

Obsah

Předmluva k českému vydání	13
Poznámka překladatelů k českému vydání	15
Seznam méně obvyklých zkratk	16
Úvod	17
1. Úloha genů v buňkách	19
Stavebními kameny veškerého života jsou buňky	20
Buňky jsou továrny nepatrných rozměrů, které syntetizují současně několik tisíc rozličných molekul	20
Molekuly v buňce lze dělit na malé molekuly a makromolekuly	20
Speciální buněčné katalyzátory, nazývané enzymy, určují chemické reakce, k nimž dochází v buňkách	21
Sled aminokyselin v polypeptidovém řetězci daného proteinu je unikátní	21
Pro funkčnost enzymu je nezbytné přesné svinutí jeho polypeptidového řetězce	22
Aktivace molekul na makroergické formy zvyšuje jejich chemickou reaktivitu	23
Buněčný metabolismus můžeme znázornit pomocí metabolických map	23
Enzymy nemohou určovat pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci	24
Mendelovy pokusy s křížením hrachu poprvé odhalily existenci genetických determinant (genů) jako samostatných jednotek	24
Chromozómy jsou buněční nositelé dědičnosti	25
Hypotéza jeden gen – jeden protein	27
2. DNA je primárním genetickým materiálem	30
DNA je uložena v chromozómech	30
Buňky obsahují DNA i RNA	30
Objev biologického testu genetických molekul	31

Viry jsou sbalené genetické elementy, které se stěhují z buňky do buňky	33
Molekuly komplementárního rozměru a tvaru se navzájem přitahují	33
Určení průměru DNA	35
Nukleotidy DNA a RNA jsou navzájem spojeny pravidelnými fosfodiesterovými vazbami 5'→3'	35
DNA různých organismů se značně liší množstvím jednotlivých bází	36
DNA má velmi pravidelný tvar	36
Základní jednotka DNA se skládá ze dvou navzájem svinutých polynukleotidových řetězců (dvoušroubovice)	37
Dvoušroubovice je držena pohromadě vodíkovými můstky mezi páry bází	37
Komplementární povaha DNA umožňuje autoreplikaci	38
Důkaz oddělování vláken při replikaci DNA	39
Molekuly DNA lze denaturovat i renaturovat	40
Páry bází G-C se od sebe oddělují méně snadno než páry A-T	41
Palindromy podporují tvorbu vodíkových můstků v rámci jednoho vlákna	41
5-Methylcytosin může v DNA nahrazovat cytosin	42
Chromozómy obsahují po jedné molekule DNA	42
Viry jsou zdrojem homogenních molekul DNA	43
DNA fága λ se může začlenit na specifické místo v chromozómu <i>E. coli</i>	43
Abnormální transdukující fágy poskytují unikátní segmenty bakteriálních chromozómů	44
Plazmidy jsou autonomně se replikující minichromozómy	45
Cirkulární DNA může vytvářet nadšroubovici	46
Většina dvoušroubovic je pravotočivá, avšak za zvláštních podmínek vedou určité nukleotidové sekvence ke tvorbě šroubovic levotočivých	47

3. Rozluštění genetického kódu 51

Náhrada aminokyseliny za jinou v mutované molekule hemoglobinu	51
Vývoj genetiky na úrovni jemných struktur	51
Gen a jeho polypeptidové produkty jsou kolinéární	52
RNA přenáší informaci z DNA do míst proteosyntézy v cytoplasmě	53
Jak se řadí aminokyseliny na templátech RNA?	53
Úloha enzymů a templátů při syntéze nukleových kyselin a proteinů	54
Proteiny jsou syntetizovány od N-konce k C-konci	55
Proteosyntézy se účastní tři formy RNA	55
Genetický důkaz, že kodony obsahují tři báze	56
Řetězce RNA jsou syntetizovány i překládány ve směru od 5' ke 3'-konci	57
K určení kodonů je použito syntetických mRNA	57
Genetický kód byl plně rozluštěn v červnu roku 1966	58
„Kolisání“ často dovoluje jednomu druhu tRNA rozeznávat více kodonů	58
Do jaké míry je genetický kód univerzální?	59
Geny průměrné velikosti obsahují nejméně 1 200 párů bází	59
Supresorové tRNA působí chybné čtení genetického kódu	59
Signály pro zahájení a zastavení syntézy specifických molekul RNA jsou zakódovány v sekvencích DNA	61

Pro translaci *in vitro* exogenně dodaných mRNA jsou vyvíjeny stále účinnější systémy 62

