

3.4 Elementos estructurales del cromosoma: la placa

3.4.1 La placa en el cromosoma

La placa es el elemento más característico de los cromosomas cuando presentan una morfología compacta (ver por ejemplo figura 3.3.3). Se ha encontrado placas en una gran cantidad de condiciones (ver tabla 3.4.1), siendo en los medios de fuerza iónica baja donde es menos probable encontrarlas. También, en las condiciones donde se efectuaron digestiones con RNAsa el número de placas es mínimo, si bien, el número de experimentos realizados con esta enzima no son lo suficientemente numerosos como para asegurar una relación entre la digestión con RNAsa y la desaparición de las placas.

En un principio pensamos que quizás las placas observadas eran una estructura artefactual causada por algún tipo determinado de condición, ya que a priori resulta difícil aceptar que la cromatina se pueda estructurar de una forma tan compacta y regular en el cromosoma. Sin embargo, son muy claras las evidencias encontradas en este trabajo experimental (ver secciones siguientes) a favor de esta posibilidad.

Una de las pruebas más evidentes es el hecho de haber encontrado placas en cromosomas sometidos a una gran diversidad de medios y condiciones (ver tabla 3.4.1). Esto descartaría la posibilidad de que estas estructuras fueran causadas por algún tipo muy concreto de condición o tratamiento.

La prueba más determinante de la existencia de placas de cromatina, es la evidente vinculación espacial que se observa entre estas estructuras y el cuerpo del cromosoma. Así, en la figura 3.4.1 podemos constatar claramente como el interior de las cromátidas está formado por placas. También en la figura 3.4.2 se aprecian estos elementos estructurales en el interior de los brazos cromosómicos, y en la figura 3.4.3 podemos ver cromosomas parcialmente desmoronados que muestran como las placas salen de su interior.

Tabla 3.4.1

Condiciones en las cuales se han obtenido placas

Agua. (1)

Agua. (2)^a

TEA-HCl 0.15 mM pH 7.5, KCl 0.8 mM, NaCl 0.2 mM, espermidina 0.005 mM, espermina 0.002 mM, EDTA- KOH 0.02 mM. (2)

Pipes 0.1 mM pH 7.2, EDTA 10 mM. (1)^a

Pipes 0.1 mM pH 7.4, EDTA 10 mM + Digestión con RNAsa (100 µg/ml). (1)^a

Pipes 0.1 mM pH 7.2. (1)^a

Pipes 0.1 mM pH 7.5 + Digestión con RNAsa (100 µg/ml). (1)^a

Pipes 0.1 mM pH 7.2, MgCl₂ 0.1 mM. (1)^a

Pipes 5 mM pH 7.2, Espermina 0.1 mM, espermidina 0.25 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 50%. (1)^a

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 5 mM, sacarosa 50%. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 0.5 mM, sacarosa 50%. (1)^a

TEAB 90 mM pH 8.6, MgCl₂ 0.5 mM. (1)^a

Acetato Sódico 55 mM, KCl 55 mM (0.8:4) pH 7.2. (1)

Citrato Sódico 26 mM pH 8. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 1.25 mM, sacarosa 50%.

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 1.7 mM, sacarosa 50%. (1)

TEAB 90 mM pH 8.6, MgCl₂ 1.7 mM. (1)^a

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50%.

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50%. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50% + digestión tripsina (1 mg/ml-1.25⁻⁵ µg/ml). (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM + digestión nucleasa micrococcal (2.4.10⁻²-2.4.10⁻⁶ µg/µl) en rejilla. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50-60% + digestión nucleasa micrococcal (2.7.10⁻²- 2.7.10⁻⁵ µg/µl) en solución. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM + digestión nucleasa micrococcal (7.9.10⁻²- 7.9.10⁻⁴ µg/µl) en rejilla. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, sacarosa 25% + digestión nucleasa micrococcal (7.9.10⁻³- 7.9.10⁻⁶ µg/µl) en solución. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 10 mM, sacarosa 50%. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 40 mM, sacarosa 50%. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 100 mM, sacarosa 50%. (1)

TEAB 90 mM pH 8.6, NaCl 80 mM. (1)

TEAB 90 mM pH 8.6, NaCl 80 mM, sacarosa 50%. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 30 mM. (1)

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM, CaCl₂ 20 mM. (1)^a

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 20 mM. (1)^a

TEA-HCl 1.5 mM pH 7.5, KCl 8 mM, NaCl 2 mM, espermidina 0.05 mM, espermina 0.02 mM, EDTA- KOH 0.2 mM. (2)

TEA-HCl 7 mM pH 7.5, KCl 40 mM, NaCl 10 mM, espermidina 0.25 mM, espermina 0.1 mM, EDTA- KOH 1 mM. **(2)^a**

TEA-HCl 15 mM pH 7.5, KCl 80 mM, NaCl 20 mM, espermidina 0.5 mM, espermina 0.2 mM, EDTA- KOH 2 mM, sacarosa 50%.

