

## IV NEUROSPORA- BAKTEERI- JA VIRUSGENETIIKAN VAIHEITA

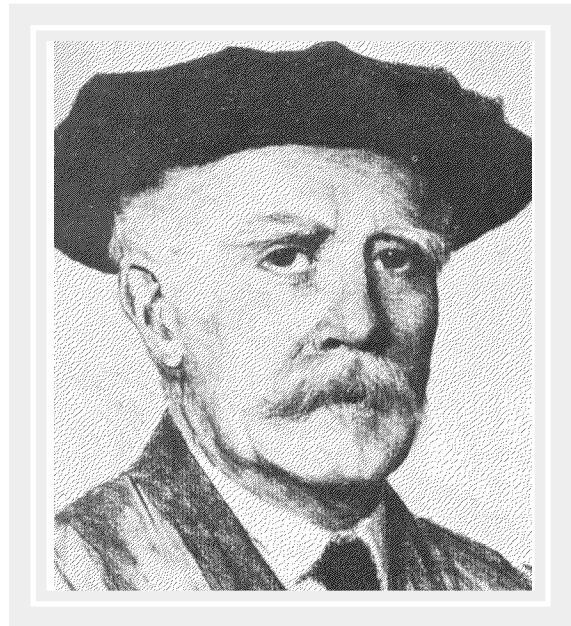
### A Biokemiallisia mutanteja

Ensimmäinen tieto kemiallisiin reaktioihin vaikuttavista geneistä oli ilmeisesti vuodelta 1902 Archibald E. **Garrodin** havainto alkaptonuria-sairaudesta periytymisestä. Diagnoosikuvausten perusteella tämä sairaus oli tunnettu jo ainakin 250 vuotta. C. Bödecker eristi jo 1859 virtsasta tummentuvan komponentin ja osoitti sen alkaptoniksi, joka normaalisti hajautuu edelleen. Garrod osoitti, että vika periytyy resessiivisen geenin välityksellä. Normaali metaboliassa alkaptonin bentseenirengas hajoaa jonkin entsyymin ansiosta, mutta alkapton-uripotilailta tämä entsyymi perinnöllisesti puuttuu. Alkapton-uria oli selvästi yleisempi serkusavioliitoissa. Muodostui hypoteesi : geeni ----> entsyymi----->reaktiovaihe-----> ominaisuus. Samantapaisen teorian esitti mm. Beijerinck, samoin Cuénot ja Durham arvelivat, että hiiren karvanvärin muodostukseen liittyi kemiallisia tapahtumia, ja mutaatiot ovat entsyymitoiminnan muutoksia. William **Bateson** aloitti Cambridgessä biokemiallisen mutanttien tutkimuksen mm. kukkien antosyaaniväreistä (Muriel Wheldale 1909), jotka jatkuivat vielä 1920-luvulla (Görtner, Onslow, ja Rose Scott-Moncrieff).

*Drosophilan* mutanteista muutamit silmänvärimutaatiot vaikuttivat samanlaisilta entsyymigeenin mutaatioilta mm. Bridgesin jo 1910 löytämä X-kromosomin geeni *vermilion* ja autosomaalinen *cinnabar*, jotka Sturtevantin mielestä näyttivät liittyvän silmän ruskean ommokromi (ksantommatiini) väriaineen synteesiin. Vastaavasti drosopteriinin (punaisen väriaineen) synteesistä tunnettiin mutanti *sepia*.

Ernesto **Caspari** tutki jauhokoisan (*Ephestia kühniella*) värin muodostusta ja 1933 osoitti, että siinä toimii ainakin yksi geenipari. Meisenheimerin kehittämän kudossiirtotekniikan avulla Caspari osoitti, että väri geenin sisältävä kudon levittää ympäristöönsä yhdistettäväksi (entsyymiä?), joka sai aikaan värin muodostusta l. pigmentin synteesiä myös ko. geenin mutaation tai puuttuvan sisältävässä kudoksessa.

George W. **Beadle** ja Boris **Ephrussi** kokeilivat samanlaisia kudossiirtoja *Drosophilalla*. *Vermilion*- mutantin silmäkudos muuntui + alleelin suuntaan, ja + kudon levitti vaikutustaan myös ympäristöönsä v-yksilöihin siirrettynä. Kokeissa huomattiin, että *cinnabar* kuuluu samaan



Archibald E. Garrod

reaktiosarjaan, jonka kemialliset yksityiskohdat selvitettiin Saksassa (A. Butenandt, W. Weidel, H. Schlossberger ym. ).

George Wells **Beadle** (1903-1989) oli aluksi mukana Cornellin maissiryhmässä, mutta siirtyi 1930-luvun alussa Cal Techiin Morganin osastoon (junior staff member) ja alkoi tutkia ns. biokemiallista genetiikkaa; biokemiallisia mutanteja aluksi *Drosophilassa*.

Boris Ephrussi saapui Pariisista Cal Tech:iin vierailavana tutkijana 1933 ja ryhtyi yhteistyöhön George W. Beadle:n kanssa silmänväri geenien mutaatioiden tutkimuksessa. Työläiden kokeiden avulla aluksi Pasadenassa sitten edelleen Pariisissa Beadle ja Ephrussi saattoivat osoittaa, että kutakin ommokromin synteesin vaihetta ohjaa oma geeninsä.

Pariisista palattuaan Beadle siirtyi Stanford University:iin (junior faculty member), jossa hän yhdessä biokemisti ja mikrobiologi Edward L. Tatum:in kanssa yritti määrittää *Drosophila*:n silmänvärin komponentteja. Työn hankaluuden vuoksi he päättivät kokeilla yksinkertaisempaa organismia, *Neurospora crassa*, johon Beadle oli tutustunut jo Cal Techissa.

### B Neurospora-tutkimus

**G.W. Beadle ja E. L. Tatum** aloittivat kemiallisten mutanttien metsästyksen yksinkertaisemmalla eliöllä, punaisella leipähomeella (*Neurospora crassa*), jonka elämänsyklin vaiheet B.O.

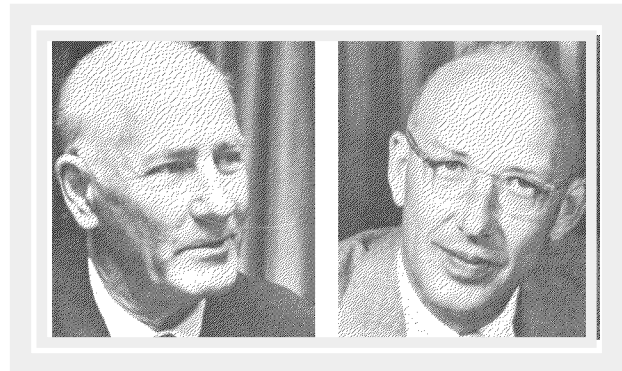
Dodge oli selvittänyt 1927, ja josta C.C. Lindegren (Univ. of South California ja CalTech) oli tehnyt alustavasti geenikartoitusta eri kytkentäryhmistä. C.C.L. oli selvittänyt myös meioosin kulun ja itiöiden asemat ascus-kotelossa. Robbins CalTechissa oli selvittänyt Neurosporan vaatiman minimiravinnon, joten 1930-luvun puolivälissä Neurosporan perustutkimus oli jo varsin pitkällä.

Edward Laurie **Tatum** (1919-1975) oli koulutukseltaan biokemisti, joka väitteli Wisconsinin yliopistossa bakteerien ravitsemuksen kemiasta, oli sitten post doc-stipendillä Hollannissa, jossa hän mykologi Nils Friesin kautta oppi tuntemaan kasvatustieteiden kemian. Edward L. Tatum palasi USA:han 1937 liittyen kemistiksi Beadlen ryhmään Stanford University:issä. Beadle taas tuns Morganin ryhmän ajoilta Cal Tech: issa Neurosporan elämäntieteen selvittäjän, tunnetun mykologin B.O. Dodgen kasvatuskokeet, sekä C.C. Lindegrenin risteytys- ja geenikartoituskokeet Neurosporalta.

Edward L. Tatum ja George W. Beadle alkoivat Neurospora-kokeet 1941 ja varsin nopeasti saivat useita merkittäviä tuloksia, jotka vahvistivat yksi-geeni-yksi-entsyymi-yksi-reaktiovaihe-hypoteesia. Eräs malleista oletettiin geenin suoraan muotoilevan geenituotteen, vrt. Linus Paulingin antigeeni-antibioy-hypoteesi. Neurospora-ryhmä kasvoi; jäseniä olivat mm. David Bonner, Norman Horowitz, (sekä Mitchell ja Houlahan ym.) David Bonner esitti ryhmän tuloksia Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology:ssa kesällä 1946. Varsinkin Max Delbrück kritisoi "geeni-entsyymi-teoriaa (mm. käyttäen Karl Popperin filosofisia arvioita kokeellisen tutkimuksen tieteellisen todistelun heikkouksista, väittäen, että Neurospora-kokeet oli suunniteltu vain positiivisia tuloksia varten).

Neurospora-laboratoriossa vieraili ja työskenteli lyhempiä kausia suuri joukko huomattavia tutkijoita, mm. Francis J. Ryan Columbia University:stä, (New York:sta) vietti sabatti-vuotensa Neurospora-ryhmässä vieden tutkimuksen Columbiaan ja myös muihin itävaltion yliopistoihin. Edward L. Tatum alkoi sotavuotensa tutkia myös Escherichia coli:a ja muita bakteereita löytäen mm. kaksoismutantteja (Tatum 1945). Eräät Tatumin K-12 mutantti- kannat osoittautuivat tärkeiksi vasta myöhemmin mm. Escherichia coli:n suvullisen lisääntymisen selvittämisessä.

Sädeillä Neurosporan suvutto-masti syntyviä itiöitä, konidiosporeja, saatiin aikaan mm. biokemiallisia mutantteja, jotka eivät menestyneet enää minimialustalla. Ensimmäiset julkaisut 1941



George Wells Beadle ja Edward L. Tatum

esittelivät 3 - mutanttia; tiamiinin l. B1-vitamiinin, pyridoksiinin l. B6-vitamiinin ja para-aminobentsoehapon mutantit. Mutaatiotutkimus siirtyi osittain Stanfordiniin, jossa perustettiin tutkimusryhmä. Neurospora-mutaatiotutkimuksissa olivat mukana mm. G.W. Beadle, E.L. Tatum, D. Bonner, H.K. Mitchell, N.H. Horowitz. Vastaavat kokeet alkoivat myös Aspergillus-sienellä ja Øivind Winge alkoi kokeilut hiivoilla, joilta hän löysi suvullisen lisääntymisen ja rekombinaation. G.W. Beadle, E. L. Tatum ja J. Lederberg saivat yhdessä Nobel-palkinnon 1958.

