

Synthetische Gene

Autor(en): **Weber, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche**

Band (Jahr): **28 (1972)**

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307929>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Synthetische Gene

H. WEBER

Vor weniger als 30 Jahren identifizierten AVERY u. Mitarb. [1] das transformierende Prinzip bei Pneumokokken – und damit den materiellen Träger der Erbinformation – als Deoxyribonukleinsäure (DNA). Die Struktur dieser Substanz wurde von WATSON und CRICK 1953 in ihren Grundzügen aufgeklärt [2]. Abb. 1 zeigt eine Darstellung dieser bekannten Doppelstrangstruktur, bei welcher zwei kontinuierliche Ketten von Deoxyribose- und Phosphatgruppen in unregelmässiger Reihenfolge die vier verschiedenen Basen tragen. Die Anordnung der Basen auf den beiden Strängen ist komplementär, d. h. einem Guanin (G) steht immer ein Zytosin (C), einem Adenin (A) ein Thymin (T; in Ribonukleinsäure Urazil = U) gegenüber, und diese Basenpaare sind durch spezifische Wasserstoffbrücken stabilisiert. Wir wissen, dass die genetische Information in der sequentiellen Anordnung der Basen auf der DNA kodiert ist. Die Replikation der DNA und die Expression ihrer genetischen Information stehen bis heute im Zentrum des Interesses der biologischen Forschung. Einer der eindrucklichsten Erfolge dieser Bemühungen war in der Mitte der sechziger Jahre die Aufklärung des genetischen Kodes, welche es uns heute weitgehend ermöglicht, die Bedeutung der Basensequenzen zu entziffern, mit andern Worten, die chemische Sprache, in der die Erbinformation in den Genen festgelegt ist, zu verstehen.

Seit der Mensch die Lebewesen seiner Umwelt systematisch für seine Zwecke verwendet, hat er versucht, auf ihr Erbgut Einfluss zu gewinnen. Wie wir alle wissen, hat die moderne Genetik es in dieser Richtung zu erstaunlichen Leistungen gebracht. Während aber bisher eine genetische Veränderung immer nur im Sinne der Selektion von Zufallsereignissen möglich war, können wir uns, dank den erwähnten Erkenntnissen der Biologie, heute an das Problem heranwagen, durch chemisch definierte Eingriffe an der DNA gezielte Veränderungen der genetischen Information mit voraussehbaren spezifischen Folgen für den Organismus zu erzeugen. Welche Fortschritte in dieser Richtung erzielt worden sind, soll im folgenden kurz dargestellt werden.

Praktisch stellen sich der direkten, chemischen Modifikation eines be-

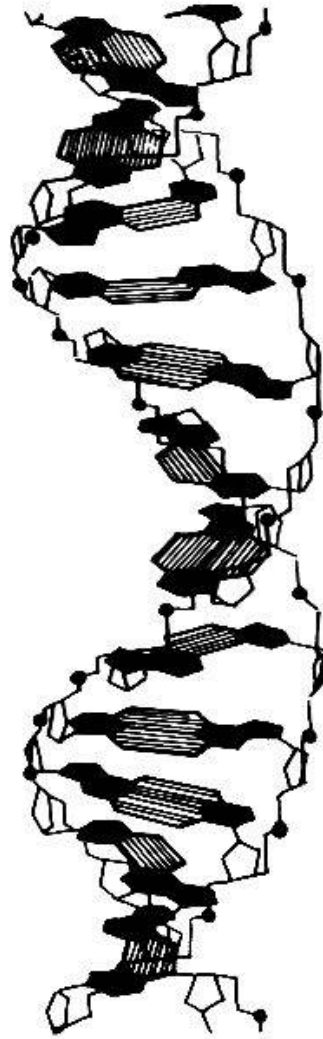


Abb. 1. Die Doppelspiralstruktur der Deoxyribonukleinsäure.

stimmten Gens auf der DNA wegen der regelmässigen, chemisch gleichförmigen Struktur dieses Makromoleküls bisher unüberwindliche Schwierigkeiten entgegen. Die Versuche zu einem gezielten Eingriff in die genetische Struktur haben sich deshalb hauptsächlich auf die Einführung von zusätzlicher oder veränderter Information in Form von DNA in die Zelle konzentriert. Wie wir im Vortrag von HAUSMANN noch genauer erfahren werden (s. S. 332), ist dies, zumindest bei Mikroorganismen, heute mit Hilfe der Transduktions- oder Transformationsmethoden weitgehend realisierbar, und die kürzlich publizierten Versuche von MERRIL u. Mitarb. [3] haben gezeigt, dass ein solcher Vorgang auch bei menschlichen Zellen unter Umständen im Bereich des Möglichen liegt. Auch die Isolierung von DNA-Stücken mit definiertem Gen-Inhalt wurde durch die Transduktion ungemein erleichtert, und vor etwa 2 Jahren gelang es SHAPIRO u. Mitarb. [4] durch eine Kombination von genetischen und Hybridisations-Techniken sogar, eine Gruppe von zusammengehörigen Genen – das Lac-Operon – aus *E. coli*-DNA rein darzustellen. In Abb. 2 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieser Lac-Operon-DNA zu sehen.