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, sacarosa 50%.

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM, sacarosa 50%.

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM. **(1)**

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM. **(3)^a**

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 20 mM. **(1)**

Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 20 mM. **(3)**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM + Agua. **(1)^b**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM + nucleasa micrococcal (7.9.10⁻³ µg/µl) en rejilla + Agua. **(1)^b**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50%.^a

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM + nucleasa micrococcal (7.9.10⁻³ µg/µl) en rejilla. **(4)**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM. **(4)**

Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 30 mM. **(4)**

Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 1.7 mM + nucleasa micrococcal (7.9.10⁻³ µg/µl) en rejilla. **(1)**

Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 3 mM. **(1)**

Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM. **(1)**

Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM + nucleasa micrococcal (7.9.10⁻³ µg/µl) en rejilla. **(1)**

Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 30 mM. **(1)**

Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 40 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 3 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 30 mM. **(1)**

Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 40 mM. **(1)**

Los cromosomas sometidos a esta serie de condiciones, previamente fueron obtenidos mediante un gradiente de sacarosa en **(1)** Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM. **(2)** TEA-HCl 15 mM pH 7.5, KCl 80 mM, NaCl 20 mM, espermidina 0.5 mM, espermina 0.2 mM, EDTA- KOH 2 mM, EGTA 0.5 mM. **(3)** Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM. **(4)** Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM. Ver más detalles en la sección 2.2.2.5.

^a Bajo estas condiciones la frecuencia de placas observadas era muy baja.

^b La muestra a continuación fue sometida durante 40 minutos a un cambio de medio en agua.