Long Islandilla sijaitsevasta **Cold Spring Harbor**in tutkimusasemasta kehittyi Demeric aikana huomattava geneettisen tutkimuksen keskus.

Miloslav **Demerec**, jugoslaavi, muutti USA:han I maailman sodan aikoihin, opiskeli jana hän työskenteli jonkin aikaa Cornellin yliopistossa (Dept. of Plant Breeding, maissiryhmä), mutta siirtyi 1923 Department of Genetics Carnegie Institution of Washington:iin Cold Spring Harbor:issa, johon hän jäi koko iäkseen.

Demerec jatkoi aluksi maissin genetiikkaa, siirtyi sitten Drosophilan mutageneesiin, mm. röntgen-sädeilyn käyttöön heti Mullerin (1927) keksinnön jälkeen. Drosophila-genetiikkaa Demerec tutki yhteistyössä mm. Morganin ryhmän jäsenten, erityisesti Calvin Bridgesin kanssa. Demerec perusti mm. Drosophila-kantapankin (joka kilpaili Morganin Pasadenaan tarkoittaman yrityksen kanssa). 1941 Demerec tuli johtajaksi Long Island Biological Associationin Laboratorioon ja pian myös Department of Genetics Carnegie Institution of Washington-laboratorion johtoon. Miloslav Demerec:in aikana laitokset sulautettiin ja Demerec toimi esimiehenä aina eläkeikänsä asti 1960.

Kun Salvador E. Luria ja Max Delbrück alkoivat viettää kesäänsä Cold Spring Harbor:issa 1941 lähtien Demerec siirtyi yhä enemmän

mikroibigenetiikkaan. Sota-aikana Demerec'in tutkimus kohdistui mm. penisilliini tuotannon tehostamiseen mutaatioiden avulla (*Penicillium chrysogenum*issa). Samalla Demerec tutki penisilliini-resistanssia *Staphylococcus*ella ja 1940-luvun lopulla jätti kokonaan *Drosophila*-tutkimuksen, alkaen laajat sädetys- ja kemiallisten mutageenien kokeet bakteereilla, tutkien myös *Salmonella* transduktiota ja geneettistä rakennetta. Vuosina 1941-

60 Miloslav Demerec organisoi monia Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology-kokouksia (mm. -41, -46, -47, -51, -53, -56, -58), perusti *Advances in Genetics*-kirjasarjan ja toimitti sitä monet vuodet.

**C Bakterien rekombinaatio**

Joshua **Lederberg** toimi opiskeluaikanaan

**COLD SPRING HARBORIN BIOLOGIAN LAITOSTEN HISTORIAA:**

1890 **The Brooklyn Institute of Arts and Sciences**  
The Biological Laboratory  
B. Dean 1890  
H. Conn 1891-97  
C.B. Davenport 1898-1924

1904

**Carnegie Institution of Washington,**  
Station for Experimental Evolution  
Davenport 1904-21

1910

Eugenics Record Office  
Davenport  
1910 - 1918

1918

**Carnegie Institution of Washington**  
Dept. of Experimental Evolution  
Eugenics Record Office  
C.B. Davenport  
1918 - 1921

1921

**Department of Genetics (C.I.W.)**  
Section of Experimental Evolution  
Eugenics Record Office  
C.B. Davenport 1921 - 1934

A.F. Blakeslee 1934- 1941

1924 **Long Island Biological Association**  
Biological Laboratory  
R.G. Harris 1924-36  
E. Ponder 1936-41

1941 M. Demerec 1941-60  
A. Chovnik 1960-62

**Department of Genetics (C. I. W)**  
M. Demerec 1941- 60  
B. Kaufman 1960 - 62

1962 **Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology**  
H.E. Umbarger 1962-63  
John Cairns 1963-1968  
James D. Watson 1968-

**Genetics Research Unit**  
A.D. Hershey 1962-73

Francis J. **Ryan**:in laboratoriossa Columbia University, New York:ssa tiskaajana ja sittemmin tutkijana, sai Bachelor of Arts-tutkintonsa valmiiksi 1944 ja liittyi sitten USA:n armeijan Navy Medical School-ohjelmaan (Columbia University, New York, College of Physicians and Surgeons), mutta jatkoi samalla tutkimustaan Francis J. Ryan:in laboratoriossa.

Averyn ryhmän tulokset pneumokokkien tranformaatiokokeista (1944) saivat Ryanin ja L.:in yrittämään tranformaatiokokeita Neurospora:lla. Ryanin havainto leusineless-mutantit muuntumisesta "adaptaatiosta" osoittautui revertantiksi ( työ oli Joshua Lederberg:in ensimmäinen julkaisu; Ryan & Lederberg 1946). Koetekniikka tuli sittemmin tärkeäksi mm. bakteerimutanttien revertanttien tutkimisessa, käytössä ja sovellutuksissa.

Kesällä 1945 Edward L. Tatum muutti Stanfordista Yalen yliopistoon luomaan uutta mikrobiologian opetusohjelmaa (Botany Dept., Yale). Ryan suositti Lederbergille yhteistyötä Tatumin kanssa, Tatum hyväksyi L:n hakemuksen ja L. siirtyi Yaleen maaliskuussa 1946 ja alkoi heti rekombinaatiokokeet *Escherichia coli*:n K12-kannoilla, joista erällä oli F-tekijä, mutta esim. kaksoismutantti threoniini-leusiini- oli sen menettänyt. Noin kuuden viikon kokeet jo tuottivat ensimmäiset positiiviset tulokset bakteerien rekombinaatiosta (suvullisesta risteytymisestä). Ensimmäiset tulokset julkaistiin heinäkuun alussa Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology:ssa, varsinkin Luria ylisti kokeissa käytettyä ns. *prototrophic recovery* -tekniikkaa, jota sittemmin mm. käyttivät monet muut, mm. Seamour Benzer, Milislav Demerec, François Jacob etc. Kuten David Bonnerin esitelmän jälkeen myös Lederbergin esittämiä tuloksia Max Delbrück arvioi kiusallisen tarkasti, mutta J.L. selvisi väittelyistä hyvin. Myöhemmin L. testasi myös tranformaation mahdollisuutta Maclyn Mc Cartyltä saamansa DNAasin avulla, mutta tuloksetta, joten alkuperäinen selitys rekombinaatiolle (geenien siirtyminen suvullisen lisääntymisen / konjugaation kautta) näytti pitävän paikkansa.

Yalen yliopistossa (New Haven, Conn.) Edward L. **Tatum** yhdessä Joshua **Lederbergin** kanssa alkoi kokeilla kemiallisten mutaatioiden aikaansaamista bakteereissa, kasvattaen *Escherichia coli* bakteeria minimalustalla ja sädetämällä sitä UV:llä. Samalla havaittiin, että muutamat mutaatiot revertoituivat eli palautuivat rekombinaation avulla, joka ilmeisesti tapahtui bakteerisolujen konjugaatiovaiheessa, kun kosketus estettiin rekombinaatio estyi. Näin löytyi bakteereista suvullinen lisääntyminen (Esther ja Joshua Lederberg sekä Leon L. "Luca" Cavalli löysivät

fertiliteettitekijän I. sukupuolifaktorin F, ja ns. Hfr-kannat). Konjugaatio nähtiin myös mikroskoopissa.

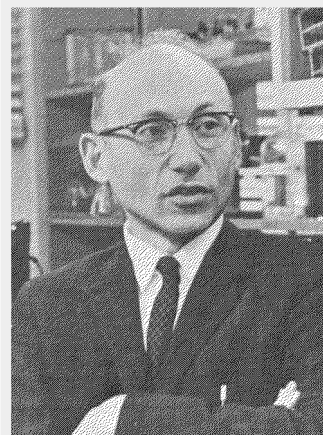
Esther **Lederberg** (o.s. Zimmer), newyorkilainen (s. 1922) sai B.A. arvonsa Hunter Collegesta 1942, työskenteli sitten Alexander Hollaenderin johdolla NIH:n laboratoriossa ja sai valmiiksi M.A. tutkinnon Stanfordin yliopistossa 1946, jolloin siirtyi Yalen yliopistoon, New Haveniin (Connecticut), jossa tutki Neurospora-genetiikkaa Norman Gilesin kanssa, mutta jatkoi kesäisin sädetyskokeita Cold Spring Harbor Laboratory:ssa Milislav Demerec:in ja Hollaenderin kanssa. Esther Lederberg suoritti Ph.D.:n University of Wisconsinissa J. Lederbergin kanssa työskennellen. Varsinainen työn ohjaaja oli Dept. of Geneticsin esimies R.A. Brink.

Bakteerien katsottiin edustavan sienten elämänkierron haplofaasia ja konjugaatiomallin risteytykselle saatiin Tracy M. **Sonneborn**:in Paramecium-kokeista. Vähitellen selvisi, että bakteerit olivat eukaryoteista täysin poikkeavia.

William Hayes, irlantilainen lääkäri-bakteriologi, työskenteli Lontoossa sodan jälkeisinä vuosina tutkien mm. Salmonellan antigeeni-ominaisuuksia ja kiinnostui samalla bakteerigenetiikasta. Osallistuuessaan kursseille Cambridgessä William Hayes tapasi Luca Cavalli-Sforza:n, jolta Hayes sai *Escherichia coli*:n K12-kannat A ja B, toiset vastaavat kannat hän sai Clive Spicer:ilta kokeita varten.

Cavalli-Sforza (myöhemmin Cavalli) oli italialainen populaatio-geneetikko, joka työskenteli R.A. Fisherin laitoksessa Cambridgen yliopistossa. Myöhemmin Cavalli-Sforza oli paljon yhteistyössä mm. Lederbergien kanssa. Cavalli-Sforza eristi ensimmäisen Hfr-kannan (1950).

