



**Bir ferro akışkan tüpü ve bir mıknatıs ile oynamak sadece eğlenceli olmakla kalmaz, aynı zamanda bir gün bir hayat kurtarabilir.**

FREDERICK

*sanger*

İNOVATİF BİR KİMYACI

# Frederick Sanger

Merve Çalışır ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

Genellikle Fred ismiyle tanınan Frederick Sanger, yirminci yüzyılın en etkili bilim adamlarından biriydi. Kendini adanmış bir moleküler biyolog olan Sanger, tüm akademik yaşamını Cambridge'de proteinleri ve nükleik asitleri dizinlemek için yöntemler geliştirerek geçirdi. Nobel Kimya Ödülü'nü iki kez kazandı, ilki 1958'de protein dizinleyerek ve ardından 1980'de nükleik asitleri dizinleyerek. Bu ayrımı başaran tek bilim adamı odur. Çalışmasının etkisi çok büyüktü. 1950'lerde protein kimyası alanını açtı ve birçok protein ve enzimin dizisi, yapısı ve işlevi ile ilgili çalışmaları teşvik etti. 1977'de moleküler biyolojide devrim yaratan ve insan genomunun  $3 \times 10^9$  nükleotidini tamamen sıralamayı mümkün kılan dâhiyane bir DNA sıralama yöntemi geliştirdi. Dahası, genetik kodu doğruladı, genetik kodun mitokondride farklı olduğunu gösterdi ve örtüşen genleri keşfetti. Fred Sanger mütevazı, içine kapanık bir adamdı ama meslektaşları ve arkadaşları için her zaman geniş bir vizyona sahip olduğu biliniyordu. O bir öncü ve liderdi.

## ilk yılları

Fred'in büyükbabası William Albert Sanger (1840–83) bir ilaç kimyacısıydı. Büyükannesi Ann Mary'nin (née Hoff, 1837–1913) beş oğlu (John, William, Frederick, Edward ve Hubert) ve bir kızı (Mary) vardı. Fred'in babası Frederick (1876–1937), Cambridge St John's College, Cambridge'den (BA, 1897) Doğa Bilimleri bölümünden mezun olduktan sonra, Cambridge'de (MD, 1905) Profesör George Nuttall FRS altında 'Mediko-yasal yönünden ele alınan kan için biyolojik test' üzerine bir lisansüstü araştırma yaptı. Çok dindar bir adamdı ve Church Missionary Society sponsorluğunda tıbbi misyoner olarak Çin'e gitti. En kayda değer başarısı, Çin'de sadece Mandarin sınıfına değil, herkese açık bir okulun kurulmasıydı. Kardeşi Revd Hubert Sanger, Avustralya'ya giderken onu Çin'de ziyaret etti. Hubert'in kızı, Fred'in kuzeni, kan grubu şöhretine sahip Ruth Sanger FRS (1918–2001) idi. Çin'de 10 yıldan fazla bir süre sonra Birleşik Krallık'a dönen Frederick, 1916'da Cicely, née Crewdson

(1880–1938) ile evlenerek, Gloucestershire kırsalındaki Rendcomb'da yerel pratisyen hekim olarak çalıştı.

Fred'in annesi Cicely, zengin bir pamuk üreticisi olan Theodore Crewdson (1835–1923) ve Rachel Elizabeth, (kızlık soyadı Jowitt'in) (1841–80) kızıydı. Cicely, Theodore, John Wright, Lilian Dora, Helen Mary, Joseph Dilworth ve Cicely adlı altı çocuğun en küçüğüydü. Crewdson'lar esas olarak ticaretle uğraşıyordu. Fred, "babamın aksine, Cicely aile dışında pek az ilgi alanı olan sessiz oldukça utangaç bir insandı" dedi.

Frederick (Fred) Sanger, 1918'de Frederick ve Cicely Sanger'in ikinci oğlu olarak doğdu. Fred'in ağabeyi Theodore (Theo) (1917–2003) bir yıl önce doğdu ve küçük kız kardeşi Mary (Mayıs) beş yıl sonra doğdu. Fred ve Theo yaşları yakın küçük çocuklar olarak birlikte oynadılar. Büyük bahçenin ve Rendcomb'daki önemli "Eski Evlerinin" bahçesinin altındaki Churn Nehri'nin tadını çıkardılar.

Kıdemli Frederick Sanger, ailesi üzerinde iki ana etkiye sahipti. Birincisi, tıbbi çalışmalarını bilime olan ilgiyi uyandırması ve ikincisi, Crewdson ailesindeki Quaker geleneğinden etkilenen Cicely ile evlendikten sonra İngiltere Kilisesi'nden sadık bir Quaker'a dönüşmesi idi. İronik bir şekilde, Crewdson ailesinin kendisi Quakerizmi reddetmişti ve asla bir Quaker olamayan Cicely, İngiliz Kilisesi inancına sahipti. Böylece, Fred de dahil olmak üzere üç Sanger çocuğu, Quaker ilkelerine göre yetiştirildi, sabah ve akşam dualarını söyleyerek ve anneleri kiliseye gitmesine rağmen genellikle babalarıyla Quaker toplantılarına katılıyorlardı.

Fred'in ailesi, beş yaşındayken Birmingham yakınlarındaki Tanworth-in-Arden'deki 'Far Leys'e taşındı. O ve ağabeyinin eğitimi orada bir mürebbiye olan Helen Mary Shewall'un günlük ziyaretiyle başladı. Evde hem çocuklara hem de iki ya da üç yerel çocuğa eğitim veren hayat dolu, Quaker bir kadındı. Fred bu dönemden keyif aldı çünkü Bayan Shewall, kişisel olarak ona bolca ilgi gösteren nazik bir insandı. Theo, bilimde, özellikle doğa tarihinde ilginç Fred'de büyük bir etkiye sahipti. Fred şunları kaydetti 'Yaşlarımız yakın olduğu için

Theo ve ben çocukluğumuzun çoğunu birlikte geçirdik. O her zaman liderdi ve benden çok daha dışa dönük ve dinamikti. Ben her zaman biraz utangaç ve sessiz oldum." İki çocuk kafataslarını topladılar, kuş yuvalarını aradılar, ama yumurtaları çalmadılar, ve ilkbaharda, ebeveynlerinin sahip olduğu bir tarlanın yakındaki bir gölette semender ve kurbağa aradılar.

1927'de Fred, henüz dokuz yaşındayken, Worcestershire, Malvern yakınlarındaki Downs hazırlık okuluna (bağımsız bir Quaker okulu) girdi. Ufak ve oldukça utangaç bir çocuk olan Fred, ilk başta yatılı okulu travmatik buldu, ancak yavaş yavaş evden uzakta olmaya alıştı ve okuldaki kaçınılmaz küçük zorbalıklara adapte oldu. Çok çalıştı, sınıfının zirvesindeydi ve hem rugby hem de krikette okul takımında yer aldı, ancak

müzikte hiçbir yetenek göstermedi. Asla akortlu şarkı söyleyemezdi. Sanat ustası Maurice Feild tarafından yağlı boya resimle tanıştırdı. Annesinin 50. doğum günü için çok değer verdiği 50 resimlik bir kitap yaptı. Ancak Fred tatilleri okuldan daha çok sevdi. Fred 10 yaşındayken marangozluğa başladı ve küçük bir tahta parçasından bir kilise oydu ve ardından onu renklendirdi. Annesinin bunun oldukça orijinal olduğunu düşündü. Marangozluğu, Çin'deyken babasının bir meslektaşının oğlu olan Louis G. Byrde'den öğrenmişti. Ebeveynlerinin çocukları için bahçelerine "Pansymouse" adında bir kulübe yaptırdı. ("Pansy", Theo'nun takma adıydı, "fare" Fred'in takma adıydı.) Orada Theo'nun kafatası koleksiyonu, Fred de marangoz aletleri için tezgahı vardı ve daha sonra dövme ve kaynak aletleri için ayrı bir alan ayırdılar.

1932'den 1936'ya kadar Fred, Dorset'te yeni kurulan bağımsız bir devlet okulu olan Bryanston'a gitti. Bryanston, Downs hazırlık okuluyla bağlantıları olan ilerici bir okuldu. Okul müdürü T. F. Coad hatırı sayılır bir özgürlüğe izin verdi ve okul çalışması genellikle öğrencilere bir proje verildiği ve işi tamamlamak için ustalardan ve büyük çocuklardan yardım almaya teşvik edilen 'ödevler' olarak yapıldı. Bu "Dalton" sistemi Fred'e uygundur çünkü "size zorla bilgi vermek yerine kendinize bir şeyler bulmanız gerektiği anlamına gelir". Bilim iyi öğretildi. İki usta, Frazer Hoyland (Biyoloji) ve Geoffrey Ordish (Kimya), Fred üzerinde özel bir etkiye sahipti. Frazer Hoyland'ın, Fred de dahil olmak üzere öğrencilerin okuldan sonra laboratuvarında serbest olabileceği, slaytlar yapıp ışık mikroskobu altında onlara bakabilecekleri bir "Biyoloji Topluluğu" vardı. Bay Ordish, üniversitede boyar maddeler üzerine araştırma yapmış ve Fred'e bazı renkli kristaller yapmak için küçük bir proje vermişti. Fred şunları söyledi. "Laboratuvarında çalışmak benim için sadece oturmaktan ve kitap okumaktan çok daha harika bir değişiklikti. Bunun gerçekten zevk aldığım bir şey olduğuna karar verdim."

Fred, Okul Sertifika Sınavında (İngilizce, Almanca, ilköğretim matematik, ek matematik, fizik ve kimya, Latince ve biyoloji) yedi krediyi tamamladı ve olağanüstü bir başarı ile Cambridge, St John's College'a kabul edildi. Babası ve iki amcası John ve Hubert Sanger'e katılmış oldu.

Fred'in ailesi Fred'in Cambridge'de tıp okuyacağını umuyordu ama Fred, Bryanston'da okuldayken fikrini değiştirdi. Fred daha sonra şunları dedi:

*Başlangıçta babamın izinden gideceğimi ve doktor olacağımı sandım, ancak bunu ciddi bir şekilde düşünmeye Bryanston'daki son yıllarımda, Üniversitede ne yapacağımı karar vermem gerektiğinde başladım. Bir doktorun hayatının nasıl olduğunu görmüştüm ve ne kadar çok düşünürsem o kadar az sevdiğimi fark ettim. İnsanların ıstırabını dindirebilmeyi sevmiş olsam da, bana çok sıkıntılı bir iş gibi geldi, sürekli olarak bir sorundan diğerine koşturuyordum,*



***Fred kimyayı severdi  
ama fizik veya mate-  
matikten hoşlanmazdı.  
Bu nedenle, ilk yılın-  
dan sonra fiziği bırak-  
tı ve bunun yerine fiz-  
yolojiye başladı.***

*oysa ben tek bir soruna sahip olma fikrini tercih ettim.*

Bryanston'daki son döneminin ikinci yarısında (1936 yazı), Cambridge'e gitmeden önce Fred, Güney Almanya'da, daha sonra Gordonstoun'u kuran Kurt Hahn tarafından kurulan bir Alman okuluna, Schloss Salem'e değişim öğrencisi olarak gitti. Bu ziyarette, Bryanston'dan David Forbes adlı başka bir öğrenci ile birlikte, Fred Almanya'nın 'nazikleştirilmesini' ve gittiği okuldaki etkisini gözlemledi. Spor, özellikle hokey ve atletizm ve açık hava etkinlikleri, akademik çalışma kadar vurgulandı. Fred akademik olarak Almanca dışında yeni bir şey öğrenmedi. Bryanston'da spor zorunlu değildi. Fred başlangıçta Downs okulunda oynadığı hem rugby hem de kriketle devam etti, ancak daha sonra bu organize oyunları kaptan olduğu beşler ve squash için bıraktı.