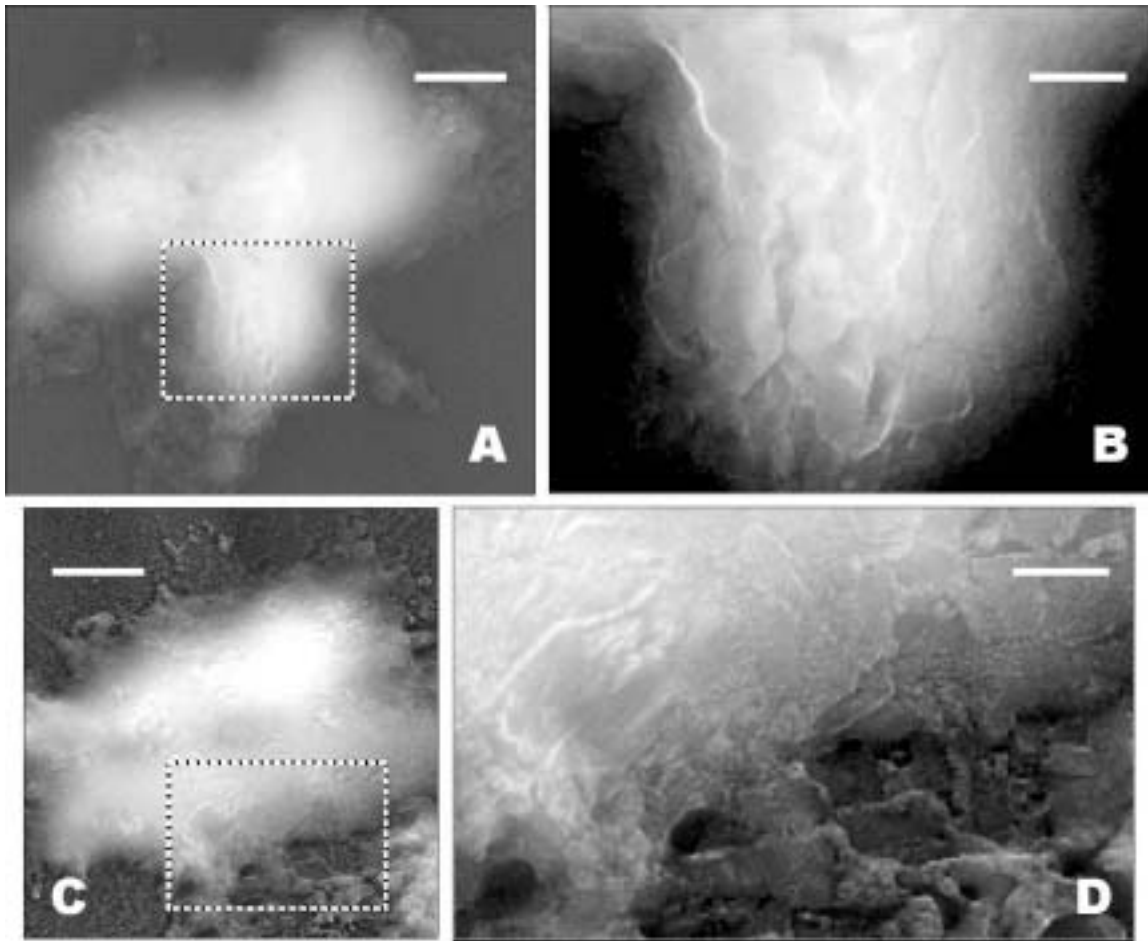


Figura 3.4.1. Cromosomas sometidos a un cambio de medio con Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 5 mM, sacarosa 50% (A), o con Pipes 0.1 mM pH 7.2 (C) (puntos 1.2 y 12.1 de la tabla 2.3.3, respectivamente). Los paneles B y D muestran una ampliación de la zona marcada en A y C. Los procesos de obtención, extensión, fijación y platinación de los cromosomas se realizaron según lo detallado en las secciones 2.2.2.5, 2.3.5.1, 2.3.8.1 y 2.3.9.1. En A y C, las barras representan 600 nm, mientras que en B y D equivalen a 200 nm.

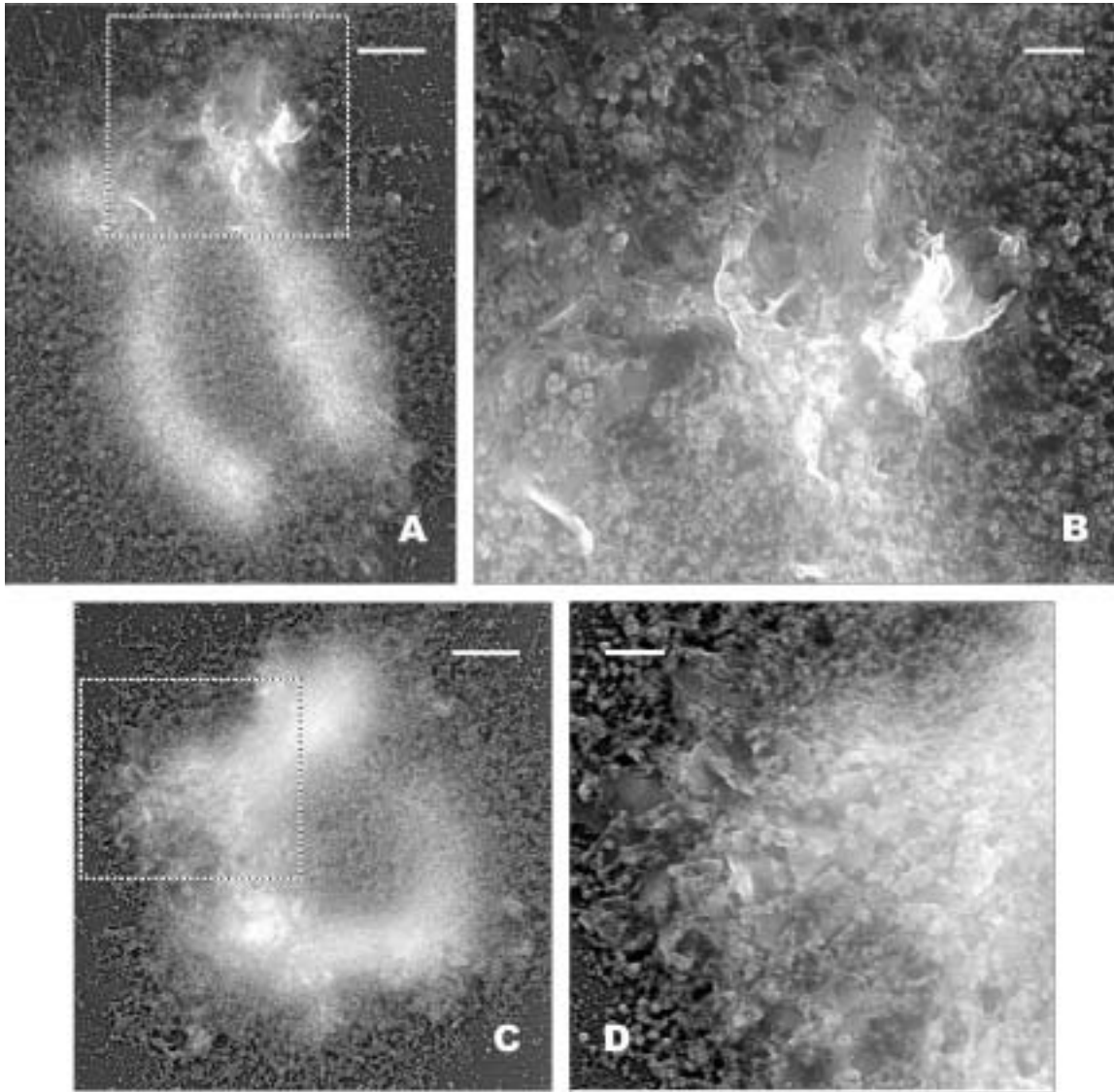


Figura 3.4.2. Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). A continuación, los cromosomas fueron sometidos a un cambio de medio con Pipes 5 mM mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM (punto 3.1 de la tabla 2.3.3). Finalmente fueron fijados (sección 2.3.8.1) y platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1). La barra representa 600 nm en A y C, mientras que en las ampliaciones B y D son 200 nm.