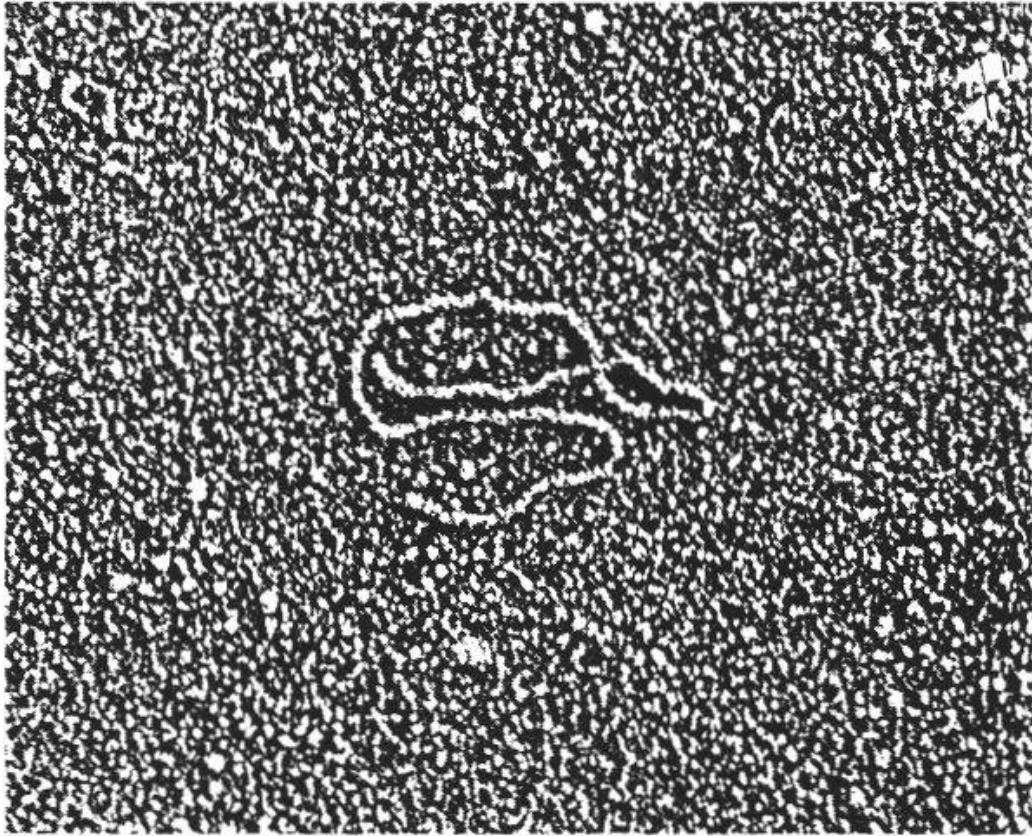


Abb. 2. Lac-Operon-DNA im Elektronenmikroskop. – Mit freundlicher Erlaubnis von Dr. J. BECKWITH und «Nature».

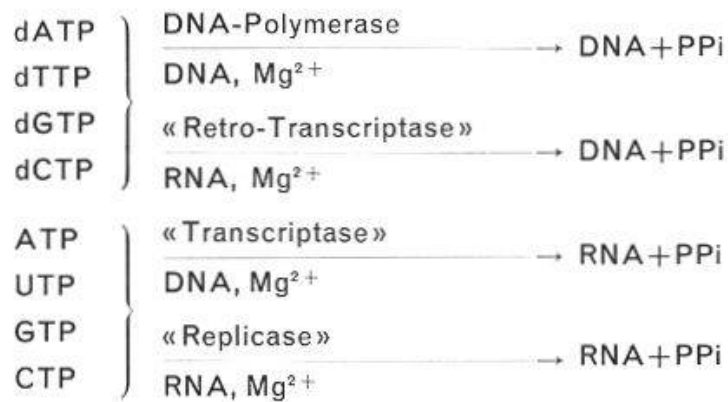


Abb. 3. Matrizenabhängige Nukleinsäuresynthese mit Hilfe verschiedener Enzyme. ATP, UTP, GTP, CTP = Ribonukleosid-Triphosphate, dATP, dTTP, dGTP, dCTP = Deoxyribonukleosid-Triphosphate, PPi = anorganisches Pyrophosphat.

Die Anwendungsmöglichkeiten von genetischen Eingriffen dieser Art würden sich natürlich noch vervielfachen, wenn es gelänge, DNA mit beliebigem Informationsgehalt synthetisch darzustellen. Schon vor der Aufklärung des genetischen Kodes verfügte man über mehrere Enzyme, welche imstande waren, Nukleosidtriphosphate zu DNA oder RNA (Ribonukleinsäure) zu polymerisieren. Wie in Abb. 3 angedeutet, brauchen einige dieser Enzyme für ihre Aktivität die Gegenwart einer Vorlage, einer DNA oder RNA, welche