William **Hayes** tutki bakteerien suvullista lisääntymistä Lontoon Postgraduate Medical Schoolin pienessä laboratoriossa, pullonpohjista leikatuilla minimaljoilla (3-4 cm halkaisijaltaan), tarkastellen kasvustoja kellosepän lupilla. Elie Wollmanin mukaan William Hayes työskenteli



Joshua Lederberg

niin alkeellisissa ja vaatimattomissa oloissa, että Pasteur Instituutin vanhat nuhruiset tilat näyttivät sen vierailun jälkeen luksuspalatsin tiloilta.

William Hayes alkoi ensimmäisen kokeensa K12-kannoilla heinäkuussa 1950 ja ensimmäinen julkaisu tuloksista oli *Nature*ssa vuoden 1952 alussa.

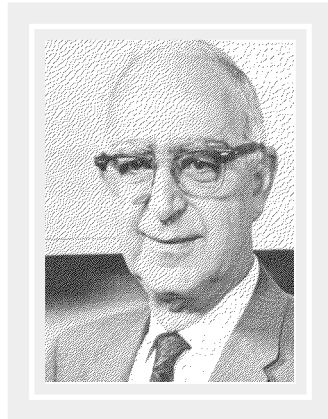
Bill Hayes ja Denny Mitchison osoittivat resiprookkisin kokein, että genomien siirtyminen oli yksisuuntainen tapahtuma; toinen bakteereista konjugaatiossa on antaja l. donori toinen vastaanottaja l. resipientti, samoin he osoittivat F-tekijän roolin Hfr-kantojen merkityksen jne.

Bill Hayesin kokeita pidetään niin merkittävänä, että bakteerigenetiikassa voidaan puhua ajasta ennen ja jälkeen Hayesin, l. pre- ja post-Hayes-kausista.

Vierailtuaan Hayesin laboratoriossa Lontoossa Elie Wollman kutsui Hayesin Ranskaan Royaumont:in kansainväliseen bakteriofagikonferenssiin kertomaan tuloksista. Max Delbrück osallistui kokoukseen ja kutsui Hayesin myös Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology-kokoukseen sekä sen jälkeen luokseen Cal Techiin. Cavalli ja Lederbergit olivat tehneet samoja kokeita, mutta yrittivät selittää tuloksia tumallisista eliöistä tavatun relatiivisen seksuaaliteetin ja diploidian avulla. Englannissa ollessaan James Watson ja Hayes 1953 tekivät yhteisjulkaisun genomien rakenteesta. He olettivat kolmen kromosomin mallin, joista yhdessä on F-tekijä.

Vasta Elie Wollmanin ja François Jacob:in kokeet osoittivat F-tekijän ja siirtyvien geenien olevan samassa jonossa, yhdessä DNA-renkaassa, jolloin myös konjugaation keskeyttämiseen perustuva geenien aikakartoitus voitiin ymmärtää. Pasteur-instituutin tutkijat Elie L. Wollman ja François Jacob keksivät aikakartoituksen geenijärjestyksen selvittämiseksi (esim. throniini-geeni 7 min---leusiini-geeni 9 min jne.) Wollman, Jacob ja Clarence Fuerst (Torontosta) keksivät myös radioaktiivisen fosforin hajoamiseen perustuvan sattumanvaraisten katkosten käytön kartoitukseen.

Elie L. **Wollman** ; toisen maailmansodan saksalaismiehityksen aikana surmattujen tunnetujen Pasteur Instituutin tutkijain, Eugéne ja Elisabeth



Tracy M. Sonneborn

Wollmanin poika, ja André Lwoff:in oppilas, joka sai sodan keskeyttämät opintonsa päätökseen Lyonin yliopistossa 1945 ja liittyi Pasteur-instituutin tutkijaryhmään. Vuosina 1948-50 Elie W. vieraili Max Delbrück:in laboratoriossa Cal Techissa, jossa hän työskenteli mm. Gunther Stent:in kanssa ja Pariisiin palattuaan Lwoffin ryhmässä.

François **Jacob**; pakeni jo sodan alussa 1940 Englantiin ja taisteli Vapaan Ranskan joukoissa mm. Afrikassa, tuli André Lwoff:in ryhmään vähän myöhemmin kuin E.W. F.J. työskenteli myös Cal Techissa löytäen mm. Brennerin ja Meselsonin kanssa 1960 messenger-RNA:n, sekä selvitti Jaques Monod'n kanssa geenien toiminnan säätelyä (operonien rakennetta).

## D Operonimalli

**J. Monod ja F. Jacob** saivat aikaan promoottorialueen, säätelygeenin (repressoriproteiinin) ja säätely- l. operaattorialueen muutoksia, joiden avulla he päätyivät bakteerien geenitoiminnan operonimalliin (1961) ja selvittivät säätelyn periaatteet. André **Lwoff**, myös Pasteur-instituutista, selvitti F-tekijän fagiluonteen ja yleensä fagien integraation. Operonimallin kehittäjät: Jacob, Lwoff ja Monod saivat Nobel-palkinnon 1965.

Missourin Kasvitiet. puutarhassa St. Louisissa pidettiin 2.2.-3.2. 1945 Symposia: "Gene Action in Microorganisms"; osanottajina mm. Demerec, Beadle, Tatum, Sonneborn, Luria, Delbrück, Lindegren, Hollaender ym. Sterling Emerson (Cal Tech.) esitti kokouksessa geenitoimintamallin, jossa kaikki perustui molekyylien pintarakenteiden komplementaarisuuteen, kuten aiemmissa antigeeni-antibody-malleissa Breinl & Haurowitz 1930, Pauling 1940, ja sittemmin DNA-mallissa Watson & Crick 1953.

Eräs operonimallin pääarkkitehteista oli Jacques **Monod**, joka opiskeli biologiaa Sorbonnessa ja tutki aluksi Protozooeja. 1936 Monod sai Ephrussin tuella Rockefeller Foundation:in stipendin Cal Tech:iin, Morganin ryhmään, jossa hän tutki Drosophilan kehitysgenetiikkaa. Palattuaan Sorbonneen Monod jatkoi taas protozooi-töitään. Keskusteltuaan suunnitelmistaan André Lwoffin kanssa, tämä sai Monod:n innostumaan bakteeritutkimuksesta, jonka Monod alkoi Pasteur-instituutissa 1937 Bacillus subtiliksella.

Väitöskirjansa Monod teki bakteerien kasvusta 1942, jolloin hän myös liittyi Ranskan Vastarintaliikkeeseen. Monod oli nimellisesti Sorbonnessa ja siirtyi Pasteuriin vasta 1945. Vähitellen hän siirtyi tutkimaan indusoitua entsyymituotantoa E. colissa. Diauxie-ilmiö johti Monod:n adaptiivisten ja

konstitutiivisten entsyymien tuotannon analyysiin, pre-entsyymimalliin, jonka periaate saatiin immunologiasta.

Jacques Monod:n henkilöstä on erilaisia muistelmia: Melvin Cohnin mukaan Monod oli erittäin laajatiетoinen, luotettava, karismaattinen, kaikesta kiinnostunut, sellisti, filosofi, jolla oli erittäin laajat tiedot kirjallisuudesta maalaustaiteesta jne. Vaikka Monod oli sairastanut polion ja vasen jalka oli jäänyt lyhemmäksi ja lihaksistoltaan surkastunut, hän oli erinomainen ratsastaja, tennispelaaja ja vuoristokiipeilijä, jolle tieде oli vain eräs leikki. Jacobin mukaan Monod:n luonteelle oli ominaista myös valtava kritikoinnin tarve, halu dominoida älyllisesti, jopa terrorisoida, mikä johti hänet seminaareissa istumaan aina eturivissä ja pommittamaan puhujaa lukemattomilla kysymyksillä ja selityksillä, mitä ja miten olisi pitänyt tehdä. Monod oli varsinainen tulisielu.

Monod:n johtamaan tutkijaryhmään Pasteurissä 1950-luvun vaihteessa kuuluivat mm. Cohn, Cohen, Cohen-Bazire, Jolit.

Amerikkalainen immunologi **Melvin Cohn** tuli vierailijana Monod:n laboratorioon 1948. Cohn jäi Pariisiin seitsemäksi vuodeksi, ja oli Monod:n ryhmän ideologeja mm. pre-entsyymiteorian kehittämisessä.

1950, mendelismien 50-v. symposiassa Joshua Lederberg esitelmöi pleiotrooppisista mutanteista ja indusoidusta entsyymituotannosta *E. coli*ssa, ja 1951 Monod:n ryhmä ilmoitti samoin entsyymi-induktiosta. Ns. ”**PaJaMo**-eksperimentti” (Arthur **Pardee**, François Jacob ja Jacques Monod 1958) antoi vihjeen repressori- ja lähetti-molekyylien olemassaolosta. Repressori kulki aluksi nimellä ”cytoplasmic messenger” (PaJaMo 1959).

Vuosina 1958-60 muotoutui operoni-mallin nimellä tunnettu geenitoimintamalli, (Jacob, Perrin, Sanchez ja Monod 1960). Säätelymolekyylin l. repressorin pleiotroop-pinen luonne selvitettiin; sama operaattori-alue säätelee koko geenijonoa. Ilmiö, josta Ames ja Garry -59 käyttivät nimiä koordinoitu repressio - koordinoitu ekspressio. Repressorien proteiininluonne ja allosterinen rakenne selvitettiin seuraavina vuosina, ja viimein varmistettiin erillisen lyhytikäisen lähetti-RNA:n esiintyminen proteiinisynteesissä. 1960-luvun alussa löydettiin kolmessa laboratoriossa DNA:ta RNA:ksi kopioiva entsyymi; RNA-polymeraasi, joka toimii transskriptiossa (Hurwitz, Bresler & Diringen 1960, Weiss 1960, Hurwitz, Furth, Anders, Ortiz & August 1961, Chamberlain & Berg 1962).

Sidney Brenner arveli ensinnä, että Elliot Volkinin ja Lazarus Astrachanin havaitsema emäsyhtäläisyys virus-DNA:n ja RNA:n välillä

tarkoitti virus-DNA:sta tehtyjä RNA-

Elie L. Wollman

kopioita l. lähettejä. 1961 Brenner, Jacob ja Meselson Cal Techissa, Delbrückin laboratoriossa onnistuivat tavoittamaan lähetti-RNA:n.