Fred, Cambridge'deki ilk yılını akademik açıdan çok zorlu buldu ve ilk yıl sınavlarının yalnızca üçte birini geçti. Sorun, Fred'in okulda "Yüksek Sertifika" almamış olması ve fizik ve matematikte yeterli temele sahip olmamasıydı. Diğer bir faktör de Fred'in babasının 1937'de mide kanserini ortadan kaldırmak için yapılan bir operasyonda hayatını kaybetmesi ve annesinin de bir yıl sonra 1938'de kolon kanserinden aralarından ayrılmasıydı. Bu genç Fred'i biraz sa-

vunmasız bırakmış olabilirdi. Fred kimyayı severdi ama fizik veya matematikten hoşlanmazdı. Bu nedenle, ilk yılından sonra fiziği bıraktı ve bunun yerine fizyolojiye başladı. Ancak bu iki yıl içinde birinci aşamayı tamamlayamayacağı anlamına geliyordu. Lisans derecesini alması üç yılını aldı. Normalde Cambridge'i terk ederdi. Ancak, ebeveynlerinin mirasından 25.000 £ miras aldığı için parası sıkıntısı çekmiyordu. Kısım I biyokimya kursunu beğenmişti, bu yüzden biyokimyada bir Kısım II (ileri kurs) almak için dördüncü bir yıl kalmaya karar verdi. Fred özellikle Bölüm II uygulamalı derslerini ve aralarında morfogenez üzerine Joseph Needham (FRS 1941), sitokromlar üzerine David Keilin FRS ve enzimler üzerine Malcolm Dixon olduğu öğretim görevlilerinin coşkusunu beğendi.

İş dışında Fred, asıl ilgi alanı Quakerizm'e odaklanmıştı. Bundan çok etkilendi ama asla Dostlar Derneği'ne üye olmadı. Cambridge'deki toplantılarına katıldı, çeşitli sosyal faaliyetlerde bulundu ve arkadaşları arasında birçok Quaker vardı. Onaylanmış bir pasifist olarak "Barış Taahhüdü Birliği"ni imzalamıştı ve bilim adamlarının savaş karşıtı grubunun bir üyesiydi (Brownlee 2014). Bu o zamanlar popüler değildi, çünkü Almanya ile savaş çıkmıştı ve zorunlu askerlik getirilmişti. Fred, vicdani retçi olarak statüsünü doğrulamak için mahkemeye çıkmak zorunda kaldı, askerlik hizmetinden

koşulsuz muafiyet elde etti. Fred'in ilgi alanları onu, Cambridge, Newnham College'da ekonomi okuyan bir lisans öğrencisi olan Leicestershire'dan güzel bir esmer olan kız arkadaşı (Margaret) Joan Howe ile tanıştırdı. Fred ona bilim adamlarının savaş karşıtı grubu için "Yeniden silahlanmanın siyasi ve ekonomik etkileri" başlıklı bir rapor yazmasına yardım etti. Fred, Bölüm II biyokimyasını yaptığı yıl boyunca onunla çok zaman geçirdi. Bu süre zarfında Fred, vasisi J. D. Crewdson'dan (amcası Dilworth) üniversite öğretmenine bir mektupla desteklenen bir araba kullanma izni aldı. Bir araba aldı, 8 sterlin değerinde eski bir Jowett.

Fred ve Joan 28 Aralık 1940'ta Gloucestershire, Syde'de evlendiler. Joan, Alfred Howe (1889–1976) Sarah, née Watson 'ın en büyük kızıydı. Alfred Howe, bir ayakkabı fabrikasına sahip olan başarılı bir Leicester ayakkabı üreticisiydi. Ailesine karşı oldukça katı olmasına rağmen, kendi kendine yeten bir adamdı. Çocukları adına hırslıydı ve Joan muhtemelen Howe ailesinden üniversiteye giden ilk kişiydi. Gelecekteki damadından tam olarak emin değildi ve yeğenleri Christopher ve Michael Howe'ye göre, muhtemelen kızının, en azından lisans kariyerinin başlarında olmayan pasifist bir bilim adamından çok daha ortodoks biriyle evlenmesini bekliyorlardı. Alfred'in Fred'e, fikirlerini "onaylamadıkça" kızıyla evlenemeyeceğini söylediğini hatırlıyorlar.

Fred, 1940 yılında II. Bölüm biyokimya kursundan birinci sınıf bir derece alarak fikirlerini 'güçlendirdi'. Mezun olduktan sonra doktora okumayı planlamamıştı, ancak araştırma yapacak kadar iyi olduğunu düşünüyordu. İlk olarak Norman Wingate (Bill) Pirie ve ardından Albert Neuberger (1908–1940) tarafından denetlenerek (yalnızca bir ay süreyle) kendi kendini finanse ederek Cambridge Biyokimya Departmanı'na döndü. 'Hayvan vücudundaki amino asit lizinin metabolizması' konusunda çalıştı. Fred, karakteristik bir alçakgönüllülükle, doktorasını yüksek puanlamadı (Brownlee 2014), ancak çalışmalarının bir sonucu olarak, aralarında savaşın bir parçası olan 'Patatesin Azotu' konulu bir makale de dahil



olmak üzere beş makale yayınlandı. Fred'in doktora jürileri Albert Chibnall FRS (1894–1988) ve Charles Harington FRS (1897–1972), sunumundan ve yazım hatalarından etkilenmemiş olsalar da bilimi konusunda hevesliyidiler. Ancak tezini düzelttikten sonra doktora derecesi aldı (1944).

## *insülin dizisi*

Yeni Biyokimya Profesörü Albert Chibnall, Neuberger'in gözetiminde doktorasını tamamladıktan sonra, Fred'i insülin çalışması için ikna etti. Fred'in gerçekten başka seçeneği yoktu. Bir işe ve yeni bir bilimsel probleme ihtiyacı vardı, çünkü Neuberger, Londra'daki Ulusal Tıbbi Araştırma Enstitüsü için Cambridge'den ayrılmıştı. Chibnall daha önce insülinle çalışmış ve fazla "serbest"  $\alpha$ -amino asit içerdiğini keşfetmişti, bu da insülinin oldukça kısa zincirlere sahip olduğunu gösteriyordu. Amino (N) terminalindeki fenilalanin amino asidi dışında, insülinin veya aslında başka herhangi bir proteinin (ipek fibroinden bazı kısa peptidler dışında) protein dizisi hakkında hiçbir şey bilmiyordu (Jensen & Evans 1935). Fred, insülinin N-terminal amino asitlerini incelemek için Sanger reaktif

olan florodinitrobenzeni (FDNB) tanıttı. Bu reaktif, amino gruplarını modifiye etmek ve bir dinitrofenil (DNP-) amino asit vermek için oda sıcaklığında insülin ile hızla reaksiyona girdi. Modifiye edilmiş amino asit, asit hidrolizi ile türetilmiş insülinde serbest bırakılarak, N-terminal amino asidin sarı dinitro türevlerinin yanı sıra lizinin -amino grubunun ve tirozinin hidroksil grubunun türevlerini oluşturabilir. Fred, insülindeki DNP-amino asitlerini tanımlamak için yeni açıklanan bölme kromatografisi yöntemini (Gordon ve diğerleri, 1943) kullandı. 1945'teki klasik bir makaleden, insülinin N ucunda hem fenilalanin hem de glisin olduğunu buldu ve bu, onun en az iki polipeptit zinciri olduğunu gösterdi. Bunu yapmak için, bu iki DNP-amino asidin hareketliliklerini, sentezlediği 18 farklı işaretleyici DNP-amino asit ile bölme kromatografisi üzerindeki çeşitli çözücü sistemlerinde karşılaştırmak zorundaydı.

Fred başlangıçta insülin son grup analizi için FDNB kullanmaya karar vermemişti. Daha önce FDNB kullanmaya karar vermeden önce metan sülfonil klorür ve klorodinitrobenzen ile çalışmıştı. Fred, floro türevi kloro türevinden daha reaktif olduğu için FDNB kullanmaya karar verdi. Bu ilk başarıya rağmen, Fred henüz insülin dizinle-

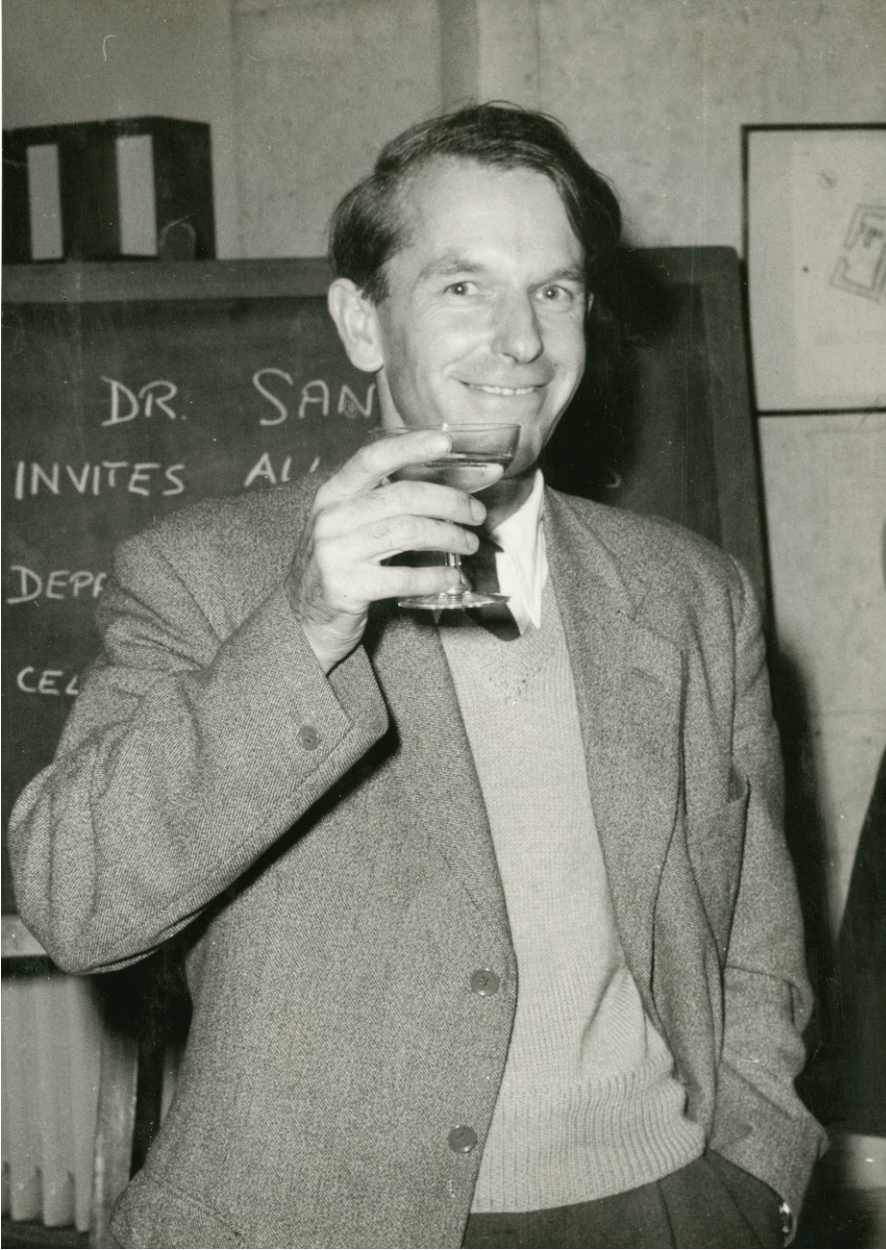
mesi yapmaya karar vermemişti. Bununla birlikte, DNP ile etiketlendikten sonra insülinin asit hidrolizi koşullarını değiştirdiği deneylerde (asit içindeki DNP-glisinin kararsızlığından dolayı), kısmi asit hidroliz ürünlerinin bölüm kromatografisinde tespit edildiğini fark etmişti. Bu arada Fred, disülfid bağlarını performik asitle kırmak için insülini oksitleme yöntemini geliştirmişti. Daha sonra iki insülin zincirini - glisil (Gly) ve fenilalanil (Phe) zincirlerini ayırdı, ancak o sırada moleküler kütlesi fazla tahmin edildiği için dört zincir olduğunu düşündü. Kısmi asit hidrolizini kullanarak Fred, insülinin Phe zincirindeki ilk dört amino asidin sırasını Phe-Val-Asp-Glu olarak ve Gly zincirindeki beş amino asidin Gly-Ile-Val-Glu-Glu olarak da çıkardı ve aynı zamanda Phe zincirinden Thr-Pro-Lys-Ala'nın dahili bir tetrapeptid dizisi olarak. Değiştirilmemiş amino asitleri tanımlamak için yeni açıklanan kağıt kromatografi yönteminden yararlandı. Daha sonra Fred'in kendisi, 1949 tarihli makalesinin, daha iyi alıntı yapılan 1945 tarihli makalesinden daha önemli olduğunu düşündü, çünkü bir amino asit dizisini bir protein zincirinin bir ucuna bitişik olarak doğru bir şekilde konumlandırılan ilk makale buydu. Artık proteinlerde amino asit dizilerini tanımlamanın mümkün olduğu açıktı, bu nedenle, bazılarının daha



önce iddia ettiği gibi, proteinlerin, amino asit dizilerinin istatistiksel karışımları olması olası değildi.