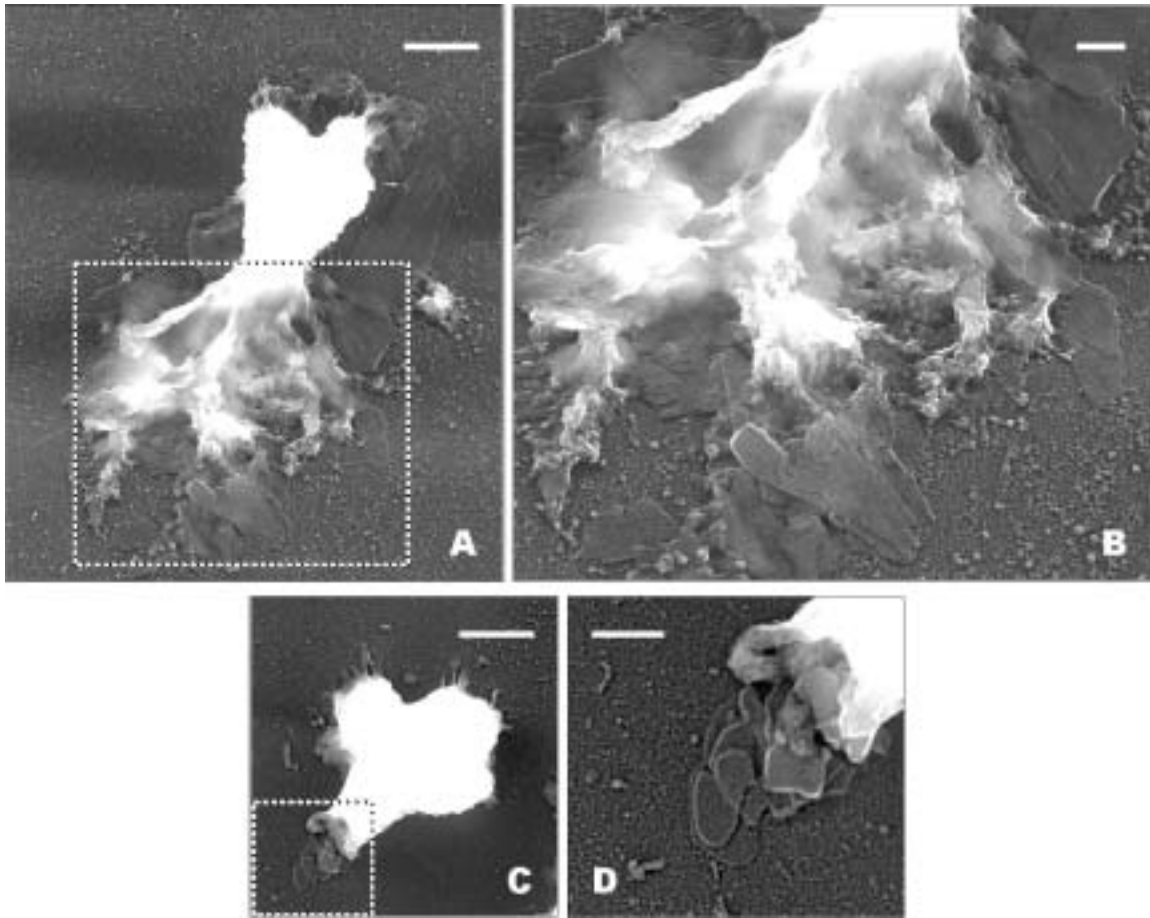


Figura 3.4.3. Cromosomas metafásicos obtenidos y tratados de igual modo que en la figura anterior. Sin embargo, en esta ocasión los cambios de medio fueron con Pipes 5 mM mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM (A) (punto 6.2 de la tabla 2.3.3), o con Pipes 5 mM mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50% (C) (punto 3.3 de la tabla 2.3.3). La barra representa 600 nm en A y C, mientras que en sus respectivas ampliaciones (B) y (D) son 200 nm.

3.4.2 Características estructurales de la placa

La caracterización de estos elementos estructurales se efectuó a partir de placas que no estaban tan entremezcladas con las cromátidas como las mostradas en la sección anterior, para así poder apreciar sus detalles estructurales con mayor facilidad (ver figuras 3.4.4, 3.4.5 y 3.4.6A). No obstante, las placas estudiadas que se presentan en esta tesis siempre estaban asociadas a los cromosomas para garantizar que se trata de estructuras cromatínicas vinculadas a la estructura biológica original.