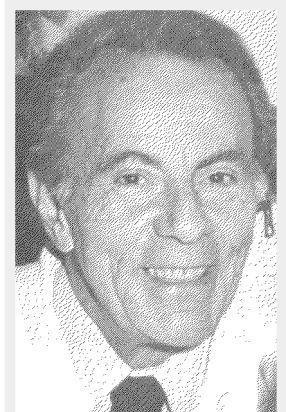
Marshall W. **Nirenberg** ja Heinrich Matthaei 1961 alkoivat kolmikkokoodin kokeellisen selvittämisen poly-U-lähetin ohjaaman translaation avulla.

Transskriptio ja translaatio olivat keskeiset aiheet Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology-kokouksissa 1961 ja 1963. Sol Spiegelman 1964 osoitti, että lähetti hybridisoituu vastaavan geeni-DNA:n sense-juosteen kanssa. Julius Marmur, Paul Doty, Eric Davidson ym. aloittivat laajan DNA/DNA, RNA/DNA hybridisaatiotutkimuksen.

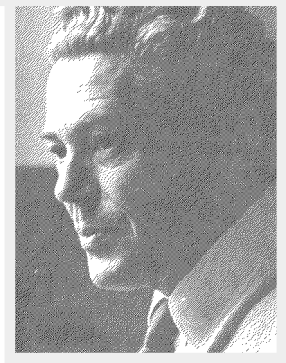
## E Transformaatio

Jo 1928 englantilainen **Fred Griffith** huomasi Pneumokokilla kapseliominaisuuden siirtyvän kuumentamalla tapetusta kannasta kapselittomaan elävään kantaan, jos molempia injektioitiin samanaikaisesti hiiriin. Tutkimus jatkui 1930-luvulla Rockefeller-instituutissa, NY:ssä, jossa mm. Martin Dawson ja James L. Alloway huomasivat, että samanlainen transformaatio tapahtui myös koeputkikasvatuksessa, ja vaikka tapettu kanta jauhettiin palasiksi. Tulos viittasi siihen, että kapseliominaisuus (ja sen mukana taudinaiheuttamiskyky) Pneumokokilla siirtyi jonkin yhdisteen, pikemminkin kuin jonkin rakenteen siirtymisen myötä.

1944 Rockefeller-instituutin tutkijat: Oswald T. **Avery**, Maclin **McCarty**, ja Colin **MacLeod**



Francois Jacob ja Jacques Monod



osoittivat tämän yhdisteen DNA:ksi, pilkkomalla kemiallisesti vuorotellen kaikki hajotetun antjabakteerin komponentit: DNA oli ainoa, mikä tarvittiin kapseliominaisuuden ilmaantumiseen kapselittomaan kantaan. Proteiini-geeniteorian (Geeni=jokin proteiini--> entsyymi ----> reaktio) ja DNA:lle kuvitellun pienen rengasmallin (tetranukleotidi) vuoksi tulos tuntui uskomattomalta, ja koetta toistettiin yhä puhtaammilla DNA-näytteillä (Rollin Hotchkiss ym.). Vielä genetiikan 50-vuotisjuhlakirjassa (L.C.Dunn: Genetics in the 20th century, 1951) vain kolme kirjoittajaa mainitsee DNA:n. Mm. vaikutusvaltainen Rockefellerin solukemisti Alfred Mirsky vielä epäili DNA:n osuutta geneeissä. Lohkokeuhkokuumetta (ihmisessä) aiheuttava grampositiivinen "pneumokokki" kuuluu sukuun Streptococcus (S. pneumoniae), joskin se voidaan myös erottaa Diplococcus-suvuksi. Seerumiterapian kehittäjistä jo 1910-luvulta mainittakoon Oswald T. **Avery**, Rockefeller Institute (New York) of Medical Research, sittemmin tunnettu pneumokokki:ien transformaatio:n tutkijana. pneumokokki-tutkimuksen pioneereja oli myös Fred **Neufeld**, Berlinin Robert Koch-Instituutista, joka kuvasi mm. erilaiset antigeenityypit. Oswald T. Avery, Chickering, Cole ja Dochez 1917 tarkensivat neufeldin tyyppijärjestelmää. 1920-luvulla Michael Heidelberger Oswald T. Avery:n laboratoriossa alkoi pneumokokki:en antigeeni-tyyppien analyysin. Johtamistaan tutkimuksista Oswald T. Avery palkittiin monin tavoin mm. Paul Ehrlichin Kultamitalilla, ja hänestä tuli Natl. Acad. Sci:n jäsen.

Arkwright havaitsi (1921) suolistobakteerikolonioissa *smooth/rough* vaihtelun ja 1923 Griffith huomasi samantapaisen eron pneumokokki:issa, ja sovelsi samaa r/s terminologiaa myös pneumokokkiin. Fred Griffith:n havainnon vahvisti Averyn entinen, Kiinaan lääkäriksi siirtynyt työtoveri Hobart Reimann.

**Fred Griffith** huomasi pneumokokki -kasvatuksissaan myös konversion s --> r ja alkoi tutkia sitä tarkemmin. Hiirikokeissaan hän osoitti, että juuri antigeenisesti sama kapseli-tyyppi (SI tai SII), jota tapettu kanta edustaa, ilmaantuu varaattomaan kantaan. Siis ominaisuus siirtyy jotenkin kokeessa käytetystä toisesta kannasta. Koe onnistui 60 asteen lämmössä tapetuilla, mutta ei enää kun käytettiin esim. 100° C lämpötilaa. Siirtynyt S-tyyppi muuttui ko. R-kannassa perinnölliseksi. Fred Griffith toimi British Ministry of Health:in alaisena ja julkaisi transformaatio-kokeittensa tulokset 1928. Fred Neufeld vieraili 1928 Lontoossa ja palattuaan Berliniin toisti ja vahvisti Fred Griffith:in koetulokset (Neufeld & Levinthal 1928), samoin Reimann Pekingissä vahvisti tulokset 1929.

Transformaation tutkiminen jatkui voimakkaimmin kuitenkin Rockefeller-Instituutissa, Oswald T. Avery:n laboratoriossa.

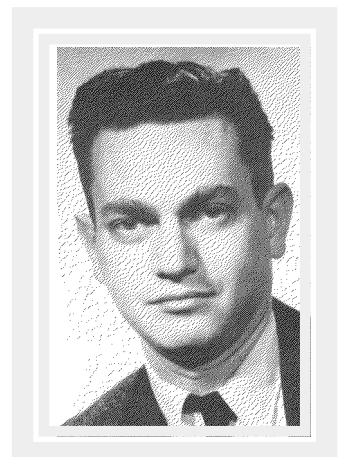
Oswald T. Avery oli syntynyt Halifaxissa, Nova Scotiassa 1877, mutta perhe muutti New York City:in -87, Oswald T. Avery alkoi opintonsa Colgate University:ssä (Hamilton, N.Y.), jatkoi sitten Columbia University:ssä (College of Physicians and Surgeons), josta sai M.D.:n arvon 1904. Toimittuaan jonkin aikaa lääkärinä N.Y. Cityssä Oswald T. Avery liittyi Hoagland Laboratorion tutkijakuntaan Brooklynissä, New Yorkissa, joka oli USA:n ensimmäinen yksityisesti rahoitettu bakteriologian tutkimuslaitos. Hoagland Lab. :ssa Oswald T. Avery tutustui ensi kerran pneumokokki - tutkimukseen, keuhkokuume oli suurin kuolinsyy USA:ssa. Eräs Rockefeller Institute for Medical Research:in johtajista Rufus Cole huomasi Oswald T. Avery:n pneumokokki- työt ja 1913 A. liittyi Rockefeller Institute:n tutkijakuntaan, johon hän jäi koko loppuiäkseen.

Fred Griffith:n tulosten ilmestyttyä Oswald T. Avery epäili immunologisen ominaisuuden; antigeenityypin muuttumista. Martin Dawsonin aloitteesta transformaatio-kokeet otettiin ohjelmaan.

Martin **Dawson** oli kanadalainen nuori lääkäri Oswald T. Avery:n laboratoriossa. Hän alkoi Rockefeller Institute:ssä transformaatio-kokeet, mutta siirtyi sitten Columbia University:in.

Yhdessä Richard H.P. Sia:n kanssa, joka oli vieraileva tutkija Peiping Union Medical Collegesta, Kiinasta, Martin **Dawson** teki onnistuneita transformaatio-kokeita myös in vitro, 1929-31. Hän tutki erityisesti transformaatio-koetta varten kuumennetun kannan lämpötilaa ja vahvisti Fred Griffith:n havainnon 60°- 80 ° :een optimilämmöstä. Martin Dawson onnistui siirtämään RII kantaan SI, SII ja SIV kantojen kapseliominaisuuden. Martin Dawson jätti tutkimustyön vähemmälle siirryttyään Columbia University:in Medical School:iin. Dawsonin tulokset rohkaisivat James L. Alloway:tä jatkamaan tutkimusta Rockefeller Institute:ssa.

James L. **Alloway** valmisti pneumokokkikannoista soluvapaita uutteita ja sai transformaation onnistumaan edelleen. Varsinaisen transformaatio-tekijän puhdistaminen ja paljastaminen ei sen ajan menetelmillä ollut kuitenkaan mahdollista. Vasta 1944 Oswald T. Avery:n ryhmä onnistui osoittamaan transformaatio-tekijän kemiallisen luonteen.



Marshall Nirenberg

Columbia University:in Kaliforniasta takaisin muuttanut arvostettu geenetikko Theodosius Dobzhansky, minnesotalainen biokemisti Ross A. Gortner, TMV:n kiteyttäjä Wendell Stanley ym. huomasivat transformaatio-kokeiden merkityksen jo 1940-luvulla.