1949 yılı Fred için bir dönüm noktasıydı çünkü şimdi insülin sıralamasına karar vermişti. Daha sonra, "Muhtemelen bir proteindeki amino asit dizisinin tamamının çok da uzak olmayan bir gelecekte açıklığa kavuşması olasıdır." dedi. Fred şüphesiz bunu yazarken insülin üzerine kendi çalışmasını düşünüyordu çünkü açıkça Beit Üyesi olarak araştırmasını destekleyen Beit Mütevelli Heyetine verdiği 1949-50 tarihli raporunda, bunların tam peptid dizisini belirlemenin mümkün olabileceğini düşündüğünü belirtti. Bu karar verildikten sonra, Biochemical Journal'da yayınlanan son derece ayrıntılı dört klasik makale geldi. İlk olarak daha uzun, 30 kalıntı uzunluğundaki B zincirinin (Phe zinciri) dizisini, ziyaretçi British Council destekli Viyana bilim adamı Hans Tuppy ile çalıştı. Ardından, daha kısa, 21 kalıntı uzunluğundaki A zincirini (Gly

***Başlangıçta babamın izinden gideceğimi ve doktor olacağımı sandım, ancak bunu ciddi bir şekilde düşünmeye Bryanston'daki son yıllarımda, Üniversitede ne yapacağıma karar vermem gerektiğinde başladım. Bir doktorun hayatının nasıl olduğunu görmüştüm ve ne kadar çok düşünürsem o kadar az sevdiğimi fark ettim. İnsanların ıstırabını dindirebilmeyi sevmiş olsam da, bana çok sıkıntılı bir iş gibi geldi, sürekli olarak bir sorundan diğerine koşturuyordu, oysa ben tek bir soruna sahip olma fikrini tercih ettim.***



zinciri) Sidney, Avustralya'dan bir doktora öğrencisi olan Ted Thomson ile sıraladı. Bu, Fred'in insülin konusundaki çalışmasında ilk defa yardım aldığı zamandı. Önceki tüm insülin çalışmalarında işin tamamen kendisi tarafından yapıldığını bildirdi. Esasen yaklaşım hem A hem de B zincirleriyle aynıydı, ancak daha uzun B zincirinin sıralanması daha kısa A zincirinden daha kolaydı. Fred'in insülini sıralamak için kullandığı yaklaşıma bir örnek olarak, Fred'in B zinciri ile ilgili sonuçlarını ele alalım. İlk olarak, zinciri sadece kısmi asit ürünlerinin analizinin sonucundan sıralamayı denedi, 23 dipeptid, 15 tripeptid, 8 tetrapeptid, 2

pentapeptid ve 1 heksapeptid izole edilmiş ve ayrı ayrı dizilenmiştir. Birbirleriyle "örtüştüğünde" ve bu zincirdeki amino asitlerin genel bileşimini bildiğinde, Fred 30 kalıntılı uzun zincirin 27 kalıntısını kapsayan örtüşmeyen beş peptidi çıkarabildi. Kısmen daha polar peptitlerin saflaştırma problemlerinden ve kısmen de serin ve treonin kalıntılarına bitişik peptit bağlarının kararsızlığının bir sonucu olarak, kısmi asit hidrolizinin sonuçlarından B zincirinin tamamen sekanslanmasının imkansız olduğu kanıtlandı. Bu çalışmadaki temel sorun, kısmi asit hidrolizi ile elde edilen büyük ve karmaşık peptit karışımının saf-

laştırılmasıydı, bu nedenle bu çalışma için saflaştırılmış B zinciri ve çeşitli tekniklerle peptitlerin ön grup ayrılması gerekiyordu. İyon değişim kromatografisi, odun kömürü üzerinde adsorpsiyon ve iyonoforesis, iki boyutlu kağıt kromatografisi üzerinde fraksiyonlama ile saflaştırmadan önce karmaşık karışımları basitleştirdi.

B-zinciri dizisini tamamlamak için Fred, daha spesifik bölünmeler elde etmek için tripsin, kimotripsin ve pepsin ile enzimatik hidroliz kullanmak zorunda kaldı. Daha önce bu proteolitik enzimleri kullanmakta isteksizdi, çünkü proteazların sentetik ve proteolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmişti. Ancak Fred'in çalışmasında sentetik bir aktivite tespit edilmedi. İronik olarak, daha sonra proteolitik enzimlerin değil, kısmi asit hidrolizinin artefaktlara yol açabileceğini kanıtlayacaktı. Beklediği gibi, enzimatik hidroliz ile kısmi asit hidrolizatlarından çok daha basit peptit karışımları elde edildi, ancak Fred artık iki boyutlu kağıt kromatografisinde ayırma ve saflaştırma işleminin önce iyonoforezi (peptitleri asit, nötr ve bazik peptit karışımlarına ayıran) kullandı. Kısmi asit hidrolizinden elde edilen önceki sonuçların bilgisi ile birleştirilen bu peptitlerin analizi, B zincirinin 30 kalıntısının çıkarılmasına izin verdi. Bir proteinin sekansı çözülmüştü, ancak hala tam değildi.

Geriye amid problemi kaldı, glutamik (Glu) veya aspartik (Asp) kalıntılarının gerçekte glutamin (Gln) veya asparajin (Asn) olup olmadığı sorunu. Çünkü glutamin veya asparajin içindeki amid bağları asitle hidrolize oldu. Fred, bu sorunu çözmek için daha fazla peptit izole etmek için iki enzim daha, papain ve bir küf proteazı kullanmak zorunda kaldı. Enzimatik sindirimden türetilen peptitler, genel olarak, kısmi asit hidrolizinden elde edilenlerin aksine, amitleri tuttu, bu nedenle, farklı pH değerlerinde iyonoforesis üzerindeki hareketlilikleri, genellikle amid içeriklerinden birini bilgilendirecekti. B zinciri küçük bir soruna neden oldu, ancak A zincirinin 4. konumunu ayırmak, farklı peptitlerle çelişen sonuçlar nedeniyle dizi çalışmasının özellikle sinir bozucu bir parçasıydı. Sorun son olarak,





dizinin doğru olduğundan emin olmadan önce, belirli bir 13 kalıntı papain peptidindeki amid içeriğinin 17 farklı tahminini yapan Ted Thomson tarafından çözüldü.

Üç disülfür bağının düzenine karar vermedeki son sorun da aynı derecede sinir bozucuydu. Buradaki fikir, peptitleri doğal insülinin kısmi asit hidrolizi ile izole etmek, ardından S-S bağını kırmak ve iki yarıyı izole etmek için performik asit ile muamele etmek ve böylece hangi sistein çiftlerinin bağlı olduğunu belirlemektir. Bununla birlikte, bu teori başlangıçta bozuldu çünkü peptitler, "disülfür değişim reaksiyonlarının" bir sonucu olarak asit hidrolizi sırasında karıştırıldı. İki ayrı mekanizma vardı, ancak Fred reaksiyona SH (tiyol) reaktifleri ekleyerek bu karıştırmayı nasıl önleyeceğini buldu. Öyle bile olsa, A zincirinde belirli bir disülfid köprüsü kurmak çok zordu çünkü iki sistein kalıntısı bitişikti.

Nihai çözüm Fred ve meslektaşları Hans Tuppy, Ted Thompson, A. P. Ryle, Ruth Kitai ve Les Smith tarafından 11 yılda çözüldü. Ancak bir proteinin ilk dizisini tarif etmeye değdi. Bilimsel topluluk bu güç turuna hayran kaldı. Fred, çalışmasında, bölme kromatografisinin ve ardından kağıt kromatografisinin geliştirilmesi için Martin'e büyük bir kredi verdi ve bu tekniklerin insülin

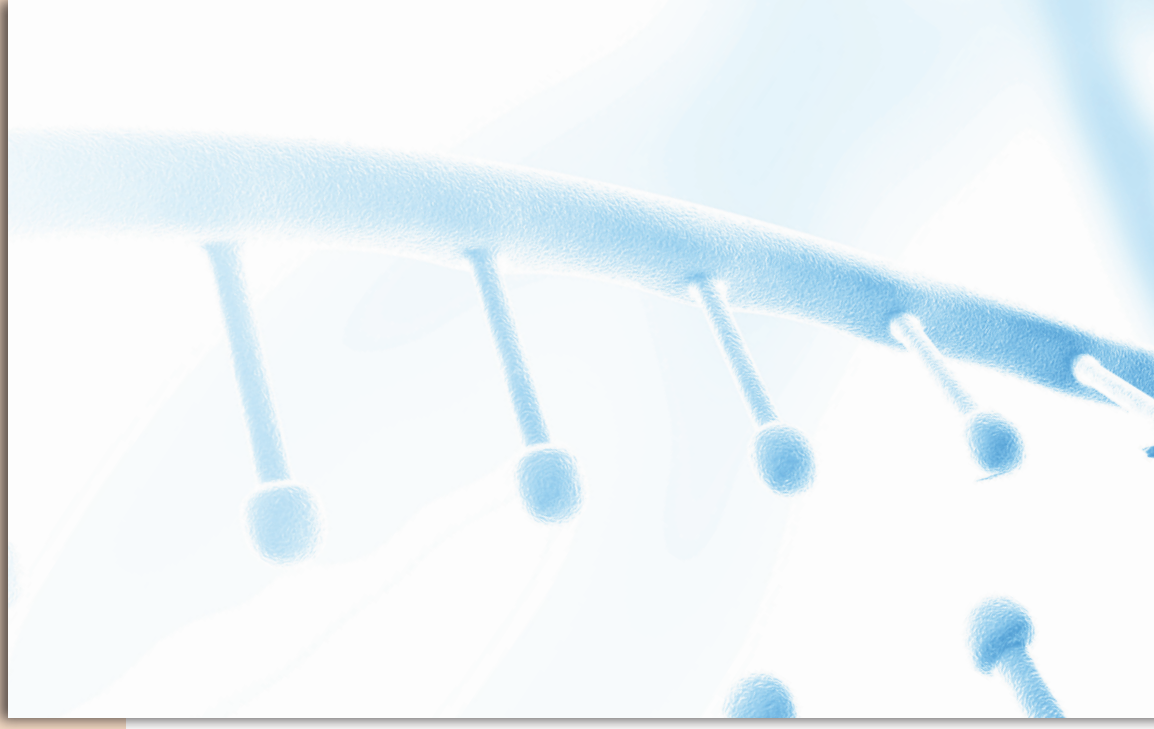
üzerindeki çalışmaları için ne kadar önemli olduğunu kabul etti. Yine de Martin'in grubu, Fred'inki kadar iddialı bir analiz yapmadı. İnsülini dizilemekten çok daha basit bir problem olan siklik pentapeptid gramisidin S dizisini belirlemişlerdi. Fred'in yaklaşımını karakterize eden ve nihayetinde başarısına yol açan, projeyi tamamlamak için ettiği ısrar, odaklanma ve inatçı kararlılıktı. Fred, Stretton'un (2002) vurguladığı gibi, insülin dizisini çözmek için birçok engelin üstesinden gelmek ve literatürdeki teknikleri geliştirmek ve uyarlamak zorunda kaldı.