Este elemento estructural presenta una gran regularidad en su parte superior, con una superficie extremadamente lisa que no deja apreciar ningún detalle en su interior, al nivel de resolución empleado en esta tesis, que nos pueda indicar el tipo de estructura que las compone (ver por ejemplo figura 3.4.6A). Con todo, en ocasiones encontramos placas en proceso de formación o desestructuración, con superficies rugosas de las cuales protuberan cuerpos de 30-40 nm (ver más adelante figuras 3.7.1, 3.7.2 y 3.7.3). Esto nos ha hecho pensar que la unidad base para la formación de las placas es el gránulo de 30-40 nm (ver sección 3.7).

Para obtener más datos estructurales fundamentales sobre estos elementos, se procedió a la platinación unidireccional de las placas con el fin de determinar el valor promedio de su altura. A partir de muestras preparadas en diversas condiciones se escogieron placas en las cuales fuera posible medir las sombras proyectadas (ver por ejemplo figuras 3.4.6B y C).

La tabla 3.4.2 indica la altura aparente de las placas seleccionadas calculada a través de la expresión (14) descrita en la sección 2.4.2.4. El valor promedio de todas las alturas aparentes calculadas fue de 6.7 ± 1.4 nm.

También se procedió a calcular el ángulo real de platinación por métodos gráficos y a continuación se calculó la altura real de las placas, mediante la fórmula (15) detallada en la sección 2.4.2.4. El promedio de todas las alturas reales halladas fue de 6.9 ± 1.7 nm (ver tabla 3.4.3). Finalmente, en esta última tabla también se presentan las alturas corregidas aparente y real, teniendo en cuenta el diámetro de las bolas de látex sin platinar: 6.2 y 6.3 nm, respectivamente.

Tabla 3.4.2

Determinación de la altura aparente de las placas cromosómicas platinadas unidireccionalmente (nm)												
Condición ^a	micrografía	n ^b	Bolas de látex			Placas						
			ϕ_{ex} ^c	L_{ex} ^d	$tg\alpha_{ap}$ ^e	L_{ex} ^f	h_{ap} ^g					
Agua	3458	2	73	168 ± 3	0.44 ± 0.01	20.0	8.8					
						20.0	8.8					
	3459	2	84 ± 1	186	0.45 ± 0.01	13.3	6.0					
						3461	2	83	191 ± 12	0.43 ± 0.03	13.3	5.7
											13.3	5.7
Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM	3538/39	7	96 ± 5	180 ± 9	0.53 ± 0.05	13.3	7.0					
						13.3	7.0					
						3565/66	4	84 ± 8	144 ± 13	0.58 ± 0.03	10.0	5.8
											10.0	5.8
											10.0	5.8
3570/71	7	92 ± 10	260 ± 40	0.36 ± 0.04	20.0	7.3						
					23.3	8.5						
					16.7	6.0						
					23.3	8.0						
					16.7	5.7						
3574/75	6	93 ± 8	270 ± 15	0.34 ± 0.03	20.0	6.6						
					13.3	4.6						
					3576/77	4	96 ± 5	320 ± 26	0.30 ± 0.02	20.0	6.0	
										13.3	4.0	
										13.3	4.0	
Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM, sacarosa 50%	3790/91	4	100	160 ± 27	0.64 ± 0.09	10.0	6.4					
						13.3	8.5					
						13.3	8.5					
						13.3	8.5					
						13.3	8.5					
Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM	3927	1	93	400	0.23	36.7	8.4					

Promedio de la altura aparente: 6.7 ± 1.4

^a Placas obtenidas a partir de cromosomas purificados en un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejillas por centrifugación (sección 2.3.5.1). Excepto en la micrografía 3790/91, que corresponde a la muestra de control, a continuación los cromosomas fueron sometidos a los cambios de medio especificados en esta tabla (sección 2.3.6). Finalmente las muestras fueron fijadas (sección 2.3.8.1) y platinadas unidireccionalmente (sección 2.3.9.1) a diferentes ángulos de inclinación.

^b Número de bolas de látex examinadas.

^c Promedio de los diámetros experimentales de las bolas de látex platinadas.

^d Promedio de las longitudes experimentales de las sombras provocadas por la deposición unidireccional del platino sobre las diversas bolas de látex. La medida se obtuvo desde la mitad de la bola hasta el final de la sombra.

^e Tangente del ángulo aparente. Cálculo realizado mediante la expresión matemática $\text{tg}\alpha_{\text{ap}} = \phi_{\text{ex}} / L_{\text{ex}}$.

^f Longitud experimental de la sombra de las diversas placas. En este caso, la medida se realizó desde la base de la placa hasta el final de la sombra, teniendo en cuenta la dirección del haz de platino.

^g Altura aparente de la placa. El cálculo se obtuvo aplicando la expresión matemática $h_{\text{ap}} = \text{tg}\alpha_{\text{ap}} \times L_{\text{ex. Placa}}$ [expresión (14) de la sección 2.4.2.4]

Tabla 3.4.3

Estimación de la altura de las placas a partir de los datos de la tabla anterior (nm)

ϕ bolas de látex 0.1 μm		ϕ bolas de látex 0.09 μm	
h_{ap} ^a	h_{real} ^b	h_{ap} ^c	h_{real} ^d
6.7 ± 1.4	6.9 ± 1.7	6.2	6.3

^a Promedio de la altura aparente.