James L. Alloway:n työtä jatkoi Rockefeller Institute:ssa kanadalainen lääkäri Colin M. **MacLeod**, joka liittyi Oswald T. Avery:n ryhmään 1934, uusien aluksi Martin Dawson:in ja James L. Alloway:n kokeet. Suuri joukko julkaisuja transformaatio:sta ilmestyi 1934-44. Colin MacLeod siirtyi professoriksi New York University:in Medical School:iin 1941 ja Maclyn **McCarty** liittyi Oswald T. Avery:n ryhmään. Monia erilaisia entsyymejä alkoi olla käytettävissä: mm. RNA voitiin entsyymaattisesti hajottaa, samoin eräät polysakkaridit. pneumokokki soluja hajotettaessa transformaatio-tekijä sekä endogeeninen DNAasi vapautuivat, joten DNAasi inaktivoitiin kuumentamalla +65°:een. Kun transformaatio-tekijää oli puhdistettu mahdollisimman pitkälle huomattiin, että vain DNAasi vaikuttaa sen hajoamisen, joten sen täytyi olla DNA:ta. Tiseliuksen laitteella ym. keinoilla DNA:n mol. paino arvioitiin ainakin 500 000:ksi. Laimennuskokeissa transformaatio-aktiivisuus säilyi aina 1/600 miljoonasosa laimennoksissa. Vaikka työ saatiin päätökseen jo 1943 alussa, Averyn varovaisuuden vuoksi julkaisu saatiin valmiik-si vasta vuoden lopussa ja se ilmestyi 1944.

Toukokuussa 1943 päivätyssä kirjeessään veljelleen Roy Averylle, joka kuului Vanderbilt yliopiston tutkijoihin, Oswald T. Avery arvioi kokeen geneettistä merkitystä. Max Delbrück näki kirjeen, mutta hänen mukaansa Oswald T. Avery ei esittänyt kokeen laajempaa merkitystä genetiikan ja geenitutkimuksen kannalta, mikä saattaa johtua myös siitä, etteivät Max D. ja ”Phage Church” itse olleet siihen aikaan kovin kiinnostuneita geenin kemiallisesta luonteesta.

Monet biokemistit sensijaan osoittivat suurta mielenkiintoa transformaatiokokeen tulokseen, mm. Columbia University:n Medical School :in itävaltalainen Wienistä New Yorkiin muuttanut kemisti Erwin **Chargaff** siirtyi tutkimaan DNA:n emäskoostumusta, ja keksi emästen pareittain ekvivalenttiset määrät; ns.”Chargaff rules ” (1951), joilla sittemmin oli suuri merkitys malli-rakentelussa. Eräs toinen varhainen transformaatiokokeen ymmärtäjä oli Harvardin mikrobiologi J. Howard Mueller, joka spekuloi, että nukleiinihapon polymeeri saattoi toimia myös viruskokeissa.

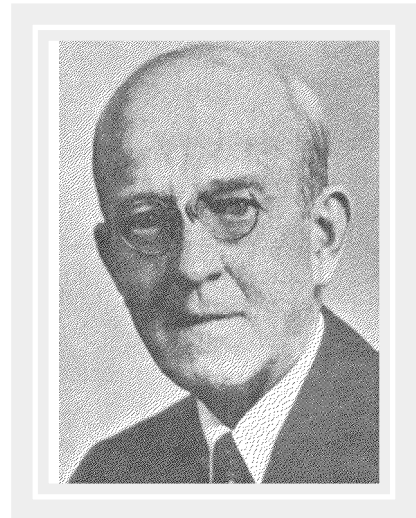
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1947 omistettiin

nukleiinihapoille (Nucleic Acids and Nucleoproteins), osanottajina olivat mm. Boivin, Brachet, Chargaff, Cohen, Davidson, Mazia, Mirsky, Ris, Schultz, Spiegelman, Hollaender ym. Averyn kokeen tulosta, lähinnä DNA:n puhtautta epäili mm. Mirsky, proteiini-geeni-teoria oli vielä tuikasti geneetikkojen mielissä.

McCarty jatkoi kokeita Rockefeller Institute:ssä, ollessaan sota-aikana U.S. Navyn palveluksessa vuoteen 1946.

Harriet **Taylor** (myöh. Ephrussi-Taylor) sai Ph. D.:nsä valmiiksi Columbia University:ssä ja liittyi Oswald T. Avery:n ryhmään, samoin liittyi Rollin D. Hotchkiss. DNA:n puhdistamista ja DNAasikokeita jatkettiin. McCarty:n viimeisissä näytteissä 1946 proteiineja oli mukana vain 1/100 000. Maclyn McCarty sai -46 Eli Lilly-palkinnon, ja piti esitelmää transformaatio-kokeista.

Rollin D. **Hotchkiss** osoitti paperikromatografian avulla, että DNA-näytteiden emäskoostumus vaihteli eri lajeista otetuissa näytteissä, mikä selvästi viittasi Phoebus A.T. Levene'n tetranukleotiditeorian virheellisyyteen. Ranskassa pidetyssä, André Lwoffin organisoimassa kollokviossa 1949 Rollin D. Hotchkiss otti esille lähes rajattoman vaihtelumahdollisuuden, mikä sisältyy DNA-polymeerin emäsjärjestykseen, jos molekyyli on ketjumainen.



Oswald T. Avery

F Transduktio



Bakteerien rekombinaatiosta väiteltyään J. Lederberg siirtyi Yalestä Madisoniin (Wisconsin). Siellä hänen ensimmäiseksi oppilaakseen tuli alunperin newyorkilainen Norton D. **Zinder**, joka alkoi rekombinaatiokokeet *Salmonella*-bakteerilla. Kokeissa huomattiin vain muutamien geenien kerrallaan siirtyvän kannasta toiseen, usein keskeltä genomia. Uutta rekombinaatiotapaa alettiin jäljittää: Konjugaatio estettiin U:n muotoisen kasvatusputken alamutkaan pannulla filterillä, mutta se ei estänyt siirtymistä. Transformaation mahdollisuus poistettiin hajottamalla vapaa DNA, mutta geenit siirtyivät edelleen, kunnes huomattiin, että koekannoissa oli fagi, joka pääsi filterin läpi ja geeni-DNA:ta siirtyi niiden sisällä kannasta toiseen. Uudelle ilmiölle vakiintui vähitellen nimi **transduktio**.

Norton Zinder tuli Lederbergin oppilaaksi Wisconsinin yliopistoon Columbia yliopistosta, jossa hän oli suorittanut undergraduate-opinnot biologiassa, ja josta Francis Ryan oli suositellut lähtemään Lederbergin luo tekemään väitöskirjaa. Lederberg oli tuolloin vasta 23 vuotias ja Zinder vasta 19.

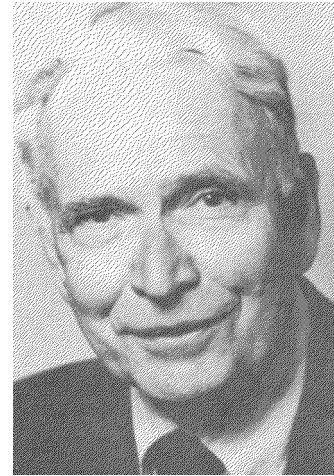
Zinder työskenteli Lederbergin Wisconsinin yliopistoon Madisoniin saamalla apurahalla (1948; 3780:-\$, nousten seuraavina vuosina aina 4000\$:iin). Zinderin väitöskirja *Salmonella*-kokeista valmistui 1952, jonka jälkeen Zinder palasi New Yorkiin, mutta Rockefeller Instituuttiin.

Jo vuoden 1951 Cold Spring Harbor Symposia on Quantit. Biol. -kokousta varten Lederberg ja Zinder kirjoittivat pitkän artikkelin; Josh Lederberg esitti sen Cold Spring Harbor Symposia on Quantit. Biol.:n iltasessiossa, esitelmä kesti yli 6 tuntia aina puoleen yöhön. Cold Spring Harbor:n kokouksen jälkeen Zinder jatkoi transduktion etsimistä myös muista fageista. Termi transduktio syntyi syksyllä -51, mutta vasta Oak Ridgen Symposian jälkeen 1954 transduktio tuli laajemmin käyttöön nimenomaan fagivälitteisen transformaation kuvaajana.

## G Virusgenetiikkaa

M.W. Beyerinck tutki tupakkamosaiikkivirusta jo vuosisadan vaihteessa, ja **F.W. Twort** 1915 huomasi bakteeriviljelmiä tuhoavan agenssin, jonka **F. d'Herelle** kokeillaan 1916-17 todisti olevan elollisen ja lisääntyvän bakteerinsyöjän eli **bakteriofagin**. Kuitenkin vasta 1939 Max **Delbrück** ja E.L. Ellis onnistuivat selvittämään fagien elämänsyklin ja lisääntymisen päävaiheet, ja vasta 1950-luvun alussa keksittiin EM-tekniikat fagilla tartutettujen

Erwin  
Chargaff



bakteerien avaamiseksi ja fagin kehitysvaiheiden näkemiseksi isäntäbakteerin sisällä.

1952 Alfred D. **Hershey** ja Martha **Chase** osoittivat kokeellisesti, että virus (bakteriofagi) injektioi isäntänsä soluun vain DNA:nsa, joka kantaa kaikkia kapselin ym. osien valmistamiseen tarvittavia geneejiä; siis DNA = geeni.

Frederick W. **Twort** bakteriologi, joka teki eläinlääketieteellistä tutkimusta Lontoossa, huomasi muutoksia kolonioissa, ja totesi muutosten aiheuttajan mikroskoopilla näkymättömäksi, sekä suodatettaessa erottuvaksi ja kasvatuksesta toiseen siirtyväksi, mutta se ei lisääntynyt ilman eläviä bakteereja. Ensimmäisessä julkaisussaan 1915 Twort nimitti sitä "bakteeri taudiksi" (bacterial disease).

Felix d'**Herelle** oli Kanadan- ranskalainen bakteriologi, joka opiskeli Ranskassa ja toimi yhteistyössä Pasteur-instituuttien kanssa. Hän huomasi fagi-infektion ensin 1917 Shigella-tutkimuksissaan; patogeenisten bakteerien viljelmä hävisi, ja d'Herelle antoi "eliölle" nimen bakteriofagi, ja arveli ilmiön liittyvän immuniteettiin. Felix

d'Herelle tutki myöhemmin fagien lisääntymiskiertoa ja huomasi latentin vaiheen tartunnan jälkeen. Belgialainen, Nobelpalkittu immunologi Jules Burdet yritti selittää ilmiön bakteereista itsestään johtuvaksi (Koulukuntien näkemys erot voitiin selittää vasta paljon myöhemmin; Burdet



Rollin D. Hotchkiss

tutki lauhkeita fageja, kun taas Felix d'Herelle tutki virulentteja fageja.) Ennen siirtymistään immunologiaan 1936 F. Macfarlane Burnet havaitsi, että fageja on monia eri bakteereihin erikoistuneita lajeja, ja että bakteerikannoissa saattoi esiintyä fagi-resistanssia.