4. Genetické elementy řídící expresi genů 66

Represory řídí syntézu induktivních enzymů	66
Bakteriální geny s navzájem souvisejícími funkcemi jsou organizovány do operonů	67
Promotory jsou signály pro start syntézy RNA	68
Konstitutivní syntéza molekul represorů	69
Izolace a identifikace represorů	69
Pozitivní regulace transkripce genů	69
Atenuace (zeslabení)	70
Translační regulace	71
Počáteční obtíže při studiu genové regulace u vyšších rostlin a živočichů	73
Purifikace žabích genů pro ribozomální RNA	73
Eukaryontní mRNA mají čepičky a koncové sekvence	75
Tři druhy RNA-polymerasy u eukaryontů	75
Eukaryontní DNA je organizována do nukleozómů	75
Živočišné viry slouží jako modelové systémy exprese genů v buňkách vyšších organismů	75
Nádorové RNA-viry se replikují pomocí dvouvláknové DNA jako meziproductu	76

5. Metody přípravy rekombinovaných molekul DNA 79

Vývoj metod sekvenční analýzy nukleových kyselin	79
Restrikční enzymy štěpí DNA specificky v závislosti na sekvenci	80
Restrikční mapy jsou velmi specifické	81
Restrikční fragmenty jsou základem nových, účinných metod sekvenování DNA	82
Oligonukleotidy je možno syntetizovat chemicky	85
<i>EcoRI</i> poskytuje fragmenty s kohezními (lepivými) konci	86
Replikace DNA se účastní mnoho enzymů	87
K zarovnaným koncům lze pomocí enzymů připojit kohezní konce	88
Vektory pro klonování cizorodých genů jsou malé plazmidy	89
DNA vyšších organismů se stává přístupnou molekulární analýze	90
Odezva vědců na nebezpečí neomezeného klonování genů	90
Na konferenci v Asilomaru jsou navrženy předpisy pro práci s rekombinantní DNA	91

6. Izolace klonovaných genů 94

Vývoj „bezpečných“ bakterií a plazmidových vektorů	94
Proč používat plazmidů nesoucích rezistenci k antibiotikům?	95
Sondy pro klonované geny	96

Syntéza a klonování cDNA	96
Identifikace specifických klonů cDNA	98
Fragmenty genomu lze klonovat v bakteriofágu λ	99
Kosmidy dovolují klonovat větší úseky cizí DNA	101
K analýze dlouhých úseků eukaryontní DNA se využívá metody postupného mapování chromozómu	104
Klonováním DNA ve fázi M13 se urychlí Sangerovo sekvenování	105
Southernův a northernův přenos	105
Vývoj metod pro klonování genů, které kódují méně četné proteiny	107
Testování genových knihoven oligonukleotidovými sondami	108
Počítače porovnávají typy cDNA	109
K izolaci specifických eukaryontních cDNA lze použít expresivních vektorů	110
Imunologické testování produktů expresivních vektorů	111

7. Neočekávaná složitost eukaryontních genů 115

Objev rozštěpených genů	115
Na hranicích mezi exony a introny jsou specifické sekvence bází	116
Objev autonomního sestřihu	118
Úplná sekvence prvních savčích genů	119
Otevřené čtecí rámce v DNA vyznačují oblasti kódující proteiny	120
Vedoucí sekvence na NH_2 -konicích vylučovaných proteinů	120
Introny někdy vyznačují funkční oblasti proteinů	121
Alternativními dráhami sestřihu vznikají z jediného genu různé mRNA	121
Na 5'- a 3'-konicích genů jsou regulační oblasti	122
Některé shluky genových rodin jsou možná evolučními relikty	123
Rodiny genů se mohou rozšířit reverzní transkripcí molekul mRNA	124
Eukaryontní DNA obsahuje rozptýlené repetitivní sekvence	124
Z polypeptidových prekurzorů vznikají bílkovinné hormony	125

8. Mutagenéza *in vitro* 130

Delece	130
Inzerce	132
Záměny bází: deaminace cytosinu	133
Záměny bází: inkorporace nukleotidových analogů	135
Záměny bází: chybná inkorporace nukleotidů	136
Mutanty lze získat pomocí oligonukleotidů s definovanými sekvencemi	136

9. Tvorba genů protilátek přestavbou segmentů zárodečné DNA 141

Stanovení základní struktury molekul protilátek	141
Segmenty V a C jsou kódovány různými geny	142
Použití sond mRNA pro důkaz spojení genů pro V a C	142
Izolace funkčních genů pro protilátky z myelomových buněk	143
Zárodečné buňky jsou zdrojem nespojených genů V a C	144