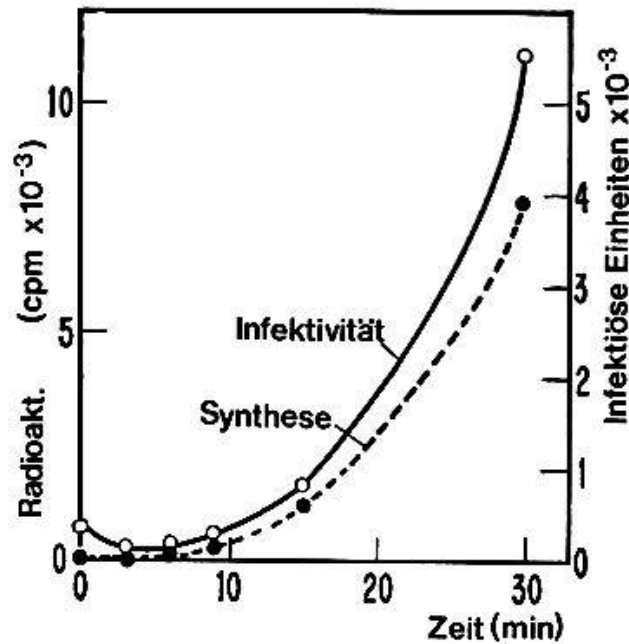


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der In-vitro-Synthese infektiöser Q β -RNA. Während die Synthese von RNA sofort in Gang kommt, nimmt die Infektivität erst nach einigen Minuten zu, wenn die ersten RNA-Moleküle mit Originalsequenz fertiggestellt sind.

als Matrize verwendet wird. Bei diesem Vorgang wird zuerst, analog dem Negativ in der Photographie, eine der Matrize komplementäre Nukleinsäurekette aufgebaut, welche dann unter Umständen in einem zweiten Reaktionsschritt als Matrize für die Herstellung der Originalsequenz dient. Bereits 1965 gelang es SPIEGELMAN u. Mitarb. [5] zu zeigen, dass auf diese Weise vollständig funktionsfähiges genetisches Material synthetisiert werden kann. Es handelte sich in diesem Fall um das Genom eines RNA-Virus, also um eine Ribonukleinsäure, welche in einer der Virus-RNA völlig ebenbürtigen, infektiösen Form enzymatisch synthetisiert worden war. Abb. 4 ist eine graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer solchen Synthesereaktion. Während die Syntheseaktivität sofort ansteigt, dauert es einige Minuten, bis man einen Infektivitätsanstieg beobachtet – genau so lange, wie das Enzym braucht, bis es einen vollständigen Negativstrang und daraus wieder einen infektiösen Positivstrang hergestellt hat (der Negativstrang ist nicht infektiös).

Auf analogem, obwohl etwas komplizierterem Wege gelang es später auch, infektiöse DNA von DNA-Viren in vitro herzustellen [6]. Ein in mancher Hinsicht vielversprechendes Ereignis war die kürzliche Auffindung einer neuen Polymerase aus Tumurviren, welche imstande ist, RNA als Matrize für die Synthese von DNA zu verwenden. Dieses Enzym tut also etwas, was dem normalen Informationsfluss in der Zelle, nämlich DNA \rightarrow RNA \rightarrow Protein, entgegengesetzt ist, und es sollte damit prinzipiell möglich sein, jede beliebige zelluläre RNA als Matrize für die Synthese des ihr entsprechenden Gens zu verwenden. Vor etwa einem Monat ist denn auch gleich aus drei amerikanischen Laboratorien die enzymatische Synthese von DNA bekanntgegeben

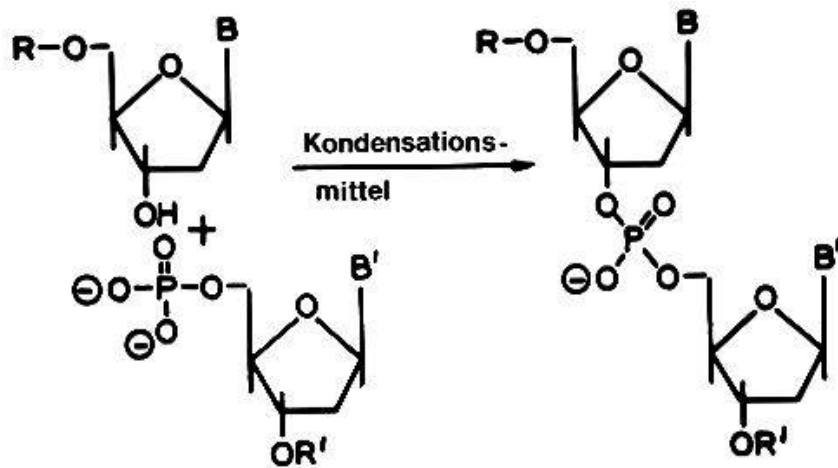


Abb. 5. Der elementare Reaktionsschritt bei der chemischen Synthese von Polydeoxyribonukleotiden: Ein Deoxyribonukleosid-Monophosphat geht in Gegenwart eines Kondensationsmittels mit einem andern Nukleotid eine Phosphodiester-Bindung ein.

worden, welche den Genen für tierisches oder menschliches Hämoglobin entspricht [7-9].

Die verschiedenen Arten von enzymatischer Synthese von genetischem Material sind bisher alle durch die Tatsache eingeschränkt, dass hier die Information, d. h. die Nukleotidsequenz, direkt von der Matrize auf das Produkt übertragen wird, ohne dass wir einen Einfluss darauf ausüben können, ja ohne dass wir sie in den weitaus meisten Fällen überhaupt im Detail kennen. Ein möglicher Eingriff, der allerdings bereits eine gewisse Kenntnis der Matrize voraussetzt, besteht darin, dass man die Polymerase an ganz bestimmten, definierten Stellen der Matrize zu fehlerhaftem Kopieren «verleitet», so dass dort definierte Mutationen im Produkt auftreten. Am Institut für Molekularbiologie der Universität Zürich ist zur Zeit ein Forschungsprogramm in dieser Richtung im Gange, und die bisherigen Resultate berechtigen zur Hoffnung auf baldige Erfolge.