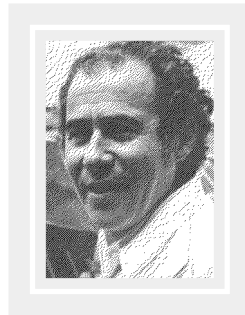
Varhaisia fagitutkijoita olivat myös John H. Northrop (Nobel-p. entsyymien kristallisaatiosta), Wendell Stanley (Nobel TMV:n kiteyttämisestä 1946), sekä heidän kollegansa A.P. Krueger (Rockefeller Institute, Princeton). Modernin fagitutkimuksen perustajana pidetään kuitenkin Max Delbrückiä, ja fagitutkimus jaetaan pre- ja post-Delbrück-kausiin.

Max **Delbrück** syntyi Berliinissä 1906, isä oli historian professori Berlinin yliopistossa. Max Delbrück opiskeli Göttingenissä, alkaen astronomialla, siirtyen sitten teoreettiseen fysiikkaan Max Bornin ja Walter Heitlerin opastuksella; väitöskirja 1930 kemiallisista sidoksista. Delbrück oli syyslukukauden 1929 Englannissa Bristolin yliopiston Fysiikan laitoksessa, ja 1931-32 Niels Bohrin laitoksessa Kööpenhaminassa. Bohrin luona Delbrück innostui myös biologiasta.

Ratkaisena sysäyksenä biologia-suuntaukseensa Delbrück piti Bohrin esitelmaa Valo ja elämä, jonka Bohr piti Valoterapia-kokouksessa Christiansborgissa 1932, johon Delbrück kuin sattumalta ehti juuri matkalta palattuaan. Hänen toverinsa Léon Rosenfeld oli tullut rautatieasemalle vastaan ja vei Delbrück:in suoraan esitelmätaloi-suuteen, joka muutti hänen harrastuksensa suunnan.

Kööpenhaminan jälkeen Delbrück vieraili (Rockefeller Foundation:in stipendillä) Wolfgang Paulin laitoksessa Zürichissä. Rockefeller Foundation teki mahdolliseksi Delbrück:in siirtymisen myöhemmin USA:han. Palattuaan 1932 Berliiniin Delbrück työskenteli 5 vuotta Kaiser Wilhelm Instituutin Kemian laboratorioissa mm. Lise Meitnerin assistenttina, joka taas oli yhteistyössä radiokemisti Otto Hahnin kanssa. Geneetikko Hermann J. Muller, joka oli tunnettu sädetysmutaatiokokeistaan työskenteli 1932 Berliinissä jonkin aikaa venäläisen emigrantin Nikolai Timoféef-Ressovsky:in kanssa, jonka työt kiinnostivat myös Delbrück:iä.

Yhdessä Nikolai Timoféef-Ressovsky:in ja fyysikko K.G. Zimmerin kanssa Delbrück julkaisi ”target teorian”, sittemmin virheelliseksi osoittautuneen kvantti-mallin geenimutaatioiden syntymisestä (geenit oli arvioitu siinä n. 100x liian suuriksi), mutta julkaisu herätti paljon kiinnostusta. Mm. Erwin Schrödinger 1944 siteerasi paljon Delbrückin geenimallia tunnetussa kirjassaan “What is Life?” Vaikka kirjan tiedot vanhenivat nopeasti, se teki Delbrück:istä hyvin tunnetun fyysikko-biologin,



Norton D. Zinder

ja tämä näkyi vielä Cal Tech: in aikoina, 1940-luvun lopulla, Delbrück:in laboratorion suosiona.

Rockefeller Foundation:in apurahalla Delbrück saapui Kalifornian tekniseen Instituuttiin (Cal Tech) 1937. Hän oli valinnut Cal Tech:in ja siellä Morganin laboratorion alkaakseen

banaanikärpägenetiikan, mutta jo vuoden kuluttua havaitsi sen liian monimutkaiseksi geenien tutkimiseen. Näin Delbrück

siirtyi mahdollisimman yksinkertaisiin organismeihin Emory Ellis:in suosituksesta, joka oli valinnut virukset kohteekseen syöpätutkimuksen vuoksi. Ellis ja Delbrück parantelivat d'Herellen käyttämää tekniikkaa analysoidakseen tarkemmin fagien lisääntymistä. Kun Delbrück:in stipendikausi 1939 päättyi, toinen maailmansota oli tulossa, ja niin hän päätti jäädä Kaliforniaan. Vuodet 1938-42 kuluivat pääasiallisesti em. Burdet'in, Northropin ym. fagien lisääntymisestä esittämien käsitysten kumoamiseen.

Salvador E. **Luria** oli opiskellut lääketiedettä Italiassa, ja työskenteli sitten Enrico Fermi laboratoriossa Roomassa. Hän tunsikin Delbrück:in target teorian, mutta alkoi fagityöt itsenäisesti käyttääkseen viruksia geenin rakenteen selvittämiseen. Mussoliinin kaudella Salvador E. Luria siirtyi Pariisiin Radium Instituuttiin tutkien Eugène Wollmanin kanssa mm. fagien suhtautumisesta sädetykseen. Saksalainen miehitys ajoi Lurian Ranskasta USA:han Rockefeller Foundation:in avulla Luria sai tutkijan toimen College of Physicians and Surgeons:ista Columbia University:stä (New York) Frank M. Exnerin laboratorion, ja jatkoi sädetystutkimuksiaan faageilla.

Salvador E. **Luria**:n ja Max **Delbrück**:in yhteistyö alkoi joulukuussa 1940, kun he tapasivat eräissä kokouksissa Philadelphiassa (American Association for the Advancement of Sciences Meeting). He alkoivat yhteistyön ensin Lurian laboratoriossa Columbia University:ssä, ja jatkoivat sitä Lurian siirryttyä Bloomingtoniin Indianan yliopistoon ja Delbrückin vastaavasti 1940 Vanderbiltin yliopistoon. Kevään 1942 Luria työskenteli vierailevana tutkijana Vanderbilt University:ssä, Nashvillessä.

E.H. Anderson ja Luria löysivät RCA:n Camdenin Laboratorion uudella elektronimikroskoopilla bakteerifaageista hännän 1942, ja kun Anderson sai RCA:n asentaman elektronimikroskoopin myös MBL

(Marine Biology Laboratory) :ään Woodshole:iin, fagien lisääntymisen eri vaiheet saatiin kuvatuiksi 1943.

Fernandus Payne sai Indianan yliopiston kutsumaan Salvador E. Luria:n Bloomingtoniin 1943 tammikuussa, jossa Lederberg jatkoi käytännön fagitöitä, kun taas teoreettisen puolen yhteisjulkaisuista suoritti Delbrück Vanderbilt:issa.

Kesäisin he jatkoivat työtään Cold Spring Harbor:issa, jonne Demerec kutsui heidät 1941 ensi kerran. Cold Spring Harbor:in ensimmäinen fagikurssi pidettiin kesällä 1945. Vuosien varrella kursseille osallistui suuri joukko mikrobigenetiikan nimekkäimpiä tutkijoita: esim. A.H. Doermann, Rollin D. Hotchkiss, Werner Maas, Stuart Mudd, Herman Kalckar, Seymour S. Cohen, Howard B. Newcombe, Harriet Taylor (myöh. Ephrussi-Taylor), Leo Szilard, Aaron Novick, **Gunther Stent**, G. Bertani, W.F. Goebel, Norton Zinder, jne.

Vanderbilt:issä kuitenkin hyvien oppilaiden puute rupesi vaivaamaan Delbrück:ia, joka täytti 40 vuotta, ja halusi hakeutua uuteen paikkaan. Delbrück sai kutsuja mm. Cold Spring Harbor Laboratory:stä ja Englannista (Manchesterin yliopistolta, jossa Delbrück vierailikin kesällä 1946).

Syksyllä, kun Delbrück oli jo muuttamassa Eurooppaan, hänelle tarjottiin biologian professuuria Cal Tech:ista, ja niin Delbrück muutti suunnitelmiaan ja palasi Kaliforniaan tammikuussa 1947. Cal Tech tarjosi ylivoimaisesti parhaan työympäristön: George W. Beadle oli Morganin jälkeen biologian division johdossa ja Linus Pauling vastaavasti kemian puolella.

Seuraavat 10 vuotta olivat Cal Tech:in Fagiryhmän tehokkainta aikaa, Delbrückin laboratoriossa vierailivat mm. Alfred Day Hershey, A.H. Doermann, Salvador E. Luria, James D. Watson, Seamour Benzer, Sidney Brenner, G. Bertani, Jaques Monod, André Lwoff, Francois Jacob, Elie Wollman, William Hayes, R.L. Sinsheimer, Jean Weigle, George Streisinger, Peter Starlinger, Gunther Stent, Renato Dulbecco ym.

Alfred Day **Hershey**, oli opinnoiltaan kemisti, Ph.D. Chicagon yliopistosta 1934. Hershey aloitti tutkimuksensa fagien inaktivoimisesta vasta-aineilla J.J. Bronfenbrenner:in assistenttina (Department of Bacteriology, Washington University, School of Medicine, St. Louis), sai apul. prof. toimen -38 ja associate prof. 1942. J.J. Bronfenbrenner arveli fagien liikkuvan diffuusion myötä ja laski partikkeleille (6 $\mu$ m) keskikoon mukaisen diffuusio- vakion. Kun J.J. Bronfenbrenner ensi kerran näki Andersonin ja Lurian RCA:n Camdenin laboratoriossa ottamia elektronimikroskooppikuvia faageista, hän huudahti: "Mein Gott, They've got tails", niillähän on häntä ja jos

ne käyttävät sitä liikkumiseen niin kaikki laskemani diffuusiovakiot ovat päin seinää.