İnsülinin tanımlanmış ve benzersiz bir amino asit dizisine sahip olması nedeniyle, bu amino asitlerin insülin içindeki düzenini tanımlayan veya diğer proteinlerde genel bir ilkenin olmadığını gösterdi. Bu, proteinlerin genel olarak düzenli tekrar eden dizilere sahip olabileceği veya tanımlanmamış bir şekilde heterojen olabileceği şeklindeki önceki hipotezlere karşılık verdi. Daha da önemlisi, 1950'lerin başlarında mRNA ve tRNA bilinmemesine rağmen, belirli bir protein sentezi mekanizması olması gerektiğini kanıtladı. Sonuç olarak, proteinlerin bu amino asit dizisini belirtmek için bir genetik kodun var olması gerekir. Nobel komitesi, 1958'de Fred'e Nobel Kimya Ödülü'nü vermesi uzun sürmedi. Fred'in çalış-

ması, ribonükleaz, kimotripsin, miyogloblin ve hemoglobinin  $\alpha$  ve  $\beta$  globin zincirleri gibi diğer proteinleri sıralamak için başkaları tarafından yapılan sayısız çalışmayı teşvik etti. Asit hidroliz prosedürü, karışımların karmaşıklığından dolayı bu daha uzun proteinler için uygun değildi.

## *radyo-etiketli protein dizisi*

1954'te insülin dizilimini tamamladıktan sonra Fred, yapısını işlevle ilişkilendirmek istedi, ancak bu yönde sadece sınırlı ilerleme kaydetti. Bununla birlikte, ilgili insülinlerin karşılaştırmalı sıralaması fikrini ortaya attı. Ieuan Harris, H. Brown, Ruth Kitai ve Mike Naughton ile birlikte domuz, koyun, at ve balina insülinlerinin sığır insülininden farklı olduğunu, böylece açıkça işlevi etkilemeden değişebilen amino asit kalıntılarını tanımladığını gösterdi. Bu, farklı türlerdeki homolog amino asit kalıntılarını tanımlamak için karşılaştırmalı dizilemenin ilk örneğidir ve proteinlerdeki hangi amino asit kalıntılarının işlev açısından önemli olduğunu değerlendirmek için hala yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ama başka bir fikri daha vardı. Protein di-

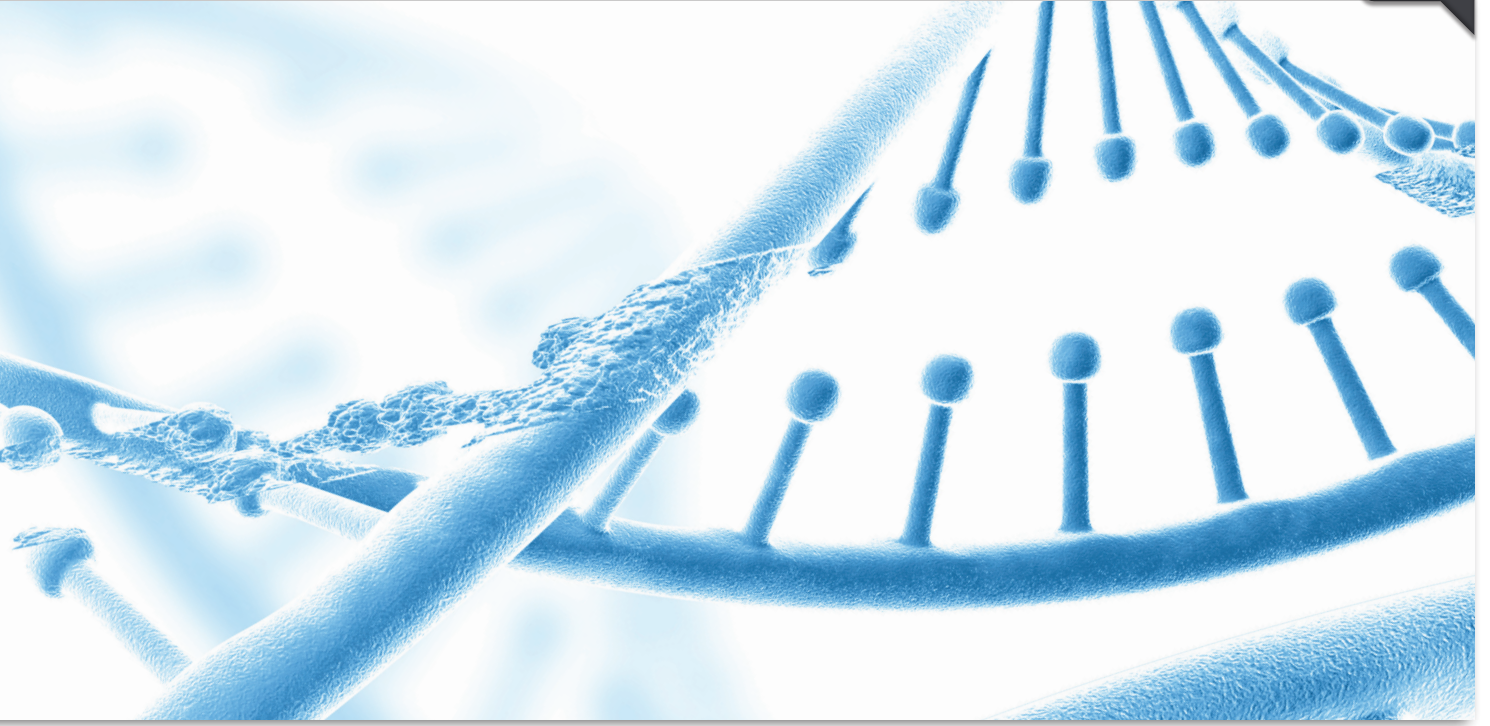


***Radyoaktif yöntemlerle tam olarak dizinlenecek ilk kısa RNA, Escherichia coli'den 120 nükleotid 5S ribozomal RNA idi.***

zilemesinin zahmetli prosedürlerini radyoaktif izotoplar kullanarak basitleştirme fikrini keşfetmek istiyordu. Örneğin, radyoaktif 32P-fosfatı tavuk ovalbümüne kattı. Dipeptid, SerP-Ala, diğer radyoaktif olmayan peptidlerden saflaştırılmadan, basitçe iyonofrez ve kromatografi üzerindeki özelliklerinden tanımlandı. Daha da önemlisi, Brian Hartley (FRS 1971), Denis Shaw ve Mike Naughton ile, elastaz, tripsin ve kimotripsin gibi enzimlerin aktif merkezini 32P etiketli diizopropilflorofosfat ile etiketledi ve üç proteazın da aynı tetrapeptide sahip olduğunu gösterdi. César Milstein (FRS 1975) ile, aktif merkez serin kalıntısını radyo-etiketledikten sonra başka bir enzim olan fosfoglukomutazın aktif merkezi etrafında kısa bir pentapeptid dizisi olan Thr-Ala-SerP-His-Asp (veya Asn)i karakterize etti. Bu yaklaşım ne kadar zekice olsa da, proteinlerin radyoaktif dizilişinin sınırları vardı, çünkü uğraşılması gereken 20 farklı amino asit bulunuyordu. Nükleik asitler bu açıdan proteinlerden daha basitti. Genel olarak, bir sıralamada sıralanacak sadece dört farklı baz vardı.

***RNA dizinleme***

Fred, Cambridge Üniversitesi Biyokimya Bölümünden 1962'de Cambridge'in eteklerinde yeni inşa edilen Tıbbi Araştırma Konseyi (MRC) Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'na taşındı. Orada, Biyokimya Bölümünden daha kalabalık bir gruba ulaşmak için daha fazla alanda çalışmaya başladı. Etiketli proteinleri dizileme konusundaki önceki fikirlerinden etkilenen, 32P etiketli nükleik asitleri dizilemenin yeni konseptini tanıtan nükleik asitler üzerine çalıştı. Hiçbir kısa DNA bilinmiyordu ve o zaman bilinen tek erişilebilir küçük RNA'lar transfer RNA'larıydı Fred, Bart Barrell (asistanı) ile birlikte, sükröz gradyanlarında saflaştırılabilen, yüksek moleküler kütleli, 32P etiketli 16S ve 23S ribozomal RNA'yı "parmak izi" olarak işe başladı. T1 ribonükleaz (RNaz), guanine özü bir ribonükleazdı ve iki boyutlu modifiye edilmiş bir kağıt sistemi üzerinde yüksek çözünürlüklü parmak izleri verdi. Bu, keskin noktalar veren mükemmel bir parçalama sistemiydi ve RNA üzerine sonraki tüm çalışmaların temelini oluşturdu.



Ribozomal RNA'ların ilk parmak izleri, örneğin ACG gibi trinükleotidlerin izomerlerini CAG'den ve CUG'yi UCG'den ayırarak dikate değer bir çözünürlükte gösterdi. Bu trinükleotid dizileri, hareketliliklerinin bilinen, etiketlenmemiş model trinükleotidlerle karşılaştırılmasıyla tanımlanmamıştır; daha ziyade, ilk ilkelere göre sıralanmıştır. İkinci boyutta kullanılan iyon değişim kağıdından ayrıştırıldılar ve sekansları, diğer nükleazlarla bozunma yoluyla veya bileşen mononükleotitlerini türetmek için alkalin hidroliziyle elde edilen daha küçük ürünlerin izolasyonundan çıkarıldı. 32P etiketi, kurucu mononükleotitleri ve bunların dizideki konumlarını tanımlamak için etiket görevi gördü. Daha uzun oligonükleotitleri sıralamak için Fred, eksonükleazlarla kısmi sindirim kullandı ve ara bozunma ürünlerini DEAE-selüloz kağıt üzerinde tek boyutta iyonofrez ile analiz etti. Bu yeni ve güçlü bir sıralama yöntemiymi çünkü hareketlilik kaymaları (veya "M değerleri") hangi kalıntının mevcut olduğunu gösterdi. Bu nedenle Fred, RNA'yı sıralamak için konum bilgilerini kullanıyordu, aslında bunu daha önce radyoaktif proteinleri sıralamak için de yapmıştı.