Schliesslich kommen wir zur begrifflich wohl einfachsten, technisch aber mühseligsten Art der Herstellung von künstlichen Genen: der De-novo-Synthese von Nukleinsäuren mit den Mitteln der organischen Chemie. Hier haben wir nun wohl völlige Freiheit in bezug auf die zu synthetisierende Information. Wir müssen uns aber bewusst sein, dass das Gen eines mittleren Proteins um die tausend Basenpaare umfasst und dass die Synthese von etwas Derartigem also mindestens tausend einzelne Reaktionsschritte (für nur einen der zwei Stränge) voraussetzen würde: eine wahrhaft herkulische Aufgabe!

In der Forschungsgruppe von KHORANA, wo man sich seit 1965 Gedanken in dieser Richtung machte, steckte man sich die Ziele vorläufig etwas kürzer: Man wollte, um die vorhandenen synthetischen Methoden zu testen und neue zu entwickeln, zunächst eine natürliche DNA-Sequenz synthetisieren, die zwar möglichst kurz sein sollte, aber trotzdem die Information für ein definiertes natürliches Genprodukt enthielt. Wie schon erwähnt, ist aber

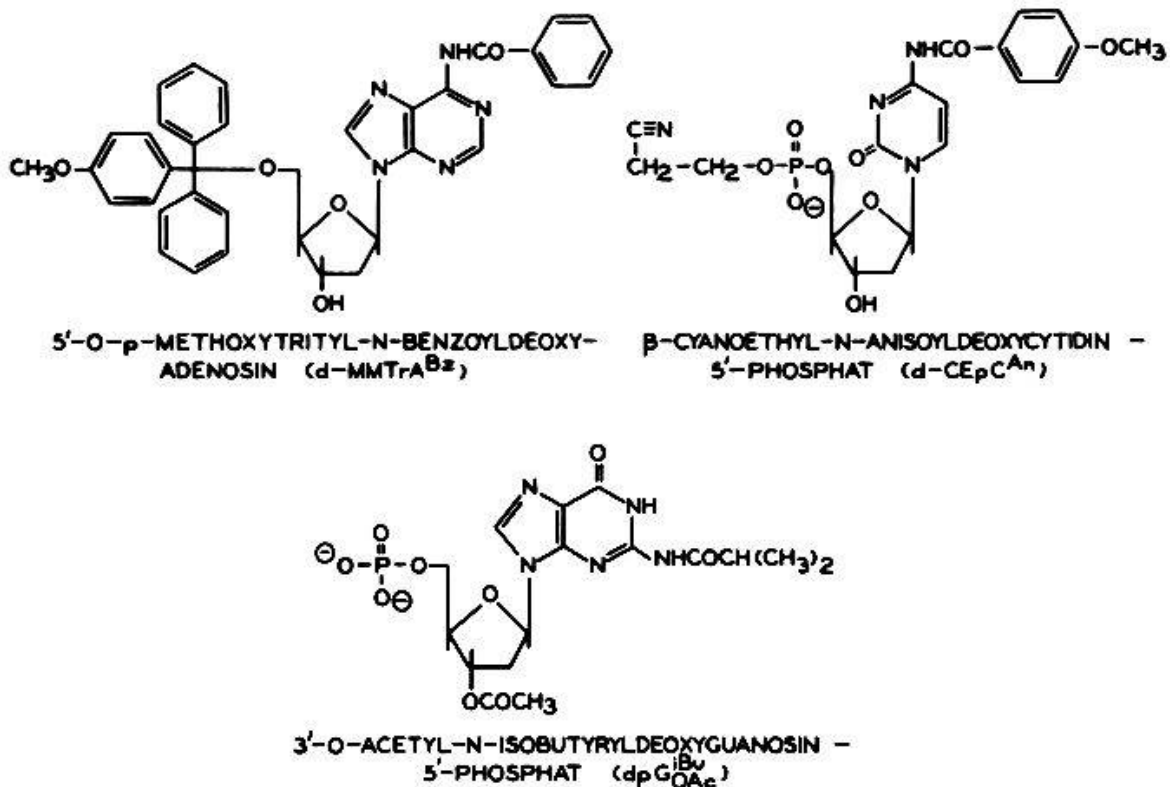


Abb. 6. Chemische Formeln von geschützten Nucleosiden und Nucleotiden.

unseres Kenntnis von natürlichen DNA-Sequenzen überaus spärlich, da die Sequenzbestimmung von DNA immer noch mit grossen technischen Schwierigkeiten behaftet ist. Dies ist für RNA in weit geringerem Masse der Fall, so dass bis heute natürliche RNA-Sequenzen von mehreren hundert Nucleotiden Länge bestimmt werden konnten. Die erste vollständige Sequenz einer natürlichen RNA Spezies wurde 1965 von HOLLEY u. Mitarb. [10] aufgeklärt. Es handelte sich um die Alanin-Transfer-RNA der Hefe, die in der Proteinbiosynthese der Zelle eine wichtige Rolle spielt.

