Abstrakt

Eukaryotické genomy jsou uspořádány do chromatinu, dynamického nukleoproteinového komplexu, ve kterém jsou nukleozomové jednotky propojeny úseky spojovací (linker) DNA. Délka těchto úseků je variabilní, kvantovaná a přísně regulovaná. Vzdálenost mezi nukleozomy významně ovlivňuje vyšší úrovně skládání chromatinu, jeho přístupnost, integritu DNA a potenciálně i interakce faktorů asociovaných s chromatinem. Přesné biologické důvody, proč eukaryota nastavují konkrétní vzorce vzdáleností, však zůstávají nepřezkoumané. Pro studium vlivu internukleozomální vzdálenosti na interakce proteinů v kontrolovaném biochemickém prostředí byla vytvořena knihovna DNA konstruktů založená na polohovací sekvenci Widom 601 s definovanou délkou linker DNA a kompatibilními klonovacími místy. Konstrukty byly navrženy tak, aby umožňovaly snadnou propagaci opakujících se jednotek a sestavení delších nukleozomálních řetězců. DNA fragmenty byly značeny biotinem pro imobilizaci a následně rekonstituovány s rekombinantními histonovými oktamery za vzniku nukleozomů s různými délkami linker DNA. Jako ověření funkčnosti byly dinukleozomy imobilizovány na streptavidinových magnetických kuličkách a inkubovány s jadernými extrakty v afinitní purifikaci. Zachycené proteiny byly analyzovány a poskytly předběžný náhled na profily vazby proteinů a rozdíly závislé na délce linker DNA. Tyto experimenty potvrzují použitelnost systému pro kvantitativní proteomickou analýzu s cílem mapovat chromatinové interaktory závislé na tomhle parametru. Modulární konstrukce DNA knihovny a strategie značení činí tento systém využitelným pro široké spektrum biochemických a strukturních metod. Představuje tak univerzální nástroj pro studium základů interakcí chromatinu s proteiny s kontrolou nad parametrem internukleozomální vzdálenosti.