Radyoaktif yöntemlerle tam olarak dizinlenecek ilk kısa RNA, *Escherichia coli*'den 120 nükleotid 5S ribozomal RNA idi. Özellikle daha uzun T1 RNase ürünleri olmak üzere

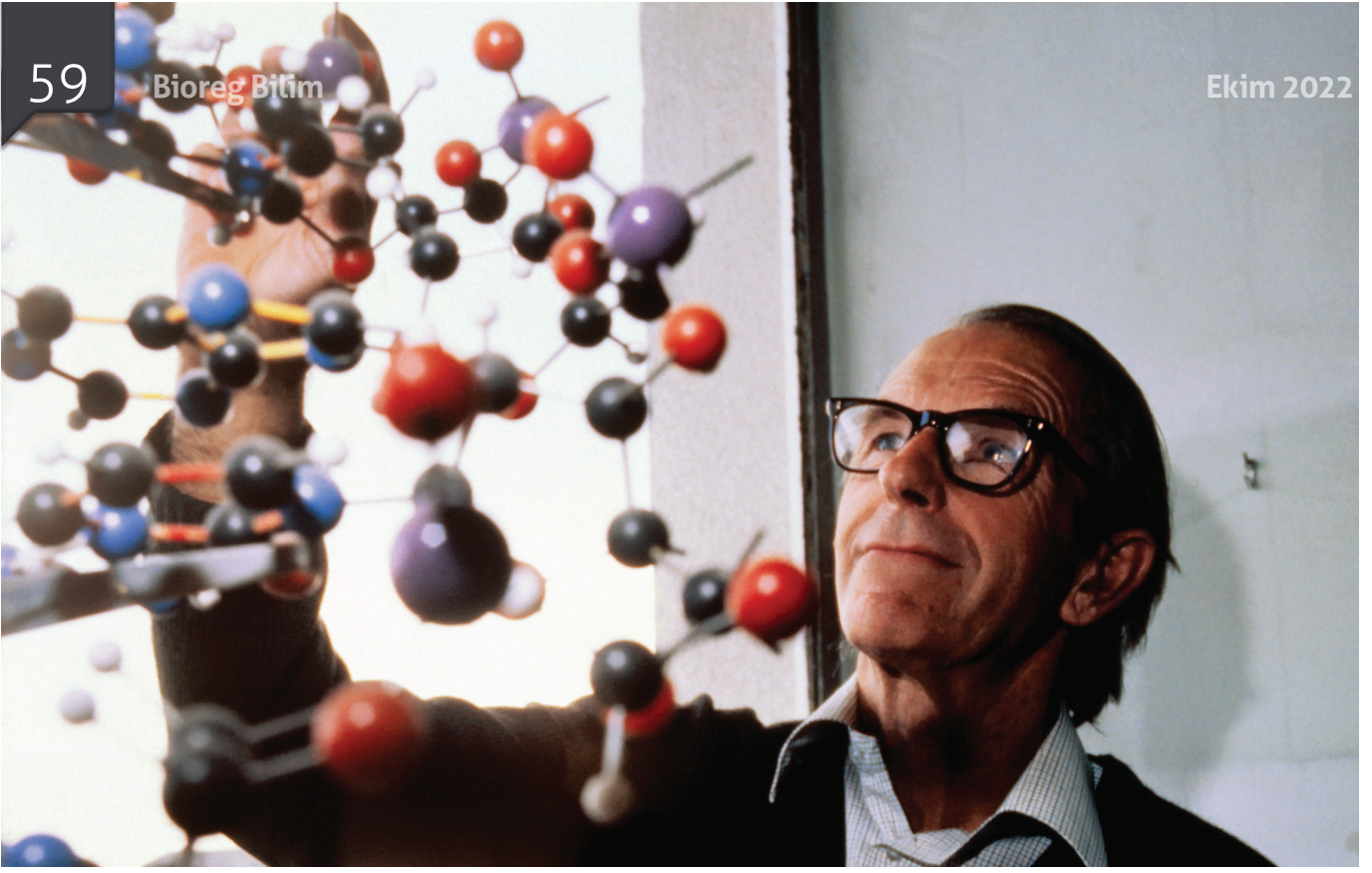
radyoaktif sekanslama yöntemlerini geliştirmek ve tam bir sekansın çıkarımı için yeterince uzun olan T1 RNase ile daha da uzun kısmi sindirim ürünlerini izole etmenin yollarını bulmak için iyi bir model RNA olduğunu kanıtladı. RNA'yı sıralamak için kullanılan yöntemler, insülini sıralamak için kullanılanlarla esasen aynıydı. Daha kısa bozunma ürünlerinden başlayarak, daha küçük parçaların "üst üste binmesi" ile benzersiz bir dizi mantıksal olarak çıkarılabilene kadar daha uzun ve daha uzun parçalar izole edildi ve dizildi. Bu dizileri çözmek için, kısmi sindirimin daha uzun ürünlerini T1 RNase ile ayırmak için geliştirilmiş fraksiyonasyon prosedürlerinin tasarlanması gerekiyordu. Homokromatografi - DEAE-selüloz kağıt üzerinde yüksek konsantrasyonlarda bozulmuş RNA kullanan bir tür yer değiştirme kromatografisi, ikinci boyutta iyonofrez yerine kullanılmıştır. Bu daha sonra ikinci boyutta 60 OC'de karışık ince selüloz ve DEAE-selüloz tabakaları üzerinde homokromatografi yapılarak geliştirildi. Yaklaşık 50 nükleotid uzunluğuna kadar oligonükleotidler artık izole edilebilir ve dizinlenebilir.

Fred, bir kez daha, aminoasile özgü bireysel tRNA'ları saflaştırmak için yöntemler geliştirildikten sonra sıralı tRNA yaptı. Bob Holley tarafından klasik yöntemler kullanılarak yönetilen bir tRNA'yı sıralayan ilk

kişi o değildi. Fred'in kendisi radyoaktif sıralama metodolojisini kullanmakla daha çok ilgilendi. Bart Barrell ile *E. coli*'nin fenilalanin tRNA'sını saflaştırdı ve sıraladı. tRNA'nın sekanslanması 5S RNA'dan daha kolaydı, daha kısaydı ve küçük bazlar üst üste binmeye yardımcı oldu.

Diğer birçok tRNA, ziyaretçi doktora sonrası araştırmacıları (Kjeld Marcker ve Moshe Yaniv), doktora öğrencileri (Shyam Dube ve Howard Chadwell) veya John Smith grubundaki daha geniş Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (FRS 1976) tarafından sıralandı. Erken dizilenmiş tRNA'lar arasında metiyonin tRNA (Cory ve diğerleri 1968), formilmetiyonin tRNA (Dube & Marcker 1969), valin tRNA (Yaniv & Barrell 1969) ve tirozin ve tirozin baskılayıcı tRNA bulunmaktadır. Fred'in parmak izi yöntemini kullanan diğer önemli keşifler, tirozin tRNA öncüllerinin izolasyonundan (Altman 1971) ve bakteriyofaj R17 RNA'da (Steitz 1969) ribozom bağlama dizilerinin çalışmasından ortaya çıktı.

5S RNA ve tRNA'dan sonra Fred, yaklaşık 3000 nükleotid uzunluğunda olan bakteriyofaj R17 RNA gibi RNA içeren bakteriyofajlarda bulunan daha uzun RNA'ları sıralamanın zorluğunu üstlendi. Başlangıçta, Fred'in laboratuvarında çalışan Dahlberg, ustaca bir diyagonal teknik kullanarak 32P-etiket-



li bakteriyofaj f2 RNA'nın 3 ucundan 10 nükleotidlik bir T1 RNaz son ürününü sıralamayı başardı (Dahlberg 1968). Şaşırtıcı bir şekilde, radyo-etiketli faj R17 RNA'nın kısmi T1 RNaz sindirimleri, poliakrilamid jel elektroforezinde ayrı bantlar verdi. Başta Jerry Adams ve Peter Jeppesen olmak üzere birkaç grup sıralandı. İlk analiz edilenin, fajın kılıf protein dizisinin bilinen bir amino asit dizisini kodlayan bir RNA bölgesi olduğu ortaya çıktı. Bu 57 nükleotid uzunluğundaydı ve ilk kez mRNA'nın herhangi bir sekansının doğrudan sekanslanmasıydı. Bu sürpriz olmadı. 1960'ların ortalarında dolaylı yöntemlerle oluşturulan genetik kod doğrulandı, ancak Fred bu çabanın değerli olduğunu düşünüyordu (Brownlee 2014). Ancak Fred, bakteriyofaj R17 RNA dizisini tamamlamadı. Bu, ilgili MS2 bakteriyofaj RNA'sı için Walter Fiers'in grubu tarafından yapıldı, çünkü 1960'ların sonlarında Fred, dikkatini DNA'ya çevirmişti.

## ***DNA dizilimi***

### **İlk yaklaşımlar**

1970'lerin başlarında DNA'nın sıralanmasıyla ilgili sorun, DNA'nın dizinlemede bulunmak için çok uzun olmasıyla ilgili bariz sınırlamaydı. RNA'daki durumun aksine, sıralama yöntemlerinin test edilebileceği hiçbir kısa DNA yoktu. Dahası, yüksek düzeyde spesifik DNazlar mevcut değildi, kısıtlama enzimleri henüz keşfedilmemişti. Bilinen en küçük DNA bakteriyofajları (f1, fd ve  $\Phi$ X174) yaklaşık 5000 nükleotid uzunluğundaydı. Bu sınırlamalara rağmen, çok daha önce, Fred DNA ile ilgilenmeden önce, Burton ve Petersen (1960), çeşitli kısa pirimidin içeren oligonükleotitleri izole etmek ve sıralamak için bir kimyasal bozunma yöntemini, "tahliye etme" reaksiyonunu mükemmelleştirdi. Bir süre sonra, Fred'in laboratuvarında çalışan Murray ve Offord (1966), enzimatik sindirimle türetilen kısa etiketli DNA oligonükleotitlerini de saflaştırdı ve karakterize

etti. RNA'nın sıralanması için geliştirilen iki boyutlu ayırma yöntemlerini kullandılar.

1970'lerin başlarında, birkaç doktora sonrası araştırmacı ve doktora öğrencisi, Fred'in laboratuvarında DNA dizilimini başlatmaya çalışıyordu. John Sedat, Ed Ziff ve Francis Galibert, boyutuna rağmen  $\Phi$ X174 faj DNA bölgelerini sıralamak için daha önce RNA ile kullanılan sıralama yöntemlerini değiştirerek işbirliği yaptılar. İddialı bir deneyde, onu  $^{32}$ P-fosfat ile eşit şekilde etiketlediler ve ardından  $^{32}$ P-etiketli  $\Phi$ X174 DNA'yı enzimlerle sindirdiler. Endonükleaz IV, dikkatle tanımlanmış koşullar altında, poliakrilamid jel fraksiyonasyonu üzerinde şaşırtıcı derecede iyi sonuçlar verdi ve 48 nükleotidlik bir DNA dizisi oluşturuldu.

Bir başka önemli girişimci ise Vic Ling'di (Ling 1972). Maria Székely'nin Fred'in laboratuvarındaki önceki çalışmasına dayanan Vic Ling, T4 polinükleotid kinaz kullanarak 5' uçlarını  $^{32}$ P ile sonradan etiketleyerek bakteriyofaj fd DNA'sının bazı ürünlerini sıraladı. Özellikle, dizisini belirlemek için

## ***DNA şablonununun kısa bir bölümünü örnekleyerek uzun bir DNA üzerinde çalışabilirdi. Bu, o zamanlar cesur bir karardı ve tek boyutlu sıralamanın yolunu açtı.***

iki boyutlu bir 'gezinme noktası' yöntemi kullanarak 20 nükleotidlik bir ürün tanımladı. Bu yöntemde dizi, bir kısmı 3p-eksonükleaz sindiriminin ardışık bozunma ürünlerinin nispi pozisyonlarından çıkarıldı. Bu nedenle bu makale, sekans oluşturmak için konum bilgilerinden kapsamlı bir şekilde yararlandı.

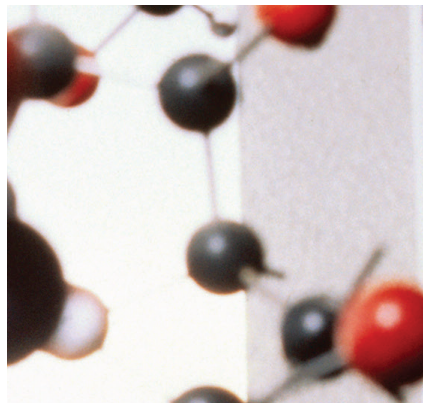
Yine bir başka yaklaşımda Elizabeth Blackburn (FRS 1992) (Blackburn 1975), RNA polimeraz ile  $\Phi$ X174 DNA'nın şu anda bilinen 48 nükleotid fragmanını kopyaladı ve 32P etiketini, transkripsiyon reaksiyonunda etiketli bir nükleosit trifosfat olarak tanıttı. Açıkçası, 1970'lerin başında Fred'in laboratuvarında DNA dizilemesine yönelik birkaç farklı yaklaşım devam ediyordu. Yine de Fred, laboratuvarındaki tüm bu erken DNA sekanslarının yazarı değildi çünkü bu çalışmaya önemli bir katkı yapmadığını düşünüyordu.