KHORANAS Plan war es nun, das Gen für diese Transfer-RNA (tRNA), d. h. eine doppelsträngige DNA, welche in ihrer Sequenz den 77 Basen dieser RNA entspricht, auf chemischem Weg zu synthetisieren. An der Verwirklichung dieses Projektes haben im Verlaufe von fünf Jahren bis zu seinem Abschluss 13 Wissenschaftler aus 9 Ländern mitgearbeitet [11].

Um einen bessern Einblick in die Komplexität eines solchen Unternehmens zu erhalten, müssen wir kurz etwas auf die Chemie der Nucleinsäuren eingehen. Wie in Abb. 5 ersichtlich, besteht der elementare Reaktionsschritt in der Verknüpfung von Mononucleotiden, die ihrerseits bereits aus den drei Teilen Base, Deoxyribose und Phosphat bestehen. Da die für diese Reaktion zur Verfügung stehenden Kondensationsmittel von sich aus keine genügende Spezifität aufweisen, müssen die Reaktionskomponenten durch Einführung verschiedenartiger Schutzgruppen vor unerwünschten Nebenreaktionen bewahrt werden, wodurch sie einen noch komplexeren chemischen Aufbau erhalten (Abb. 6). Das Zusammenhängen solcher geschützter Nucleotide er-

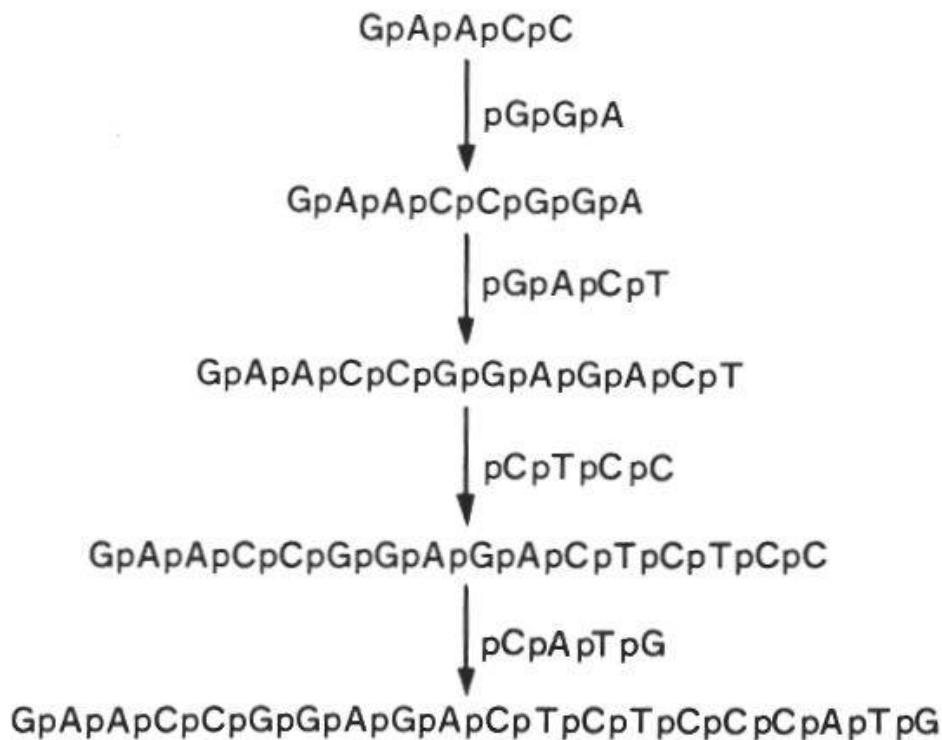


Abb. 7. Schema der chemischen Synthese eines DNA-Segments von 20 Nukleotiden (die Schutzgruppen sind einfachheitshalber weggelassen).

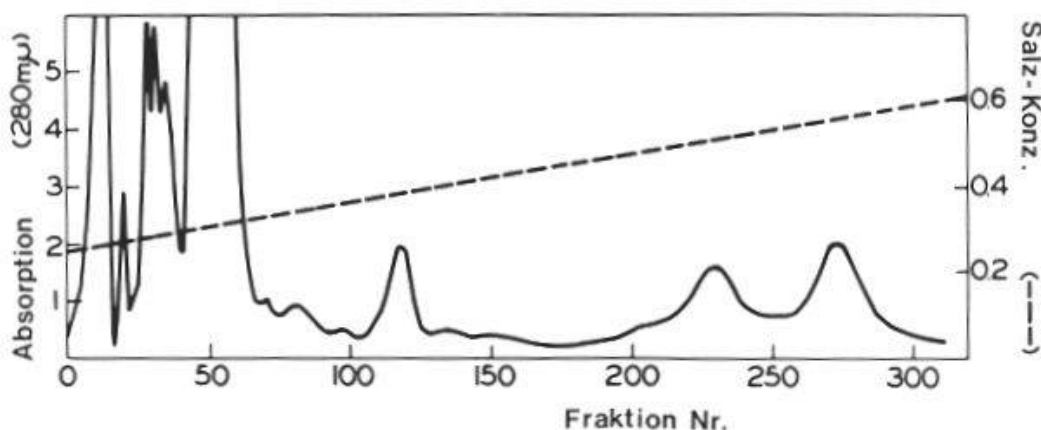


Abb. 8. Isolierung eines chemisch synthetisierten DNA-Segments (20 Nukleotide) durch Kolonnenchromatographie an DEAE-Zellulose. Die Elution der einzelnen Komponenten des Reaktionsgemisches erfolgt durch eine Lösung mit linear ansteigender Salzkonzentration. Die bei der höchsten Salzkonzentration eluierte Komponente ist das gewünschte Produkt; alle andern Komponenten sind Nebenprodukte.