^b Promedio de la altura real. Para este cálculo se utilizó la $\text{tg}\alpha_{\text{real}}$, la cual se determinó por métodos gráficos.

^c y ^d Altura de las placas corregida utilizando el diámetro de las bolas de látex sin platinar (90 nm). En **c** se aplicó el factor de corrección $h_{\text{ap}}' = 0.92 h_{\text{ap}}$ y en **d** el factor $h_{\text{real}}' = 0.91 h_{\text{real}}$. Para mas detalles ver expresiones (16) y (17) de la sección 2.4.2.4.

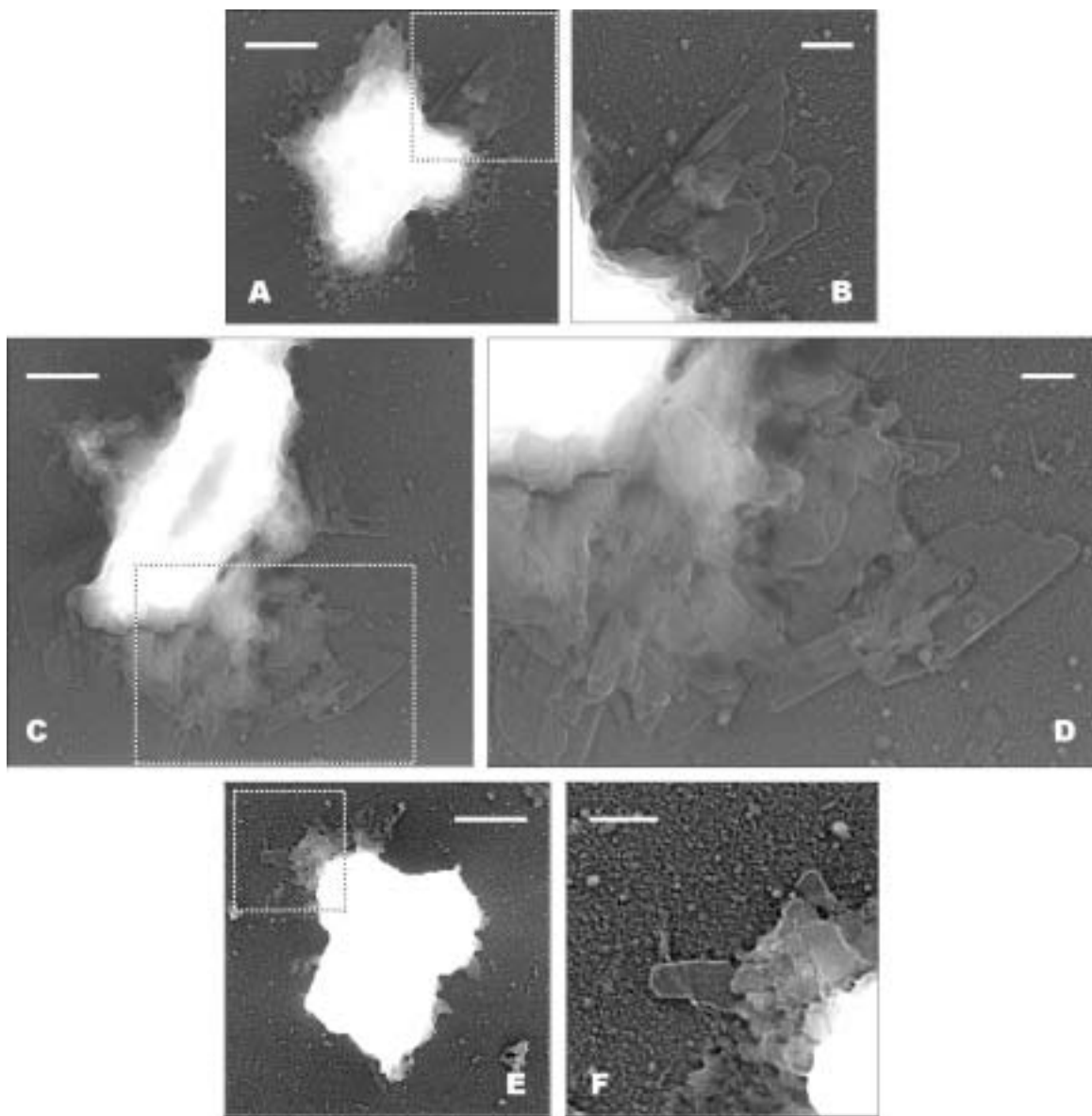


Figura 3.4.4. Cromosomas purificados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Seguidamente, los cromosomas fueron directamente depositados en rejilla (E) y en caso de A y C sometidos a un cambio de medio con tampón de poliaminas diluidas ½ en H₂O (A) y (C) (punto 7.0 de la tabla 2.3.3). La fijación de la muestra se efectuó según lo descrito en la sección 2.3.8.2 para A y C y 2.3.8.1 para E. La platinación se realizó del modo usual (sección 2.3.9.1). En A, C y E, las barras representan 600 nm, mientras que en las ampliaciones B, D y F equivalen a 200 nm.