Bunun yerine, Fred'in kendisi, DNA'nın DNA polimerazlarla kopyalanmasına dayanan farklı bir sıralama yaklaşımıyla ilgilenme-

ye başladı. Wu ve Kaiser (1968), çok daha uzun başka bir DNA'nın 12 nükleotidlik kısa yapışkan uçlarını, faj'ı dizilemeye yardımcı olarak DNA polimeraz ile kopyaladılar. Fred, yaklaşımlarını genelleştirmek istedi ve bakteriyofaj f1'in tek sarmallı DNA'sını DNA polimeraz ile kopyalamayı seçti. Ancak, DNA sentezini başlatmak için tek sarmallı şablon f1 DNA ile melezlenmek için bir primere (kısa bir DNA oligonükleotid) ihtiyacı vardı. F1'in kat proteinindeki sözde bilinen diziyeye (Met-Try-Val) dayanarak, Fred benzersiz bir oktanükleotid primer tasarladı ve D. Fischer ve H. Kössel ile onu sentezlemek için işbirliği yaptı. Bir yıl sonra (sentezlenmesi bu kadar uzun sürdü), Fred bu oktanükleotidi denedi ve transkripte 32P etiketli bir nükleosit trifosfat, genellikle 32P-dATP, diğer üç etiketlenmemiş trifosfat ve DNA polimeraz ekleyerek bir 32P etiketi ekledi. John Donelson (ABD'den doktora sonrası araştırmacı) ve Alan Coulson (asistanı) ile birlikte çalışarak, ince tabakalar üzerinde ikinci boyutta homokromatografiyi kullanarak iki boyutlu sistemde sentezlenen DNA'yı analiz etti.

Sekans analizine yardımcı olmak için Fred, Mn2+ tarafından katalize edilen CTP'nin bilinen yanlış anlaşılmasını kullanarak dCTP (deoksisisitidin trifosfat) yerine CTP'yi (siti-din trifosfat) ikame etti. Oktanükleotidin, kılıf proteini geninin tahmin edilen bölgesinde sentezini hazırlayamaması gerçeğine rağmen (protein dizisindeki bir hata nedeniyle), başka bir yerde benzersiz bir konumda prime yaptı. Fred, 50 kalıntılık bir diziyi başarıyla çıkarabilirdi. Pankreatik RNaz ile art arda daha uzun prime edilmiş fragmanları sindirmek için DNA'ya dahil edilen CTP'den yararlandı.

Şimdi teoride, etiketsiz f1 DNA ile başlayabilir, ancak radyoaktiviteyi sentetik reaksiyonun ürünlerine dahil ederek radyoaktif yaklaşımını kullanmaya devam edebilirdi. Bu şekilde, DNA şablonunun kısa bir bölümünü örnekleyerek uzun bir DNA üzerinde çalışabilirdi. Bu, o zamanlar cesur bir karardı ve tek boyutlu sıralamanın yolunu açtı.



## *artı ve eksi yöntemi*

Bu yöntemde, radyoaktif olarak etiketlenmiş DNA ürünleri, önceden hazırlanmış bir sentez reaksiyonunda DNA polimeraz ile sentezlendi, bir poliakrilamid jel fraksiyonasyonunun bitişik şeritlerinde bantların pozisyonları incelenerek "okundu". Fred daha sonra, "DNA dizilemesine yönelik bu yeni yaklaşımın, sahip olduğum en iyi fikir olduğunu, orijinal ve nihayetinde başarılı olduğunu" söyledi. Bu yeni yöntemde, önceki tüm yöntemlerin aksine, ürünlerin fraksiyonlarına ayrılmasından sonra daha fazla analiz edilmesine gerek yoktu.

Fred'in bu ilk tek boyutlu sıralama yöntemini ne zaman ve nasıl geliştirdiğini bilmek ilginçtir. Bunu belirlemedeki bir zorluk, Fred'in artı ve eksi yöntemini geliştirdiği sırada laboratuvar kayıtlarının eksik olduğunu kabul etmesidir. Bununla birlikte, ilk girişimin yaklaşık Nisan 1973'te (Wellcome/Sanger arşivleri) oktanükleotid, bir f1 DNA şablonu ve DNA polimeraz ile prime edilmiş uzatma kullanan bir dizi deneyde olduğu görülüyor. Fred ilk önce radyoaktif sentez ürünlerinin boyut aralığını rastgele seçti, 32P-dATP veya 32P-dGTP (şirket içinde sentezlendi) ile etiketlendi. Etiketlenmiş, sentetik DNA'yı bir boyut dışlama kolonunda birleştirilmemiş trifosfatlardan saflaştırdı. Daha sonra ve bu önemli bir kısımdır, kolon örneğinin dört alikotunu bir trifosfat, dCTP, dATP, dGTP veya dTTP ve T4 DNA polimeraz artı sistemi ile inkübe etti. T4 DNA polimeraz, sentez için gerekli trifosfat, C, A, G veya T gerekene kadar 3-eksonükleaz aktivitesini kullanarak etiketlenmiş DNA'yı bozar, böylece tüm fragmanlar bilinen bir kalıntıda sona erer (Englund 1971). Diğer dört alikotla, yalnızca üç trifosfat ve E. coli DNA polimerazının Klenow fragmanı ile inkübe etti ve sırasıyla dCTP,

dATP, dGTP veya dTTP, eksi sistem, atladı. Bu durumda, DNA polimeraz, dCTP, dATP, dGTP veya dTTP gibi olmayan trifosfat gerekene kadar DNA'nın kısa bir bölümünü sentezleyecektir. Bu tür ürünler, eksik dCTP kalıntısından önce sona erecektir. Bu sekiz alikot, tek boyutlu homokromatografi ile parçalara ayrıldı. İlk sonuçlar net değildi, ancak "bazı şeylerin" olduğunu gösterdi. Daha sonraki bir deneyde, Fred, prime edilmiş uzatma reaksiyonunu tekrarladı ve örnekleri bir poliakrilamid jel üzerinde yan yana ayıran doktora sonrası araştırmacısı John Donelson'a bir örnek verdi. Bu, homokromatografi ile ayırmadan biraz daha iyi görünüyordu ve poliakrilamid jel koşullarının optimize edilmesinin yolunu açtı. Poliakrilamid jeller, o dönemde proteinleri ve nükleik asitleri birbirinden ayırmak için oldukça standart bir malzemeydi, ancak daha önce DNA'yı sıralamak için hiç kullanılmamışlardı. Oldukça uzun nükleik asitlerin yalnızca tek bir kalıntı ile birbirinden ayrıştırılabileceği anlaşılmamıştı. Fred daha sonra koşulları optimize etti ve sonunda uzun, çok ince, oldukça denatüre edici 7 M üre jellerin yaklaşık 50 OC'de çalıştırılmasının en iyisi olduğunu ve yaklaşık olarak çözüldüğünü buldu. Artı ve eksi yönteminde bazı sınırlamalar olsa da (jeller üzerindeki bantların yoğunlukları bir şekilde eşit olmayabilir) Fred ve meslektaşları Gillian Air, Bart Barrell, Nigel Brown, Alan Coulson, John Fiddes, Clyde Hutchinson III, Pat Slocombe ve Mike Smith bu yöntemi yaklaşık 5375 nükleotid bakteriyofaj X174 DNA nükleotidinin geçici dizisini tanımlamak için kullandı. Neyski, X174 DNA'sının restriksiyon fragmanları artık primer olarak kullanılabilirdi, primerleri kimyasal olarak sentezlemeye gerek yoktu.



## *dideoksi yöntemi*

DNA dizilemesi için artı ve eksi yönteminin muazzam ilerlemesine rağmen, Fred onun doğruluğundan memnun değildi ve bir dizinin sonunda nükleotidi tanımlamak için başka bir yöntem geliştirmeyi diledi. 2,3-dideoksi-TTP'nin E. coli DNA polimeraz için bir zincir sonlandırıcı işlevi gördüğünü gösteren Arthur Kornberg (ForMemRS 1970) altındaki grup tarafından zincir sonlandırıcıların kullanımını düşünmesi için uyarıldı. 2 incorpor, 3 -dideoksi kalıntısı, bir kez DNA'ya dahil edildiğinde, zincir uzatması için gerekli 3p-hidroksil grubundan yoksun olduğundan daha fazla uzatılmaz. Daha sonra fikir, diğer üç olağan trifosfatın (dCTP, dATP ve dGTP, biri radyoaktif olarak etiketlenmiş) varlığında 2,3-dideoksi-TTP'yi normal dTTP ile karıştırmaktı, böylece kısmi sonlandırma meydana geldi. Bu şekilde, tek tek dideoksi-sonlu bantların bilinen bir kalıntıyı temsil edeceği DNA şablonunun bir bölgesini kaplayan bir dizi bant elde edilmelidir. Daha önce sadece 2,3-dideoksi-TTP sentezlenmişti ancak dideoksi-CTP, dideoksi-ATP ve dideoksi-GTP mevcut değildi. Bu yöntemi oluşturmak için, Fred ve Alan Coulson, Mike Gait ve Bob Shepherd'in tavsiyesiyle bunları kendileri sentezlemek zorunda kaldı. Yaklaşık bir yıl sonra, şimdi dört dideoksi trifosfatla donanmış olan Fred, Alan Coulson ve Steve Nicklen, yöntemlerini klasik 1977 makalelerinde açıkladılar, muhtemelen Fred'in en önemli makalesiydi. Bu dideoksi yönteminin, artı ve eksi yönteminden daha basit ve daha doğru olduğu kanıtlanmıştır. O ve meslektaşları, şimdi Ted Friedmann da dahil olmak üzere, daha sonra X174 DNA dizisini tekrarladı ve şu anda 5386 nükleotid dizisinde yaklaşık 30 kalıntıyı revize etti. Aynı yıl Maxam & Gilbert (1977), 5 'veya 3' uç etiketli DNA ipliklerinin kısmi kimyasal bozunmasına bağlı olan alternatif, doğrudan, sekanslama yöntemini tanımladılar. Bu alternatif yöntem başlangıçta oldukça yaygın olarak kullanıldı çünkü çift sarmallı ve tek sarmallı DNA'ya eşit ölçüde uygulanabilirdi.

Fred şimdi, insan mitokondriyal DNA (yaklaşık 16,5 x 103 nükleotid) ve faj DNA (yaklaşık 48,5 x 103 nükleotid) gibi daha da uzun DNA'ları sıralamanın zorluğunu denemek istedi. Çift sarmallı olan bu daha uzun DNA'ların, dideoksi dizileme yöntemi için tek sarmallı DNA'ya dönüştürülmesi gerekiyordu. Ayrıca, Rodger Staden'in bilgisayar programlarının önemli ölçüde yardımcı olduğu, veri toplamayı hızlandırmak için daha verimli ve daha hızlı dizilemeye ihtiyaç vardı (Staden 1980). Fred, Alan Coulson, Bart Barrell, Andrew Smith ve Bruce Roe ile birlikte,

DNA'nın rastgele, 'shotgun' klonlamasını, bireysel, rastgele rekombinant klonların olabileceği değiştirilmiş bir M13 faj DNA'sına (Gronenborn & Messing 1978) sokarak gerçekleştirdi. Bu, dizilemeyi ölçülemeyecek şekilde hızlandırdı çünkü M13'te klonlama, dizilemeden önce tek tek DNA'ları etkili bir şekilde saflaştırdı. Dideoksi dizileme de standartlaştırıldı, çünkü klonlanmış eki çevreleyen M13 DNA vektör dizilerine hibridize olan "evrensel primerler" artık kullanılabilirdi. Fred, Coulson ile yapılan faj çalışmasında yaygın olarak kullandığı ve DNA'nın yaklaşık %90'ının bir av tüfeği yaklaşımıyla elde edildiği av tüfeği dizilimine her zaman meraklıydı. Sonikasyon, rastgele kesilmiş DNA elde etmek için tercih edilen yöntemdi. Ancak, Guo-Fong Hong, Diana Hill ve George Petersen'in yardımıyla 48 502 nükleotidin dizisini tamamlamak için hem yavaş hem de sinir bozucu yönlendirilmiş yaklaşımlara ihtiyaç vardı.