Mnohonásobné segmenty J (spojovací) jsou připojeny ke genomovým segmentům C (konstantním)	144
Aminokyseliny těžkého řetězce jsou kódovány třemi nesouvisejícími oblastmi DNA	145
Odstranění DNA umožňuje připojit gen V_H ke dvěma různým genům CH	145
Alternativní sestřih umožňuje jednotlivým buňkám vytvářet těžké řetězce tříd μ i δ stejnými segmenty V_H	146
Somatické mutace jsou zdrojem další rozmanitosti imunoglobulinů	146
Určení genů kódujících proteiny hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) pomocí klonování genů	147

10. Nádorové viry 152

Klonování integrovaných forem nádorových DNA-virů	153
Nádorové proteiny viru SV40 a polyomaviru	153
Strukturní proteiny obalující chromatin viru SV40 a polyomaviru jsou kódovány překrývajícími se geny	154
Odlišné regulační signály iniciují syntézu časně a pozdní mRNA u viru SV40 a polyomaviru	155
Počátek replikace DNA viru SV40 a polyomaviru je v oblasti dlouhé přibližně 100 párů bází	156
Složitá organizace nádorových RNA-virů (retrovirů)	157
Vysoce onkogenní retroviry obsahují specifické onkogenní sekvence	158
Proviry si zachovávají stejně uspořádání genů jako genomy RNA-virů	158
Promotor syntézy RNA je umístěn v LTR	159
Onkogeny retrovirů obvykle kódují proteinkinasy	159
Normální buněčné geny jsou předchůdci retrovirových onkogenů	160
Je onkogeneze vyvolaná retroviry způsobena zvýšenou nebo chybnou expresí buněčných genů?	161
Indukce rakoviny slabě onkogenními retroviry	161
Obecná teorie indukce rakoviny	162

11. Pohyblivé geny 165

Přeskok transpozónu představuje vznik nového dceřiného transpozónu	166
Pohyblivé genetické elementy jsou pravděpodobně obecnou vlastností všech organismů	167
Použití pohyblivých elementů v genovém inženýrství embryí drozofily	168
Izolace transponovatelného elementu Ds z kukuřice	169
Vyvinuly se genomy nádorových RNA-virů z pohyblivých genetických elementů?	170
Existují dvě odlišné skupiny transpozónů?	170
Změny pohlaví kvasinek způsobené přemístěním genu: kazetový model	171
Přepínání genů vyvolává změny antigenu trypanozóm	172
Změny antigenů u <i>Neisseria gonorrhoeae</i> pomocí přeskupování genu	174

12. Řízené včleňování DNA do buněk kvasinek	177
Sféroplasty kvasinek přijímají zvenci dodanou DNA	178
Expresí kvasinkových genů v <i>E. coli</i>	178
Kyvadlové vektory	178
Rovněž kvasinky obsahují plazmidy	179
Zvýšení účinnosti transformace dodáním replikačních počátků	179
Stabilizace kvasinkových plazmidů pomocí centromérové DNA kvasinek	180
Vlásenky na koncích (telomerách) chromozómů kvasinek	181
Řízená integrace klonované DNA do chromozómu kvasinek	184
Vyprošťovací vektory	184
Organizace genu	185
Regulace genové exprese u kvasinek	186
13. Genetické inženýrství rostlin pomocí plazmidů rostlinných tumorů	190
Klasické metody šlechtění rostlin	190
Rostlinné buňky v kultuře <i>in vitro</i>	190
Regenerace celých rostlin z rostlinných buněčných kultur	192
Rostlinné protoplasty mohou regenerovat v celé rostliny	192
Příprava hybridních rostlin pomocí fúze protoplastů	192
Genetické inženýrství rostlin	193
Rostlinné tumory	194
Tumor indukující (Ti) plazmidy	194
Mutanty Ti-plazmidu	195
Integrace T-DNA do rostlinného chromozómu	195
Je T-DNA transpozón?	195
Mendelovská dědičnost T-DNA	196
DNA Ti-plazmidu může být použita jako vektor	196
Transformace rostlinných buněk a protoplastů	197
Mobilizace T-DNA pomocí segmentu <i>vir</i> v Ti-plazmidu	198
Oslabené vektory T-DNA umožní regeneraci celých rostlin z jednotlivých buněk	198
Inzerce T-DNA lze využít k izolaci rostlinných genů	198
Praktická aplikace rostlinného inženýrství za použití Ti-plazmidu	199
14. Přenos genů do savčích buněk	203
Ca ²⁺ stimuluje příjem DNA buňkami obratlovců	203
Thymidinkinasa (tk) jako prototyp signálního genu při selekci v transfekčních pokusech	203
Dominantní signální geny pro transformaci normálních buněk	205
Ko-transformace po nitro-buněčném spojení	205
Mikroinjekce DNA do savčích buněk	206
Semistabilní dědičnost methylované DNA po transfekci	206
Izolace přenesených genů	208