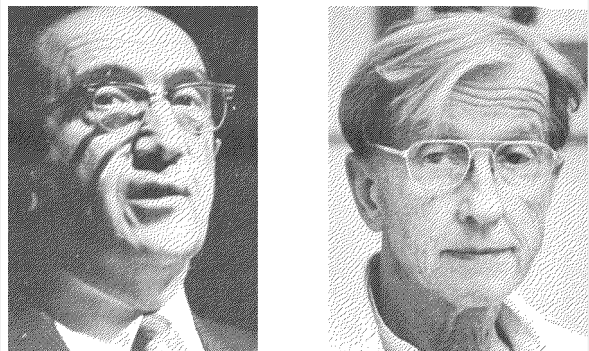
Alfred D. Hershey alkoi kirjeen vaihdon ja fagikantojen vaihdon Delbrück:in kanssa, ja 1943 Delbrück kutsui Alfred D. Hershey:n pitämään seminaarin Vanderbiltissa. Alfred D. Hershey:n ja Max Delbrück:in yhteistyö jatkui aina Max Delbrück:in kuolemaan 1981 saakka. Kirjeenvaihdossa Max Delbrück aluksi tervehti kunnioittavasti: Dr. Hershey, myöhemmin vain Hershey ja viimein tuttavallisesti Al.

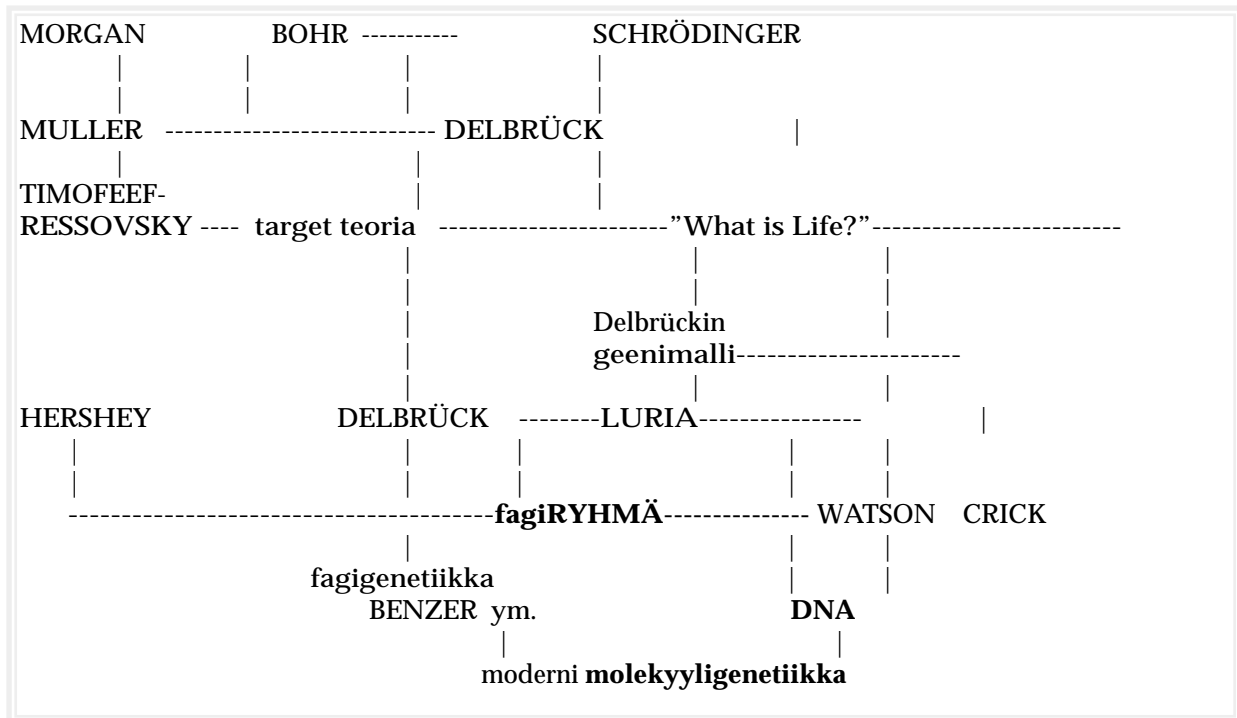
Huhtikuussa 1943 Max Delbrück ja Salvador E. Luria matkustivat Al Hersheyn luo St. Louisiin pitämään seminaariesitelmää. Tämä oli ilmeisesti näiden kolmen tulevan Nobelistin ensimmäinen kohtaaminen.

1950 Alfred D. Hershey siirtyi St. Louisista Department of Genetics of Carnegie Institution of Washington:iin Cold Spring Harbor:issa, jossa hän työskenteli seuraavat 24 vuotta eläkkeelle siirtymiseensä asti 1974. Cold Spring Harbor oli Al Hersheyille mieluinen ympäristö, koska hän oli intohimoinen purjehtija, joka vietti vuosittain pitkät ajat merellä.

Fagiryhmän työn tuloksena selvisi, että fageilla voidaan tehdä genetiikkaa selvittäviä kokeita samalla tavalla kuin kehittyneemminkin organismeilla. Tätä ei osattu aiemmin edes kuvitella, vaikka F. Macfarlane Burnet ym. olivat jo 1930-luvulla havainneet vaihtelua fagien ominaisuuksissa. Eräs myöhemmin tärkeäksi osoittautunut mutaatio oli *r* eli *rapid lysis*, jonka Hershey kuvasi 1946, ja jolla Seamour Benzer teki tunnetut geenin hienorakennetutkimuksensa. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology:ssä 1946 Hershey kuvasi myös risteytyskokeista fageilla ja rekombinaatiosta *rapid lysis* ja *host range* -mutanttien kesken, jota tosin aluksi kutsuttiin nimellä "induced mutation", jota käytettiin myös Averyn ym.

Salvador E. Luria ja Max Delbrück





transformaatiokokeiden yhteydessä. Max Delbrück oli tehnyt miksaus­kokeita kahdella fagikannalla T2r ja T4r, joiden tuloksia hän selosti ensin 26.1.1946 New York Cityn mutaatiokokouksessa ja sitten kesällä -46 Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology:ssa.

Herman J. **Muller**, joka kuuli tuloksista 1946 Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology:ssa, halusi selittää ilmiön rekombinaatioksi, joka termi sitten otettiin käyttöön fagi-kokeissa syyskuun aikana 1946 saatujen uusien tulosten julkaisemisen yhteydessä. Hershey ja Rotman (1948, 49) pystyivät tekemään ensimmäiset crossover-kartat virusten genomista.

Seamour **Benzer** teki väitöskirjansa fysiikasta Purdue University:ssä 1947, ja toimi sitten fysiikan apul. professorina Purdue:ssa.

Seamour Benzer kiinnostui yhä enemmän biologiasta mm. Schrödingerin kirjan innostamana, kuten Max Delbrück. Seamour Benzer palkattiin suunnittelemaan biofysiikan koulutusta Purdue yliopistoon. Lurian kautta hän hakeutui Cold Spring Harbor Laboratory:ssä pidetyille fagikursseille 1948.

Työskenneltyään vuoden Oak Ridgessä Tennesseeessä (Oak Ridge National Laboratory) Alexander Hollaenderin kanssa, Seamour Benzer vietti kaksi vuotta Delbrückin luona Cal Tech:ssä (1949-51) sekä vielä vuoden Pasteur-instituutissa yhteistyössä Francois Jacobin kanssa André Lwoffin laboratoriossa. Vasta sen jälkeen Benzer palasi takaisin Purdue University:in organisoimaan

sinne suunniteltua biofysiikan laboratoriota.

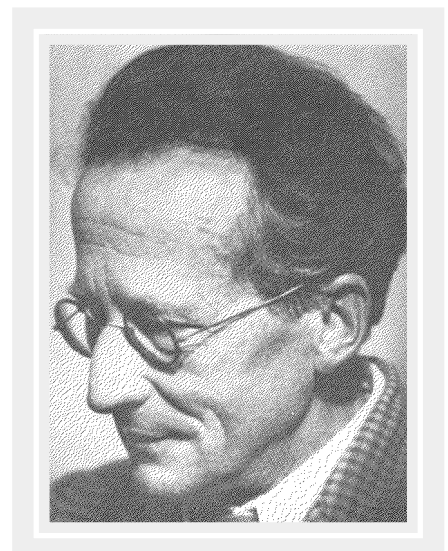
Pariisissa ollessaan Seamour Benzer keksi perusideat T4 fagin rII geenin kartoittamiseksi, mikä työllisti hänet täysin seuraavan kymmenen vuoden ajaksi, jonka jälkeen Benzer vaihtoi alansa molekylääri-neurobiologiaan ja mm. Drosophilan fate-mapping:iin ja käyttäytymisgeenitutkimukseen.

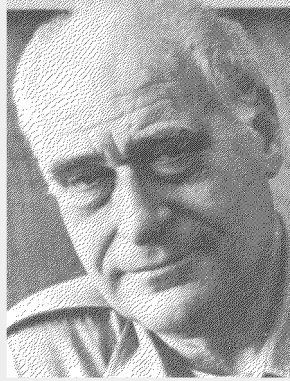
V. 1975 Seamour Benzer nimitettiin Cal Tech:iin neurobiologian Boswell Professorin virkaan.

Jo ennen Seamour Benzerin T4 rII-geenin rakenneanalyysiä muutamat tutkijat esim. G.

Pontecorvo (Glasgowin yliopistossa) olivat pyrkineet geenien rakenteen tarkempaan analyysiin. Drosophila-kokeissakin päästiin 1940-luvun lopulla rekombinaatio-frekvensseihin, jotka olivat luokkaa 10<sup>-5</sup>, mikä vastaa geenien sisäistä

Erwin Schrödinger





Gunther Stent

recombinaatiovälit vastasivat pari vuotta aiemmin selvityn DNA:rakenteen (Watson-Crick-mallin) nukleotidipareja. Fyysikkona Seamour Benzer suosi -on -pääteisiä termejä keksiessään uusia nimityksiä geenille (cistron), rekombinaatioyksiköille (recon) ja mutaatioyksiköille (muton).