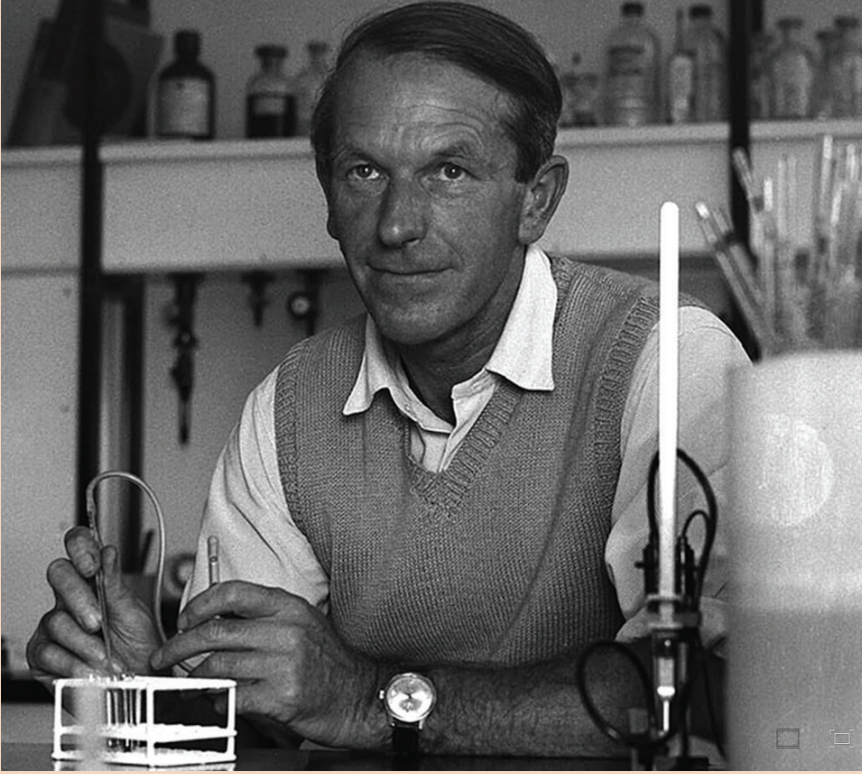
Fred, daha sonra Craig Venter ile yazışmalarında av tüfeği dizileme tercihini doğruladı, Venter'ı 1995 yılında Mycoplasma genitalium genomunun av tüfeği klonlamasından dolayı tebrik etti.

Av tüfeği yaklaşımıyla ne kadar ileri gidilebileceğini merak ettim. Ben her zaman buna meraklıydım ama temel sorunlardan biri, iş arkadaşlarım arasında popüler olmamasıydı. Her insan kendi diyebileceği bir dizi diziye sahip olmayı sever. Sanırım bu artık tüm otomasyonla ilgili bir sorun değil. çalıştığından beri kesinlikle uzun bir yol kat etti.

Fred ile çalışan birçok bilim adamı, Fred Sanger'in deneysel yaklaşımında kullandığı ve geliştirdiği tekniklere hayran kaldı. Belki de en bariz olanı mikro yöntemlerin kullanılmasıydı. Kuşkusuz onları çok küçük miktarlarda peptit veya nükleotitleri kağıda ve daha sonra uygulama ihtiyacı nedeniyle geliştirdi. Fred'in laboratuvarında başarılı olmak için, bir kurutucuda bir polietilen tabaka üzerinde çözeltileri buharlaştırarak ve cam kapiler tüplerde 1 µl reaksiyon oluşturarak çok küçük reaksiyon hacimlerini nasıl işleyeceğinizi öğrenmek çok önemliydi. Peptitleri veya oligonükleotitleri kağıttan, iyon değişim kağıdından, ince tabakalardan veya jellerden ayırma teknikleri de aynı derecede ustacaydı. Ticari, renkli, dövülebilir bir modelleme kili olan ahşap ve hamuru parçaları, kapiler tüpleri veya küçük cam test tüplerini yerinde tutmak için gerekli laboratuvar ekipmanıydı.







## ***ΦX174 DNA'sında örtüşen genler; mitokondride farklı bir kod***

Fred'in yaklaşımı her zaman metodolojiktir. Ne kadar uzun bir DNA sıralayabilirdi? Yöntemlerini nasıl geliştirebilirdi? Sıralamadaki motivasyonu, öncelikle tanımladığı dizinin biyolojik önemini keşfetmek değildi. Yine de, faj  $\Phi X174$  DNA'sını ve insan mitokondriyal DNA'sını sıralayarak o ve meslektaşları, gen organizasyonunda oldukça beklenmedik ve yeni iki özellik keşfettiler. İlk sürpriz, Bart Barrell, Gillian Air ve Clyde Hutchinson III tarafından klasik bir makalede açıklanan, ancak yazar olarak Fred'in adını içermeyen  $\Phi X174$  DNA'sındaki "örtüşen genlerin" varlığıydı. Bu, Fred'in yazarlık için yeterince şey yapmadığını hissettiği başka bir durumdu. D ve E genlerinin örtüşmesine ilişkin kesin kanıt, her iki gendeki tip  $\Phi X174$  DNA ve amber (UAG üreten) durdurma kodon mutasyonlarının dizisi

incelenerek elde edildi. Mike Smith ve Nigel Brown ile birlikte Fred Sanger'ın adını içeren başka bir makale, A ve B genlerinin de örtüştüğünü gösterdi.  $X174$  DNA gibi küçük genomların evriminde, mevcut proteinlerle örtüşen yeni proteinler için seçici baskı olabileceği öne sürüldü, çünkü başka yerlerde yeterli kodlamayan DNA vardı.

İkinci sürpriz, insan mitokondriyal DNA'sı (16 569 nükleotid) ve sığır mitokondriyal DNA'sının (16338 nükleotid) standart genetik koddan (Barrell ve ark. 1979) farklı bir genetik koda sahip olmasıydı. Bu alışılmadık mitokondriyal genetik kod tam bir sürprizdi çünkü daha önce 1960'ların başında geliştirilen genetik kod evrensel olarak kabul edildi. Ayrıca, AGA ve AGG'nin (normalde arginin için kodlama yapan) artık UAA ve UAG sonlandırıcılara ek olarak zincir sonlandırıcılar olabileceği önerildi. Bununla birlikte, Temperley ve ark. (2010), AGA ve AGG'nin sonlandırıcılar olmayabileceğini öne sürmüşlerdir, çünkü mRNA'nın ribozom üzerindeki geriye doğru kayması (ribozom çerçeve kayması), bu önerilen sonlandırıcıların bir nükleotid üstündeki bir U kalıntısında meydana gelebilir ve bunları klasik UAG sonlandırıcılara dönüştürür.

Mitokondride alışılmadık genetik kodla birlikte, mitokondriyal kodlu tRNA'ların beklenmedik başka bir özelliği ortaya çıktı. 32 veya daha fazla normal sitoplazmik tRNA sayısının aksine, DNA dizisinden sadece 22 farklı mitokondriyal tRNA tahmin edildi. Mitokondriyal tRNA'ların birçoğunun, T $\psi$ CG dizisi (burada  $\psi$  psödouridini temsil eder) ve dihidro-U kolu gibi tRNA'nın değişmez özelliklerinden yoksun olağandışı bir "yonca yaprağı" yapısına sahip olduğu tahmin edildi. En tuhafı AGC veya AGU için serin tRNA kodlamasıydı. Az sayıda mitokondriyal tRNA, bazı mitokondriyal tRNA'ların, modifiye edilmiş bir antikodon: kodon baz eşleşmesi ile kodonun fazlalık üçüncü pozisyonunu tanıması gerektiğini kuvvetle ileri sürdü. Bu tür mitokondriyal tRNA'larda antikodonun birinci pozisyonundaki bir U kalıntısı, kodonun üçüncü pozisyonunda A, C, G veya U ile "yalpalama" yapabilir. Genel olarak, mitokondrinin farklı genetik kodu ve tRNA'ların farklı doğası, bazı ilkel prokaryotlardan türetildiği varsayılan mitokondrinin endosimbiyotik kökenleriyle tutarlıydı.

Mitokondriyal DNA'nın sıralanması, Steve Anderson, Alan Bankier, Maarten de Bruijn, Bart Barrell, Ellson Chen, Alan Coulson,

Jacques Drouin, Ian Eperon, Don Nierlich, Bruce Roe, Peter Schreier, Andrew Smith, Rodger dahil Fred'in birçok iş arkadaşını içeriyordu. Fred'e göre Bart Barrell, mitokondriyal DNA verilerinin analizinde ve tRNA dizilerinin nerede bulunduğunu tahmin etmede özellikle yer aldı.

Fred, Paul Berg ve Walter Gilbert ile birlikte 1980'de ikinci Nobel Kimya Ödülü'ne layık görüldü. Fred, dünya çapında iki kez Nobel Ödülü alan dört bilim adamından biridir, diğerleri Marie Curie, Linus Pauling ve John Bardeen'dir. Bu ayrımı başaran tek İngiliz bilim adamıdır.

## ***başkaları üzerindeki etkisi***

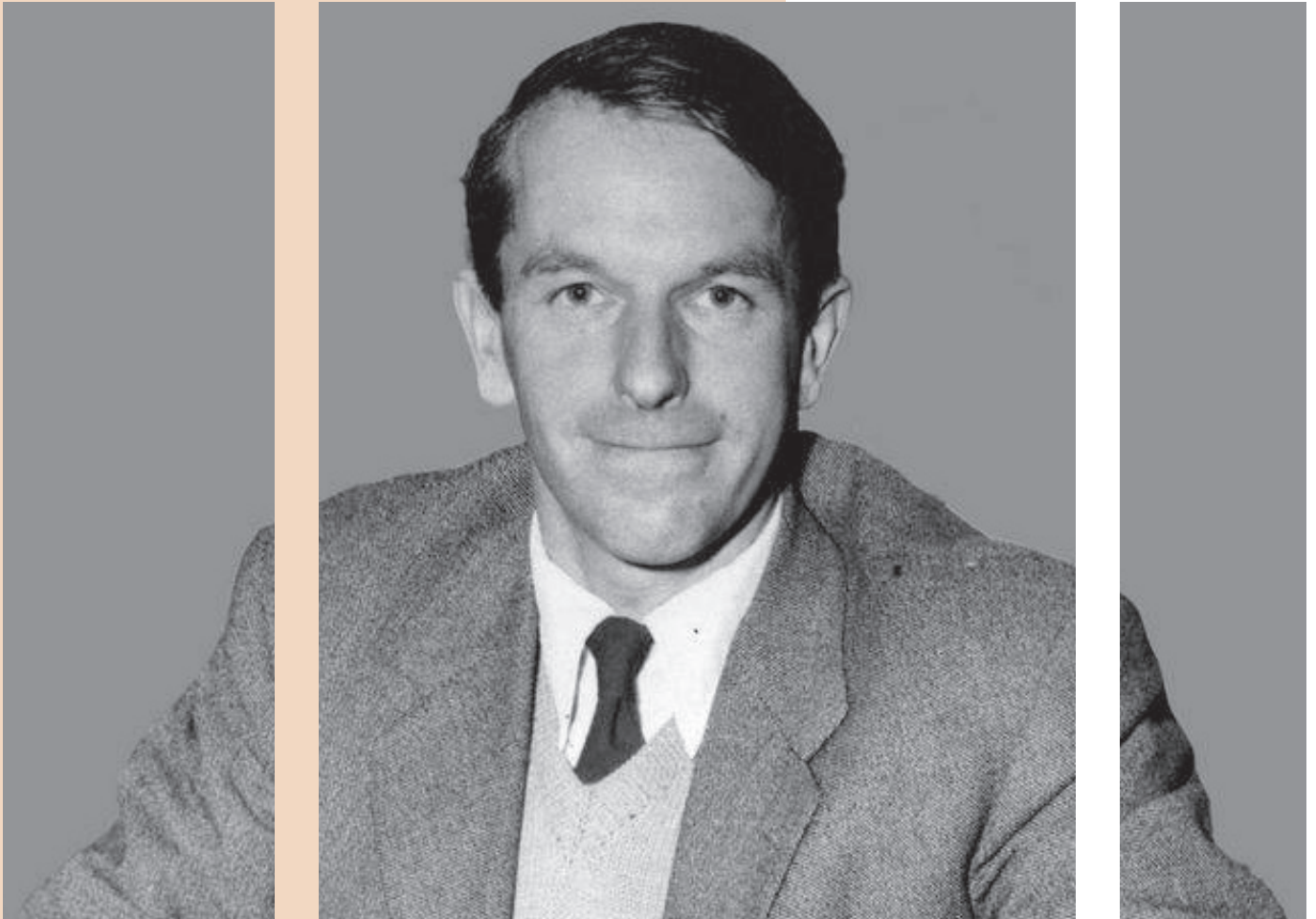
Fred nadiren başkalarını doğrudan etkilemeye çalıştı, ancak tavsiyesini sorduklarında bilimsel meslektaşlarını her zaman teşvik etti. Kendi deneylerinin çoğu zaman başarısız olduğunu ve birinin tekrar denemeye devam etmesi gerektiğini söyledi. En büyük etkisi örnek olmasıydı. O, laboratuvarında "uğraşmayı" seven mükemmel bir deneyciydi.