folgt zunächst einzeln, dann in immer grösser werdenden Blocks, um damit die Anzahl der mit einer wachsenden Kette auszuführenden Reaktionsschritte herabzusetzen. In Abb. 7 ist diese Art der Synthese für ein zwanzig Nukleotide langes Stück des tRNA-Gens schematisch dargestellt. Nach jedem Reaktionsschritt muss das Produkt in einem umständlichen Trennverfahren durch Kolonnenchromatographie an DEAE-Zellulose gereinigt

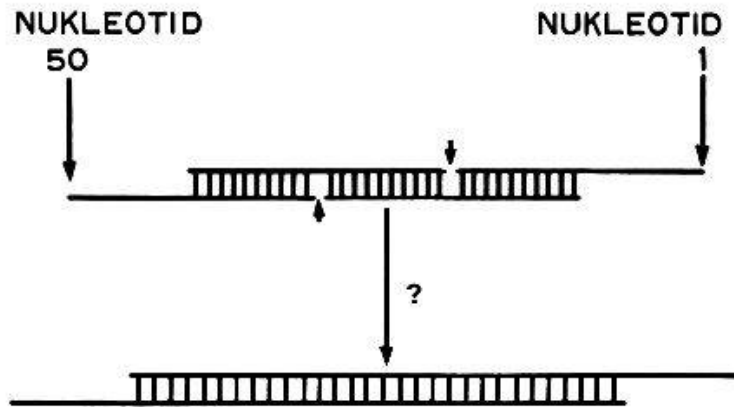


Abb. 9. Prinzip der Verknüpfung von DNA-Segmenten mit Hilfe überlappender Komplementärstrang-Segmente.

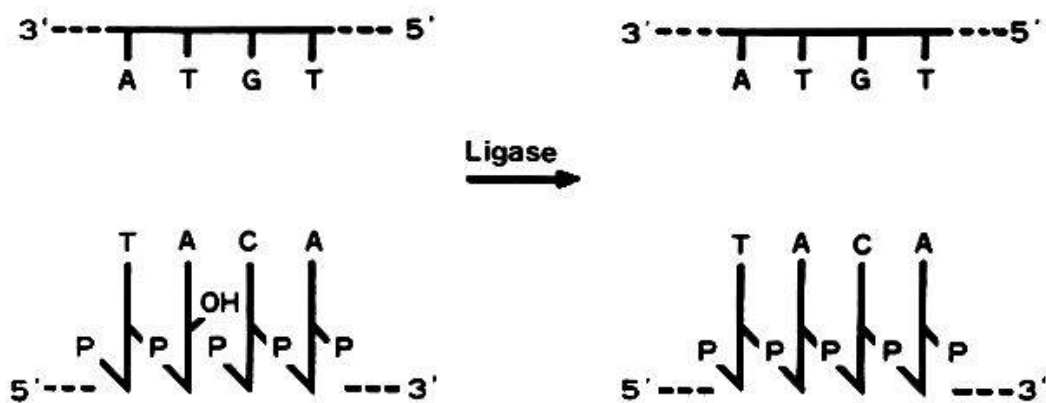


Abb. 10. Schematische Darstellung der durch die Polynukleotid-Ligasen katalysierten Reaktion. In Gegenwart des Komplementärstrangs wird die an der Kettenbruchstelle vorliegende Phosphomonoester-Gruppierung mit dem benachbarten DNA-Segment zur Phosphodiester-Gruppe verknüpft.

werden. Abb. 8 zeigt einen solchen Trennschritt, der zur Isolierung des oben erwähnten DNA-Segments führte.

Für die Synthese längerer DNA-Sequenzen mit der beschriebenen Methode wird der dazu notwendige Aufwand prohibitiv, und es wurde daher nach neuen Wegen gesucht, um DNA-Segmente einer Länge von 10–20 Nukleotiden miteinander zu verknüpfen. Das ins Auge gefasste Prinzip ist in Abb. 9 gezeigt. Es bestand darin, dass man sich chemisch synthetisierte Segmente von beiden DNA-Strängen herstellte und daraus nach Entfernung der Schutzgruppen Doppelstrangstrukturen bildete, wobei der Synthesepfad von Anfang an so angelegt war, dass ein Segment immer mit zwei komplementären Segmenten in Wechselwirkung trat. Auf diese Weise war es möglich, die zu vereinigenden Enden einander auf spezifische Weise anzunähern, und man hoffte, zu gegebener Zeit ein Reagens zu finden, welches für die Verknüpfung solcher Kettenunterbrüche geeignet war. Diese Hoffnung wurde nicht enttäuscht: Im Jahre 1966 berichteten eine ganze Anzahl von Arbeitsgruppen über die Auffindung von Enzymen, welche genau diese Reaktion