Geenikomplementaation Cis-konfiguraation oli esitelty jo Haldane 1942. Cis-trans-testiä käytettiin myös *Drosophila*-kokeissa (E.B. Lewis 1951) ja sienigenetiikassa (Pontecorvo -58). Seamour Benzer'in koetilannetta kuvattiin "Hershey'n taivaaksi", koska Alfred D. Hershey oli sanonut eräässä haastattelussa, että tutkijan suurin onni oli keksiä koejärjestely, joka toimii täydellisesti, ja saada toistaa tätä toimivaa koetta loputtomasti. Seamour Benzer'in ideaa käyttää ns. konditionaali- l. tilanne-letaaleja kantoja on myöhemmin sovellettu myös muissa kartoitusprojekteissa.

1952 Alfred D. **Hershey** ja Martha **Chase** tekivät kokeen, joka ratkaisevasti osoitti ainoastaan DNA:n kulkeutuvan tartunnassa isäntäbakteerin sisään ja toimivan keskeisesti fagien lisääntyessä sekä siten DNA:n välittävän fagien perinnöllisyyttä. Alfred D. Hershey:n tulkinnat kokeesta olivat aluksi epävarmoja, mutta Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology:ssa 1953 kokeen suuri merkitys tuli hyvin esille. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1953, jonka Max Delbrück organisoivat oli virus-genetiikan läpimurto. Samassa kokouksessa jaettiin eripainoksina kolmea vastikään *Nature*ssa ilmestynyttä artikkelia DNA:n kaksoiskierrekenteestä ja replikaatiotavasta, ja toinen W-C-mallin keksijöistä, James D. Watson saatiin viime tingassa mukaan kokoukseen esitelmöimään uudesta mallista.

Eräs mielenkiintoisimmista seikoista oli W-

crossing overia, Neurospora- ja Aspergillus-kokeissa päästiin yhä suurempaan tarkkuuteen  $10^{-6}$ , ja bakteerikokeissa  $10^{-7}$ , -8, -9. Näin centi-Morganien asemesta voitiin käyttää milli-Morgan ja mikro-Morgan rekombinaatioyksiköitä. T4-fagin kannoilla K ja S Seamour Benzer saattoi analysoida rII-geenin aluetta niin tarkasti, että

### Alfred Day Hershey

C-mallin esittämä DNA:n replikaatio-tapa; kaksoisrihman halkeamiseen perustuva semikonservatiivinen replikaatio. Siitä lähtien, kun virusten monistuminen oli nähty bakteereissa, DNA:n nopea replikaatio oli askarruttanut tutkijoita.

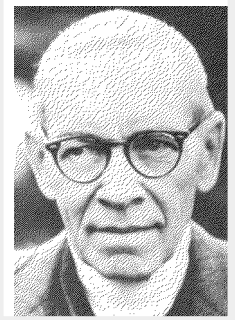
A.H. Doermann keksi 1948 menetelmän fagin tartuttamien bakteerisolujen hajottamiseen ja fagien lisääntymisen seuraamiseen. Cold Spring Harbor:ssa ollessaan A.H. Doermann havaitsi, (ja samalla vahvisti aiemmat mm. d'Herellen epäilyt,) että fagin elämässä on n. 10 min. latentti jakso (eclipse) tartunnan jälkeen, jota seurasi fagipartikkelien nopea lisääntyminen.

A.H. (Gus) **Doermann** oli George W. Beadle'in oppilas Stanfordinista. D. siirtyi Neurospora-genetiikasta fagitutkijaksi Max Delbrück'in vaikutuksesta. D. työskenteli fagi-ryhmässä Vanderbilt University:issä, Cold Spring Harbor:issa ja Cal Tech:issa ennen asettumistaan Oak Ridge National Laboratory:iin, jonka jälkeen D. on työskennellyt mm. University of Rochester:issa ja University of Washington:issa, (Seattlessa).

H. **Fraenkel-Conrat**, R. Williams, B. **Singer** ym. osoittivat, että tupakkamosaiikki-virusessa RNA muodostaa rungon, joka määrää proteiiniosien paikan ja että virus voidaan purkaa ja osat saattaa uudelleen oikeaan järjestykseen.

Näin sekä bakteeri- että viruskokein oli saatu jo 1952 varmat näytöt siitä, että nukleinihapon, erityisesti DNA:n osuus perinnöllisyysilmioissä on keskeinen, ja että DNA:lle on löydettävä uusi lineaarinen? rakennemalli. Lineaarisen rakenteen suuntaan viittasivat viittasivat myös DNA:n eristystulokset, Hammarsten jo vuodelta 1924, Signér, Caspersson ja Hammarsten 1938, sekä röntgenkristallografia; Astby ja Bell 1938, samoin kuin Averyn ym. transformaatio-kokeissaan havaitsema DNA:n paljon tetranukleotidia suurempi molekyylipaino (>500 000).

Myös *Drosophila*län geenien analyysit (L. Oliver, Melvin & Kathleen Green, Ed. Lewis ym.) osoittivat jo 1949, että monet geenit (esim. *lozenge*, *white*, *Notch*, *bx*, *Star*, *asteroid*) voitiin jakaa

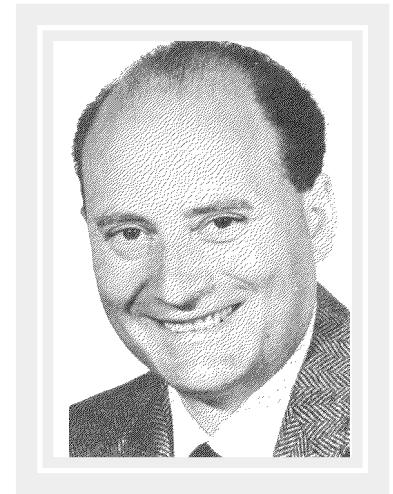


pitkittäisiin osiin, niissä on sisäistä rekombinaatiota, mikä viittasi niiden lineaariseen, lankamaiseen rakenteeseen paremminkin kuin pallomaiseen (kromomeerintapaiseen) mikroskoopista saatuun geenikäsitukseen.

## H Yleistä henkilö- ja tapahtumahistoriaa.

- 1899 M.W. Beyerinck demostroi uuden mikroskoopilla näkymättömän, bakteerifiltterinkin läpäisevän, ja lisääntyvän pieneliön, tupakkamosaiikkiviruksen.
- 1900 Karl Landsteiner löysi agglutinaation ja esitteli 1901 veriryhmät A,B,C(=O)
- 1901 de Vries esitteli mutaatio-termin perinnöllisille muutoksille
- 1910 Peyton Rous todisti kanan sarkoomaviruksen tartuntaominaisuuden
- 1914 C.C. Little tutki tuumorien geneettistä alkuperää
- 1915 Twort eristi bakteeriviruksen, 1917 d'Herelle osoitti sen lisääntymisen
- 1918 H. Spemann osoitti induktion alkionkehityksessä
- 1923 T. Svedberg rakensi ultrasentrifugin
- 1926 B.J. Sumner kristallisoi ureaasi entsyymin ja osoitti sen proteiiniksi
- 1928 F. Griffith löysi Pneumokokkien transformaation
- 1929 A. Fleming löysi penisilliinin
- 1930 Landsteiner sai Nobel-palkinnon veriryhmätutkimuksistaan
- 1931 Harriet Creighton ja Barbara McClintock maissilla ja Curt Stern Drosophilalla, todistivat kiasman ja crossing overin samanaikaisuuden.
- 1932 C.D. Darlington osoitti kiasmojen terminalisoitumisen kromosomeissa M. Knoll ja E. Ruska ym. rakensivat elektronimikroskoopin
- 1933** A.W.K. Tiselius esitteli elektroforeettisen molekyylierottelun perusteet Polyteenikromosomit selitettiin (Hans Bauer, Emil Heitz, T.S. Painter)
- T.H. Morgan sai Nobel-palkinnon, McClintock huomasi kiasman parasentrisen inversion alueella aiheuttavan sillan ja fragmentin (=asentrisen ja disentrisen kromosomin)
- 1934 M. Schlesinger osoitti virusten koostuvan DNA:sta ja proteiineista McClintock osoitti nukleoliorganisaattorin monistuneen geenirakenteen
- 1935 F. Zernicke keksi faasikontrastimikroskoopin, Spemann sai Nobel-

- palkinnon, W.M. Stanley kristallisoi TMV:n, Bridges julkaisi Drosophilan SRKromosomikartat
- 1936 Caspersson kehitti sytospektrofotometrin DNA-mittauksiin
- 1937 F.C. Bawden ja N.W. Pirie osoittivat TMV:n rakentuvan proteiineista ja RNA:sta
- 1939 Ellis ja Delbrück; fagien elämäntietoa
- 1941 Beadle & Tatum Neurosporan kemialliset mutantit
- 1944 Avery, MacLeod ja McCarty osoittivat DNA:n osuuden transformaatioissa
- 1946 M. Delbrück, W.T. Bailey ja A.D. Hershey löysivät fageista rekombinaation
- 1948 A. Boivin, R. ja C. Vendrely osoittivat solujen DNA-määrän vakioksi samalla lajilla H.K. Mitchell ja J. Lein löysivät tryptofaanisyntetaasin mutantin (yksi geeni-->yksi ents.)
- 1949 J.V. Neel sirppisoluanemia (SSA) on periytyvä, L. Pauling, H.A. Itano, S.J. Singer ja I.C. Wells olettivat, että SSA on hemoglobiinin rakennevika, M.L. Barr ja E.G. Bertram löysivät Barrin bodyn.
- 1950 B. McClintock löysi hyppivät elementit Ac ja Ds maissista Lvoff ja Gutman löysivät lysogeenisen bakt. kannan, Siminovitz, Kjeldgaard ja Lvoff havaitsivat profagit, Lederberg löysi lamda-fagin (episomin)
- 1951 Y. Chiba löysi kloroplasti-DNA:n, N.H. Horowitz ja U. Leupold lämpöherkät mutantit.
- 1952 G.E. Palade keksi puskuroidut fiksaatiivit, R. Dulbecco alkoi eläin viruskokeet G. Pontecorvo ja J.A. Roper löysivät mitoottisen rekombinaation Aspergillus-sienestä Zinder ja Lederberg; transduktio, Fred Sanger; insuliinin rakenne, Hershey ja Chase; DNA:n osuus virusten perinnöllisyydessä.



Seamour Benzer