## ***deney defterleri***

Londra Wellcome Library'de arşivlenmiş-tir esas olarak kendi el yazısıyla yazılmıştır. 1940'tan 1983'e kadar tüm kariyerini kapsıyor ve deneysel bir yaklaşıma kendi elleriyle verdiği önemi gösteriyor. MRC Moleküler Biyoloji Laboratuvarında, küçük ofisinde sekreteri Peggy Dowding'e mektuplarını dikte ettirmek ya da o gün için deneylerini planlamak ya da deney sonuçlarını yazmak dışında nadiren vakit geçirdiğini gözlemledim. Komite toplantılarından pek hoşlanmıyordu. Grup liderleri Ieuan Harris, Brian Hartley ve César Milstein ile çok nadiren toplanırdı. Normalde, asistanıyla paylaştığı küçük laboratuvarında ofisinin bitişiğinde çalışırken bulunurdu. Kritik katkılarının çoğu, ya Bart Barrell ile ya da daha sonra Alan Coulson ile kendi başına yapılan çalışmalar oldu. Şimdiye kadar dizilenecek ilk protein olan insülin dizisini oluşturarak, genel olarak protein dizileme alanını açtı. Hızlı bir DNA dizileme yöntemi bularak tüm genom dizileme olasılığının, örneğin, insan genomunu dizileme olasılığını, önünü açtı.

Bu hedef, radyoaktif etiketlerin yerini alan floresan etiketlerle modifiye edilmiş olsa da, dideoksi sıralama yöntemiyle 2001 yılında elde edildi. O zamandan beri, DNA dizilimi otomatikleştirildi, böylece milyarlarca DNA parçası büyük ölçüde paralel yaklaşımlarla dizildi (Brownlee 2014). Bununla birlikte, şu anda kullanılan sıralama yöntemlerinin çoğu hala Sanger'ın 1977 tarihli makalesinde geliştirdiği ilkelere dayanmaktadır. DNA dizileme artık tıp, evrimsel biyoloji, viroloji, bakteriyoloji, hücre biyolojisi, arkeoloji, botanik ve adli tıp gibi birçok farklı alanda biyolojinin tamamını etkiliyor.

Kariyerinin başlarında Fred, Biyokimya Departmanında kendisine tahsis edilen sınırlı alan nedeniyle kısıtlanmıştı. 1950'lerin sonunda, 1962'de MRC Laboratuvarı olarak açılan yeni bir ortak araştırma enstitüsü için MRC'de lobi yapmak için Cavendish Fizik Departmanında bir MRC Birimi başkanı olan Max Perutz FRS ile işbirliği yaptı. Yeni arşiv materyali (Wellcome / Sanger arşivi), Fred'in Perutz'un grubuyla güçlerini birleştirmek için inisiyatif aldığını gösteriyor.





Daha sonra, 1993 yılında Fred, Sanger Center'ı resmen açtı ve adı, Hinxton, Cambridgeshire, Hinxton Hall'da John (şimdi Sir John) Sulston FRS'nin müdürü olarak Wellcome Trust Sanger Enstitüsü olarak değiştirildi. Burası, insan ve nematod (*Caenorhabditis elegans*) genom dizileme projelerine İngiltere'nin önemli katkısına öncülük ederek dünya lideri bir laboratuvar haline geldi. Fred'in, "Olsa çok iyi olur" (Sulston & Ferry 2002) şartıyla binaya onun adını vermeyi kabul ettiği bildirildi. Cambridge'deki Biyokimya Bölümü binası, Sanger Binası, 1997'de Fred tarafından açıldı. Daha sonra 2007'de eski okulu Bryanston'da Sanger Bilim ve Matematik Merkezi'ni açtı.

Fred, kariyeri boyunca ben dahil 10'dan fazla doktora öğrencisine danışmanlık yaptı. En ünlü öğrencileri Rodney Porter (FRS 1964) ve Elizabeth Blackburn idi. Rodney Porter (1917–85) onun ilk öğrencisiydi, 1947'de ona katıldı ve aslında Fred'den bir yaş büyüktü. Fred'e göre, bir öğrenciden çok bir meslektaştı. Rodney her zaman antikorlarla ilgilendi ve Fred'in o sırada yaptığı insülin sekans çalışmasına katılmadı. Porter, antikor yapısı konusundaki

çalışmaları nedeniyle 1972 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görüldü. 1971'den 1974'e kadar Fred'in öğrencisi olan Elizabeth Blackburn, Avustralya'nın Melbourne kentinden, 2009'da telomeraz ve kromozomların uçlarındaki sekans üzerine yaptığı çalışmalardan dolayı Nobel ödülü sahibi oldu.

## ***konferanslar, dinlenme ve hobiler***

Fred katı bir Quaker olarak yetiştirildi, ancak emekli olduktan sonra şunu söyledi: "Aslında sonunda, bilimsel yolun katı bir din anlayışıyla bağdaşmadığına inandığım için kuyu bir Quaker olamama rağmen, Quaker yetiştirilme tarzının bende büyük bir etkisi olduğunu hissediyorum. Özellikle doğruyu söylemenin ve kendi vicdanına göre hareket etmenin önemi konusunda." Ayrıca, aile hayatına her zaman değer verdi ve düzenli aile tatilleri yaptı, bazen onları katıldıkları bilimsel konferanslara davetlerle birleştirdi. O ve Joan, 1955'teki Uluslararası Yün

Festivali'nin bir parçası olarak Avustralya'ya yaptıkları geziden özellikle keyif aldılar ve ardından Büyük Set Resifi'ndeki Heron Adası'nda bir tatil için Ted Thompson ve karısına katıldılar. 1958'deki ilk Nobel ödülünden sonra Joan'la unutulmaz bir diğer geziye çıktılar. Peru, Arjantin, Brezilya ve Şili'nin de aralarında bulunduğu Güney Amerika'ya, bir çalışma ve eğlenme karışımı gezisi. Daha sonra, Fred bilimsel konferanslara biraz daha az katıldı, ancak özellikle Joan ona eşlik edebilirse önemli bir bilimsel ilerleme kaydettiğini hissettiğinde seyahat etmekten mutluymuştu. 1974'te Adelaide'deki Bill Elliott'un departmanına verdiği üç aylık mini maaş da dahil olmak üzere Avustralya'yı birkaç kez daha ziyaret etti. Kariyeri boyunca, ABD ve Kanada'da çok sayıda kapsamlı, çok merkezli konferans turları düzenledi. Fred'in dünya çapında birçok arkadaşı, bilimsel meslektaşları ve hayranı vardı. British Council'in sponsorluğunda 1963'te Rusya'yı ziyaret etme davetini ve 1980'de Royal Society'nin sponsorluğunda ilk doktora öğrencisi Rodney Porter ile birlikte Çin'e yaptığı ziyareti kabul etti.



Fred'in hobilerinden biri kayıkla gezmektir. 1940'larda çocukları oldukça küçükken oğlu Peter'in yardım ettiği kitlerden kendisi birkaç tekne yaptı ve ayrıca nehir kullanımı için bir kabinli kruvazör sahibi oldu. Daha sonra, yaklaşık 1960 yılında Fred, iki direkli ve dahili motoru olan dört yataklı, nehir ve denizde seyreden bir yelkenli gemi satın aldı. Orfordness, Suffolk'ta, Kuzey Denizi'nden kısa bir mesafede, Aldeburgh yakınlarında, Benjamin Britten şöhretine sahip nehirde demirlemişti. Fred, bu oldukça etkileyici teknede ailesini ve arkadaşlarını alıp eğlendirdi. Yaklaşık 1980'de Fred, kendisinin ve ailesinin Norfolk Broads'daki Nene ve Ouse'de kullandığı bir nehir kruvazörü satın aldı. Bunu marangozluk becerilerini kullanarak kendisi ayarlamıştı. Kariyerinin başlarında Fred başarılı bir squash oyuncusuydu ve lisans öğrencisi olarak St John's College ikinci takımında oynadı. Daha sonra, Biyokimya Bölümü'nün bir üyesi olduğunda, zaman zaman bölümdeki squash takımının zirvesindeydi. Richard Perham FRS (1937–2015) sahanın merkezine hakim olma becerisine sahip olduğunu ve 45 yaşında bile yenilmesinin zor olduğunu söy-

ledi. Fred ayrıca Moleküler Biyoloji Laboratuvarı laboratuvar ekibi için ara sıra kriket oynadı. Oldukça hevesli bir kayakçıydı, daha sonra Kanada Rockies'deki Banff'ta, ABD'de Lake Tahoe'da ve Yeni Zelanda'da Queenstown'da kayak tatillerini konferanslarla birleştirmeyi başardı.

## *emeklilik*

Fred 1983 yılında emekli oldu. 65 yaşında, kalan zamanını artık kayıçlılık, bahçıvanlık hobilerine ve büyük oğlu Robin, küçük oğlu Peter David, Sally ve iki torunu ile daha fazla vakit geçirmeye ayırmak istediğini söyledi. Fred emekli olduktan sonra sekreteri olan Peggy Dowding ile daha önemli makalelerinin bir koleksiyonunu derlemek ve anılarını yazmak dışında herhangi bir akademik faaliyette bulunmadı. Ancak her ikisi de artık doktora yapmış olan güvenilir yardımcıları Bart Barrell ve Alan Coulson ile iletişimini sürdürdü. Fred ve Joan, 252 Hills Road, Cambridge, Fred'i emeklilikte meşgul edecek kadar geniş bir bahçeye (1,25 dönüm) sahip olan, Fens'teki Swaffham Bulbeck'teki 'Far Leys'e taşındılar. Aslında,

ev ve bahçe Fred'in zamanının çoğunu aldı çünkü Joan o zamanlar daha az aktifti ve onun yardımına ihtiyacı vardı. Yine de, bahçecilikle ilgilenmesinin yanı sıra, özellikle gül ve şamdan yetiştiriciliği konusunda, Fred, çocukluğunda öğrendiği bazı resim ve marangozluk becerilerini de tekrarladı. Son zamanlarda fiziksel ve zihinsel sağlıkta bir miktar düşüşün ardından, Fred 2013 yılında 95 yaşında vefat etti. 8 Kasım 2014'te Cambridge'deki eski koleji St John's College'da moleküler biyolojiye yaptığı muazzam katkıyı anmak için hareketli bir anma töreni düzenlendi. Bu vesileyle Sör John Walker FRS, Fred'in çalışmasının etkisini Charles Darwin'in etkisine benzetti. Fred Sanger, iki Nobel ödülünün yanı sıra birçok ödül aldı. 1986'da Liyakat Nişanı ile ödüllendirildi, ancak daha önce şövalyeliği reddetti ve "Sir" olarak anılmak istemedi. Tam onurları aşağıda listelenmiştir. Onları hafifçe ve iddiasız bir şekilde taşıdı. Fred'in karısı Joan ise, kız kardeşi Mary Willford ve üç çocuğu Robin, Peter ve Sally sayesinde hayata tutunan Fred'den önce hayata gözlerini yumdu.