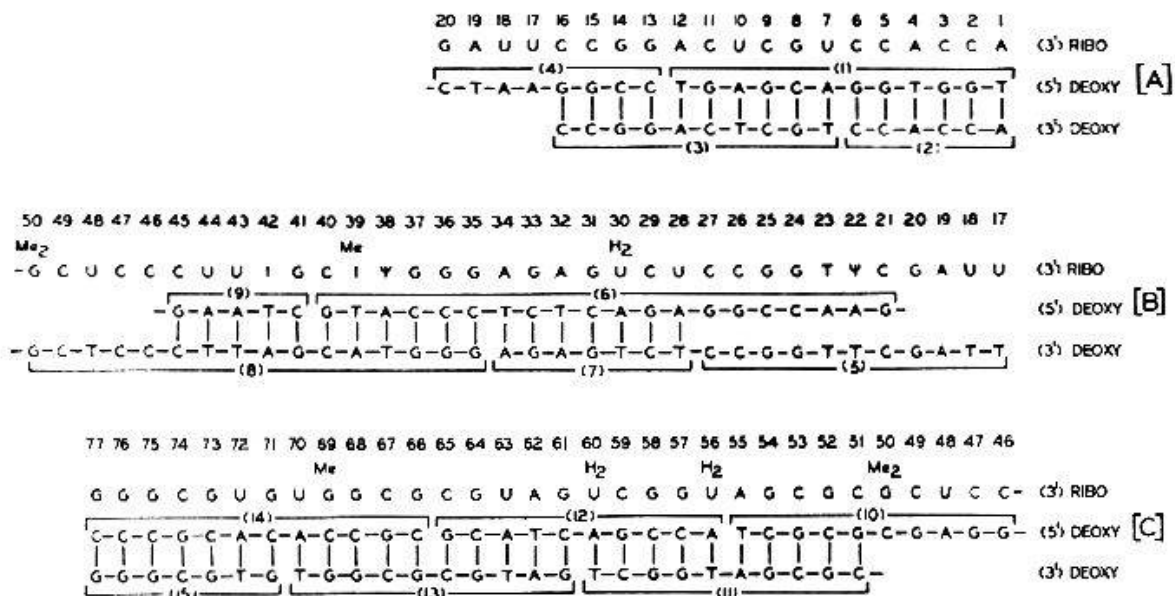


Abb. 11. Syntheseplan für das Alanin-Transfer-RNA-Gen. Das Gen wurde aufgeteilt in drei Abschnitte A, B und C. In den oberen zwei Zeilen jedes Abschnittes befinden sich die fortlaufende Numerierung und die Sequenz der Nukleotide der Transfer-RNA. Die unteren zwei Zeilen enthalten die Sequenz der beiden Stränge der synthetischen DNA, wobei die chemisch zusammengesetzten Segmente mit Klammern und Nummern (1-15) versehen sind. Mit Hilfe von Polynukleotid-Ligase wurden diese Segmente zuerst zu den Abschnitten A, B und C vereinigt. In einer letzten Etappe erfolgte schliesslich die Verknüpfung der drei Abschnitte zum fertigen Gen.

ausführen (Abb. 10): Zwei DNA-Fragmente werden in Gegenwart einer komplementären DNA-«Brücke» zu einem kontinuierlichen DNA-Strang zusammengesetzt.

Der Verwendung dieser Enzyme (der sogenannten Polynukleotid-Ligasen) für die Lösung des synthetischen Problems war ein voller Erfolg beschieden. Abb. 11 zeigt in einer Art Generalplan, wie zuerst eine Anzahl kürzerer Segmente zu drei grossen Teilstücken vereinigt wurden, welche man schliesslich in einer letzten Etappe zum fertigen Gen zusammensetzen konnte. Die Isolierung des Endprodukts mit Hilfe der Gelfiltration ist in Abb. 12 dargestellt. Zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurde eine doppelte Isotopenmarkierung (³²P und ³³P) verwendet.

Die Frage, ob dieses synthetische Gen in der Zelle auch als solches verwendet werden kann, dürfte nicht ganz einfach abzuklären sein. Man müsste es beispielsweise in einen Organismus transferieren können, der Alanin-Transfer-RNA nur in zu kleiner Menge oder in inaktiver Form selbst herstellen kann, und dann festzustellen versuchen, ob das synthetische Gen die Funktion des beschädigten, zelleigenen Gens übernehmen kann. Eine solche Versuchsanordnung gibt es in diesem Fall bis heute nicht. Bereits sind aber die synthetischen Arbeiten an einer zweiten Transfer-RNA-Sequenz weit fortgeschritten. Es handelt sich hier um das Gen einer anomalen RNA, welche die Eigenschaften eines sogenannten Suppressors besitzt. Dies bedeutet, dass Zellen, welche über diese Transfer-RNA verfügen, gewisse Mutationen

solche Zwecke auch synthetisch hergestelltes genetisches Material verwendet werden kann. Mit Hilfe matrizenabhängiger Polymerasen wurden *in vitro* synthetisierte Nukleinsäuren erhalten, deren biologische Aktivität teilweise durch Infektivitätstests bewiesen werden konnte. Die chemische Synthese von DNA ist demgegenüber zwar umständlicher, erlaubt dafür die Herstellung jeder beliebigen Nukleotidsequenz. Man geht hierbei so vor, dass zunächst mit Hilfe organisch-chemischer Methodik einsträngige DNA-Segmente von 10–20 Nukleotiden Länge synthetisiert werden, welche sich dann auf enzymatischem Wege zu doppelsträngigen DNA-Stücken grösserer Länge (bisher maximal 77 Nukleotide) vereinigen lassen. Der Nachweis der biologischen Aktivität solcher *de novo* synthetisierter DNA ist in naher Zukunft zu erwarten.