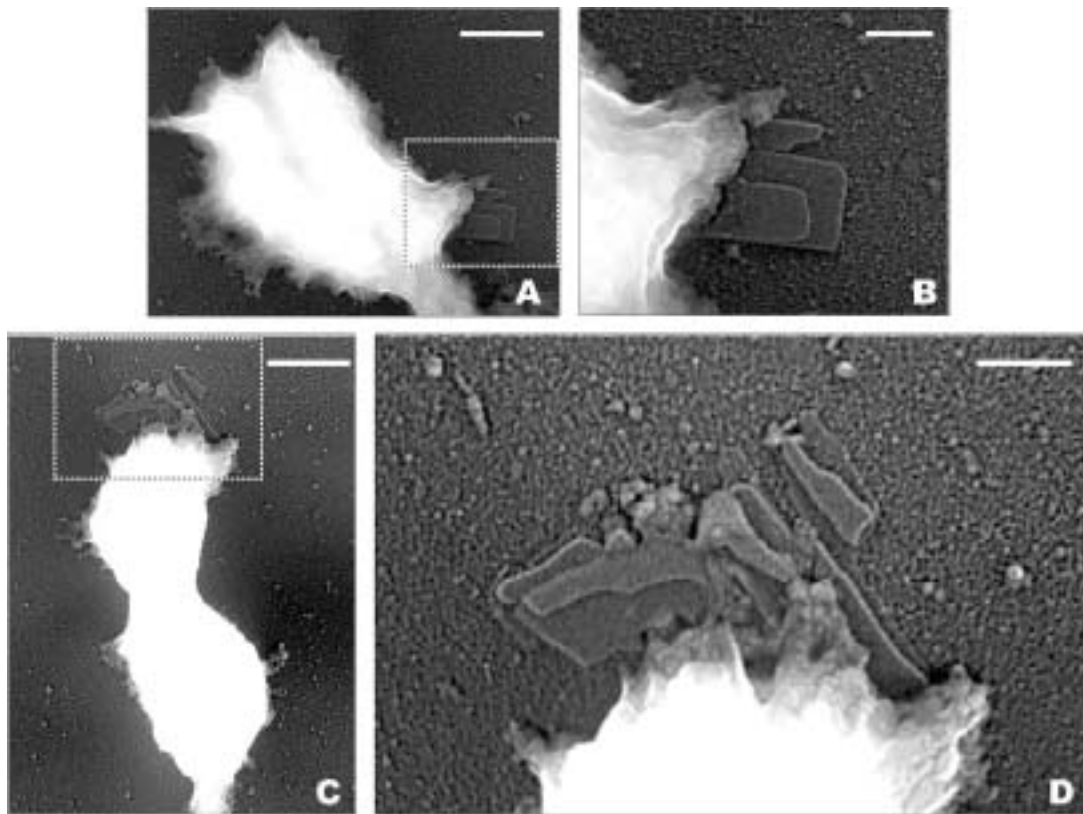


Figura 3.4.5. Cromosomas aislados, extendidos, fijados y platinados con el procedimiento habitual (secciones 2.2.2.5, 2.3.5.1, 2.3.8.1 y 2.3.9.1). El cambio de medio fue con TEAB 90 mM pH 8.6, NaCl 80 mM, sacarosa 50% (punto 2.1 de la tabla 2.3.3). La barra equivale 600 nm en **A** y **C**, mientras que en **B** y **D** son 200 nm.