Regulace po přenosu genu	210
Potvrzení existence specifických lidských rakovinných genů pokusy s přenosem DNA	211
Klonování lidských onkogenů	213

15. Virové vektory 217

Vektory SV40	217
Viriony SV40 jako vektory	217
Záměna pozdní oblasti SV40	218
Záměna časně oblasti SV40	219
Analýza klonovaných genů pro povrchový antigen	219
Replikace DNA v buňkách COS je podobná replikaci plazmidů	221
Uvolnění integrované SV40-DNA fúzí buněk COS	221
Objev zesilujících sekvencí pomocí vektorů SV40	222
DNA papillomaviru se replikuje v myších buňkách podobně jako plazmid	224
Nádorové RNA viry mohou být použity jako vektory	225

16. Zavedení cizích genů do oplodněných myších vajíček 227

Integrace cizích genů do chromozómů	227
Zavedení cizích genů není specifické pro určitý chromozóm	228
Cizí DNA je trvale integrována do buněk zárodečných drah	228
Expresce cizí DNA v myších	229
Expresce fúzovaného genu <i>MK</i> po mikroinjekci	230
Tkáňově specifická exprese genu <i>MK</i>	230
Pozměněná exprese genu <i>MK</i> u potomstva	230
Funkční exprese fúzovaného genu <i>MGH</i>	231
Integrace MuLV-DNA	232
Časně zárodky infikované MuLV	233
Mikroinjekce provirové DNA	233
První závěry z implantace genů do oplodněných vajíček	233
Klonování živočichů	234

17. Rekombinantní DNA a dědičné choroby 238

Mendelovská dědičnost	238
Vrozené vady metabolismu	238
Léčení vrozených vad metabolismu	240
Včasná diagnóza a přerušení těhotenství	240
Analýza DNA u dědičných vad	241
β -Thalassémie	242
„Nonsense“ a posunové mutace	242
Transkripční mutace	243
Mutace při úpravě RNA	243
Srpkovitá anémie	243

Diagnóza nedostatku α_1 -antitrypsinu pomocí syntetického oligonukleotidu	244
Citrullinémie souvisí s poškozením mRNA argininosukcinátsynthetasy	245
Diagnóza mutací pomocí vazby	246
Vyhledávání mutovaných genů	247
Mapování lidských chromozómů	247
Genetika somatických buněk	247
Lidské a myši hybridní buňky	249
Subchromozomální lokalizace genů	250
Chromozomální translokace a rakovina	251
Hybridizace <i>in situ</i>	251
Klonování jednotlivých chromozómů	253
Propojení cytogenetiky s molekulární genetikou	253
Výhledy genové terapie	253
Indukce fetálního hemoglobinu při thalassémii	254

18. Úloha vědy při průmyslovém využití rekombinantní DNA 258

Praktické možnosti použití rekombinantní DNA	258
Metody komerčního klonování genů	259
Lidský insulin z bakterií	259
Struktura lidského insulinu	259
Syntetické „geny“ pro insulin	260
Proinsulinová cDNA	262
Baktérie sekretující insulin	262
Klonování lidského růstového hormonu	262
Tvorba genu pro růstový hormon	263
Problém s methioninem	263
Různé typy interferonů	263
Vysoký stupeň exprese lidského interferonu α v <i>E. coli</i>	265
Klonování interferonu γ (imunitního interferonu)	266
Virové proteiny jako vakcíny	266
Klonování viru slintavky a kulhavky	266
Syntetické peptidové vakcíny	266
Vakcíny proti viru lidské hepatitidy B	267
Antigen hepatitidy B vytvořený klonováním genů	266

Chronologie poznání rekombinantní DNA 269

Dodatek A – Restriční enzymy 275

Dodatek B – Další enzymy používané při výzkumu rekombinantní DNA 281

Anglicko-český terminologický slovník 283

Česko-anglický terminologický slovník 285

Rejstřík 287