Résumé

Par introduction d'information génétique additionnelle dans la forme de DNA, des changements génétiques définis peuvent être provoqués dans des microorganismes et même éventuellement dans des cellules humaines. Est-il possible d'utiliser du matériel génétique synthétique dans ce but ? En utilisant des polymérases dépendant de matrices, des acides nucléiques synthétiques peuvent être obtenus *in vitro*, et dans plusieurs cas leur activité biologique a été démontrée par des tests d'infektivité. La synthèse chimique de DNA est plus fastidieuse, cependant elle permet de réaliser n'importe quelle séquence d'acide nucléique. Le procédé consiste d'abord à synthétiser, par méthodes de chimie organique, des segments de DNA monocaténaire de 10–20 nucléotides. Ensuite ces segments sont liés enzymatiquement pour donner des molécules plus longues de DNA bicaténaire (jusqu' à présent 77 nucléotides). La preuve de l'activité biologique de telles chaînes de DNA synthétiques peut être attendue prochainement.

Riassunto

Grazie all'introduzione in microorganismi di informazioni genetiche supplementari sotto forma di DNA, si possono facilmente ottenere dei cambiamenti diretti del patrimonio genetico. Sembra pure che ciò non sia impossibile anche nel caso di cellule umane. In che misura si può, però, adoperare del materiale genetico prodotto sinteticamente per questi scopi ? Con l'aiuto di polimerasi template-dipendenti è stato possibile ottenere degli acidi nucleici sintetizzati *in vitro*, la cui attività biologica è stata in parte dimostrata da prove d'infettività. In paragone, la sintesi chimica del DNA è più complicata. In cambio però permette di produrre ogni sequenza nucleotidica desiderata. In tal caso si procede in modo che, grazie ai metodi di chimica organica, si sintetizzano dei segmenti di DNA composti da un solo filamento e della lunghezza di 10–20 nucleotidi. Questi poi possono essere riuniti enzimaticamente a formare dei segmenti di DNA a doppio filamento e più lunghi

(fino ad oggi al massimo 77 nucleotidi). In un prossimo futuro ci si può aspettare la dimostrazione dell'attività biologica di un tale DNA sintetizzato de novo.

Summary

By introducing additional genetic information in the form of DNA, defined genetic changes can be induced in microorganisms and maybe even in human cells. How far can synthetically prepared genetic materials be used for such purposes? Using template dependent polymerases, synthetic nucleic acids could be obtained in vitro, and in some cases their biological competence could be proven by infectivity assays. Chemical synthesis of DNA is considerably more time consuming; however it permits, in principle, the preparation of any nucleotide sequence required. The procedure consists of first synthesizing, by organic chemical methods, single stranded DNA segments of 10-20 nucleotides length. In a second step, these segments are linked together enzymatically to give double-stranded DNA pieces of greater length (up to 77 nucleotides). Reports on the biological activity of such de novo synthesized DNA are to be expected in the near future.

1. AVERY O. T., MACLEOD C. M. und MCCARTHY M.: *J. exp. Med.* 79, 137 (1944).
2. WATSON J. D. und CRICK F. H. C.: *Nature (Lond.)* 171, 737 (1953).
3. MERRIL C. R., GEIER M. R. und PETRICCIANI J. C.: *Nature (Lond.)* 233, 398 (1971).
4. SHAPIRO J., MACHATTE L., ERON L., IHLER G., IPTEN K., und BECKWITH J.: *Nature (Lond.)* 224, 768 (1969).
5. SPIEGELMAN S., HARUNA I., HOLLAND I. B., BEAUDREAU G., und MILLS D.: *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 54, 919 (1965).
6. GOULIAN M., KORNBERG A. und SINSHEIMER R. L.: *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 58, 232 (1967).
7. VERMA I. M., TEMPLE G. F., FAN H. und BALTIMORE D.: *Nature new Biol.* 235, 163 (1972).
8. KACIAN D. L., SPIEGELMAN S., BANK A., TERADA M., METAFORA S., DOW L. und MARKS P. A.: *Nature new Biol.* 235, 167 (1972).
9. ROSS J., AVIV H., SCOLNICK E. und LEDER P.: *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 69, 264 (1972).
10. HOLLEY R. W., APGAR J., EVERETT G. A., MADISON J. T., MARQUISEE M., MERRILL S. H., PENSWICK J. R. und ZAMIR A.: *Science* 147, 1462 (1965).
11. AGARWAL K. L., BÜCHI H., CARUTHERS M. H., GUPTA N., KHORANA H. G., KLEPPE K., KUMAR A., OHTSUKA E., RAJ BHANDARY U. L., VAN DE SANDE J. H., SGARAMELLA V., WEBER H., und YAMADA T.: *Nature (Lond.)* 227, 27 (1970).

Adresse des Autors: Dr. H. Weber, Institut für Molekularbiologie der Universität Zürich, Hönggerberg, CH-8049 Zürich.