae CYC1 mRNA 5'-end positioning: analysis by in vitro mutagenesis, using synthetic duplexes with random mismatch base pairs*: J. B. McNeil, M. Smith, *Mol. Cell Biol.* **1985**, *5*, 3545–3551.
- [59] E. Fischer, 1917.
- [60] A view of genetics: J. Lederberg in *Les Prix Nobel En 1958*, Norstedt, Stockholm, 1959, S. 170–189.
- [61] A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase: F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, *94*, 441–448.
- [62] The nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174: F. Sanger, A. R. Coulson, T. Friedmann, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison III, P. M. Slocombe, M. Smith, *J. Mol. Biol.* **1978**, *125*, 225–246.
- [63] Overlapping genes in bacteriophage ΦX174: B. G. Barrell, G. M. Air, C. A. Hutchison III, *Nature* **1976**, *264*, 34–41.
- [64] The sequence of a region of bacteriophage ΦX174 coding for parts of genes A and B: N. L. Brown, M. Smith, *J. Mol. Biol.* **1977**, *116*, 1–28.
- [65] Gene K of bacteriophage ΦX174 codes for a protein which affects the burst size of phage production: S. Gillam, T. Atkinson, A. Markham, M. Smith, *J. Virol.* **1985**, *53*, 708–709.
- [66] Genetic assay for small fragments of bacteriophage ΦX174 deoxyribonucleic acid: C. A. Hutchison III, M. H. Edgell, *J. Virol.* **1971**, *8*, 181–189.
- [67] Biological activity of ΦX174 replicative form DNA fragments: P. J. Weisbeek, J. H. van de Pol, *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *224*, 328–338.
- [68] Incorporation of oligodeoxynucleotides into DNA: M. Goulian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *61*, 284–291.
- [69] Synthesis of infectious phage ΦX174 DNA: M. Goulian, A. Kornberg, R. L. Sinsheimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *58*, 2321–2328.
- [70] Properties of oligodeoxynucleotides that determine priming activity with *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid polymerase I: M. Goulian, S. H. Goulian, E. E. Codd, A. Z. Blumenfield, *Biochemistry* **1973**, *12*, 2893–2901.
- [71] Exonuclease VI, a new nuclease activity associated with *E. coli* DNA polymerase: R. P. Klett, A. Cerami, E. Reich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 943–950.
- [72] Initiation of the replication of single-stranded DNA by *Escherichia coli* DNA polymerase: M. Goulian, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1968**, *33*, 11–20.

- [73] An active fragment of DNA polymerase produced by proteolytic cleavage: D. Brutlag, M. R. Atkinson, P. Setlow, A. Kornberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *37*, 982–989.
- [74] Selected elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis: H. Klenow, I. Henningsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *65*, 168–175.
- [75] Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Influence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase activity: H. Klenow, K. Overgaard-Hansen, S. A. Patkar, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *22*, 371–381.
- [76] Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence: C. A. Hutchison III, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6551–6560.
- [77] Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: optimum conditions and minimum oligodeoxyribonucleotide length: S. Gillam, M. Smith, *Gene* **1979**, *8*, 81–97.
- [78] Efficient correction of a mutation by use of chemically synthesized DNA: A. Razin, T. Hirose, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4268–4270.
- [79] Constructed mutants using synthetic oligodeoxyribonucleotides as site-specific mutagens: M. Smith, S. Gillam in *Genetic Engineering. Principles and Methods*, Vol. 3 (Hrsg.: J. K. Setlow, A. Hollaender), Plenum, New York, **1981**, S. 1–52.
- [80] In vitro mutagenesis: M. Smith, *Annu. Rev. Genet.* **1985**, *19*, 423–462.
- [81] New molecular biology methods for protein engineering: M. J. Zoller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 526–531.
- [82] New recombinant DNA methodology for protein engineering: M. J. Zoller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3*, 348–354.
- [83] Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA: M. J. Zoller, M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 6487–6500.
- [84] Oligonucleotide-directed mutagenesis of fragments cloned in M13 vectors: M. J. Zoller, M. Smith, *Methods Enzymol.* **1983**, *100*, 468–500.
- [85] Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template: M. J. Zoller, M. Smith, *DNA* **1984**, *3*, 479–488.
- [86] Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template: M. J. Zoller, M. Smith, *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 329–350.
- [87] Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl t-RNA synthetase and ATP binding: G. Winter, A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. J. Zoller, M. Smith, *Nature* **1982**, *299*, 756–758.
- [88] Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: in vitro selection of mutant DNA: S. Gillam, M. Smith, *Gene* **1979**, *8*, 99–106.
- [89] Detection of sickle-cell β^+ -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides: B. J. Conner, A. A. Reyes, C. Morin, K. Itakura, R. L. Teplitz, R. B. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 278–282.
- [90] Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection: T. A. Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 488–492.
- [91] The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphothioate-modified DNA: J. W. Taylor, J. Ott, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 1451–1455.
- [92] K. Mullis in *Les Prix Nobel en 1993*, Norstedt, Stockholm, **1994**; *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1271; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, Nr. 12.
- [93] Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology: O. Burchardt, M. Egholm, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 384–386.
- [94] Oligonucleotide therapy: S. T. Crooke, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, *3*, 656–661.