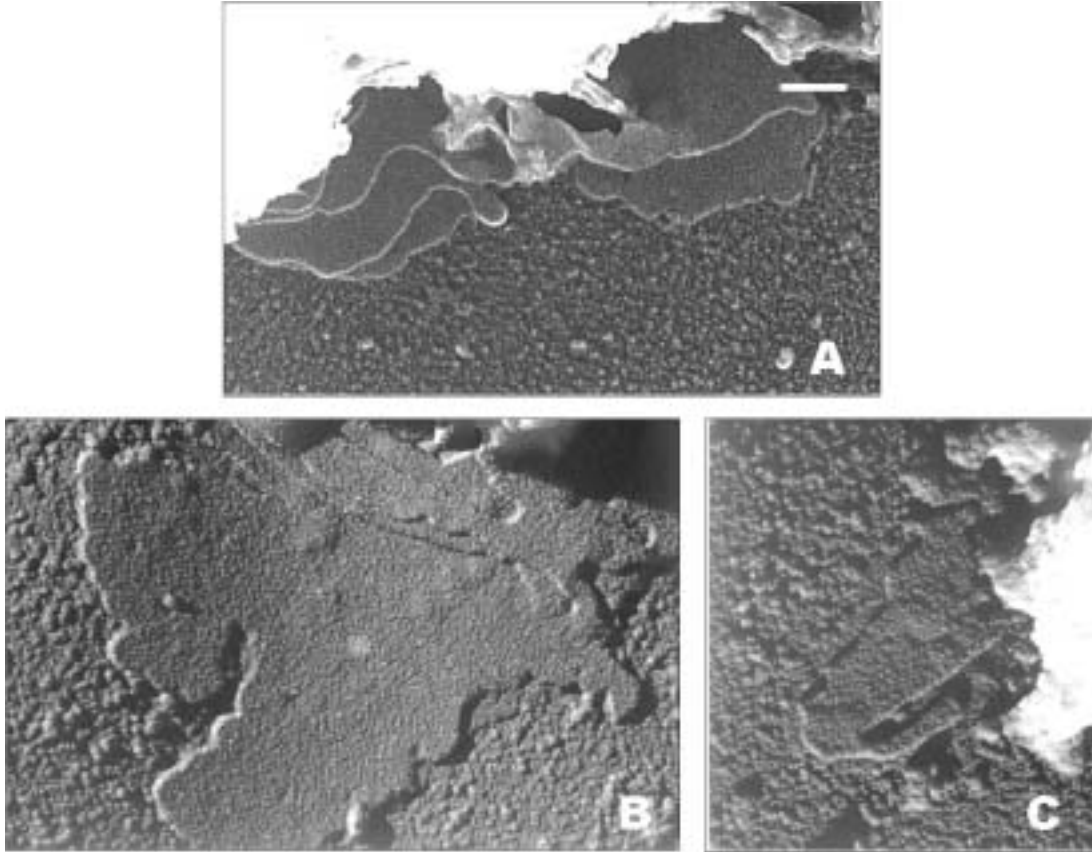


Figura 3.4.6. Cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) y depositados en rejilla por centrifugación (sección 2.3.5.1). A continuación, los cromosomas fueron sometidos a una digestión con nucleasa micrococcal en un medio con fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM (punto 3.1 de la tabla 2.3.6). Finalmente la muestra fue sometida a otro cambio de medio con H₂O durante 40 minutos (A). En B y C los cromosomas ya depositados en rejilla fueron sometidos a un cambio de medio en fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 40 mM (punto 11.9 de la tabla 2.3.3). La fijación en todos los paneles se realizó del modo usual (2.3.8.1). La platinación en A, fue por el método rotacional (sección 2.3.9.1), mientras que en B y C la tinción se efectuó unidireccionalmente con un ángulo de inclinación de 10° (sección 2.3.9.2). La barra representa 100 nm.

3.5 Elementos estructurales del cromosoma: el gránulo

3.5.1 Presencia del gránulo en el cromosoma

El gránulo de 30-40 nm es el elemento estructural más abundante en el cromosoma. Se halla presente en todas las condiciones analizadas en este trabajo, pero sobretodo en las condiciones donde la fuerza iónica es intermedia-baja (ver tabla 3.3.1). Es en estas condiciones es cuando podemos ver una gran abundancia de estas estructuras en el interior de las cromátidas (recordar por ejemplo figura 3.3.9) dando la sensación de que la unidad básica de la cual se compone el cromosoma es el cuerpo de 30-40 nm. También en la periferia de éstos podemos encontrar gran abundancia de los gránulos (incluso en condiciones compactantes) probablemente procedentes de fragmentos de cromatina desprendidos de las cromátidas metafásicas durante el proceso de preparación de las muestras para su observación al microscopio electrónico (ver por ejemplo figura 3.3.9, 3.5.1, 3.5.2 y 3.5.3).

Otra evidencia a favor del cuerpo de 30-40 nm como unidad fundamental en la formación de los cromosomas, se puede apreciar si nos fijamos en la composición del material protuberante de las cromátidas metafásicas (ver figura 3.5.4). Estas protuberancias están causadas probablemente por tensiones mecánicas durante la extensión de la muestra sobre la rejilla o por procesos de digestión con DNAsa o RNAsa que provocan la debilitación de la estructura cromosómica. En cualquier caso, el material extruido adopta una estructura formada por cuerpos de 30-40 nm que se apilan los unos sobre los otros, interaccionando de forma lateral entre si (figuras 3.5.4 y 3.5.5). La continuidad covalente del DNA no parece ser necesaria para mantener la estructura del cromosoma, como lo demuestra experimentos realizados con elevadas concentraciones de nucleasa micrococcal. En estos experimentos los cromosomas se mantienen íntegros, aunque el número de estructuras extruidas y de cuerpos de 30-40 nm en la periferia aumenta considerablemente (comparar figura 3.5.1A con B y C).

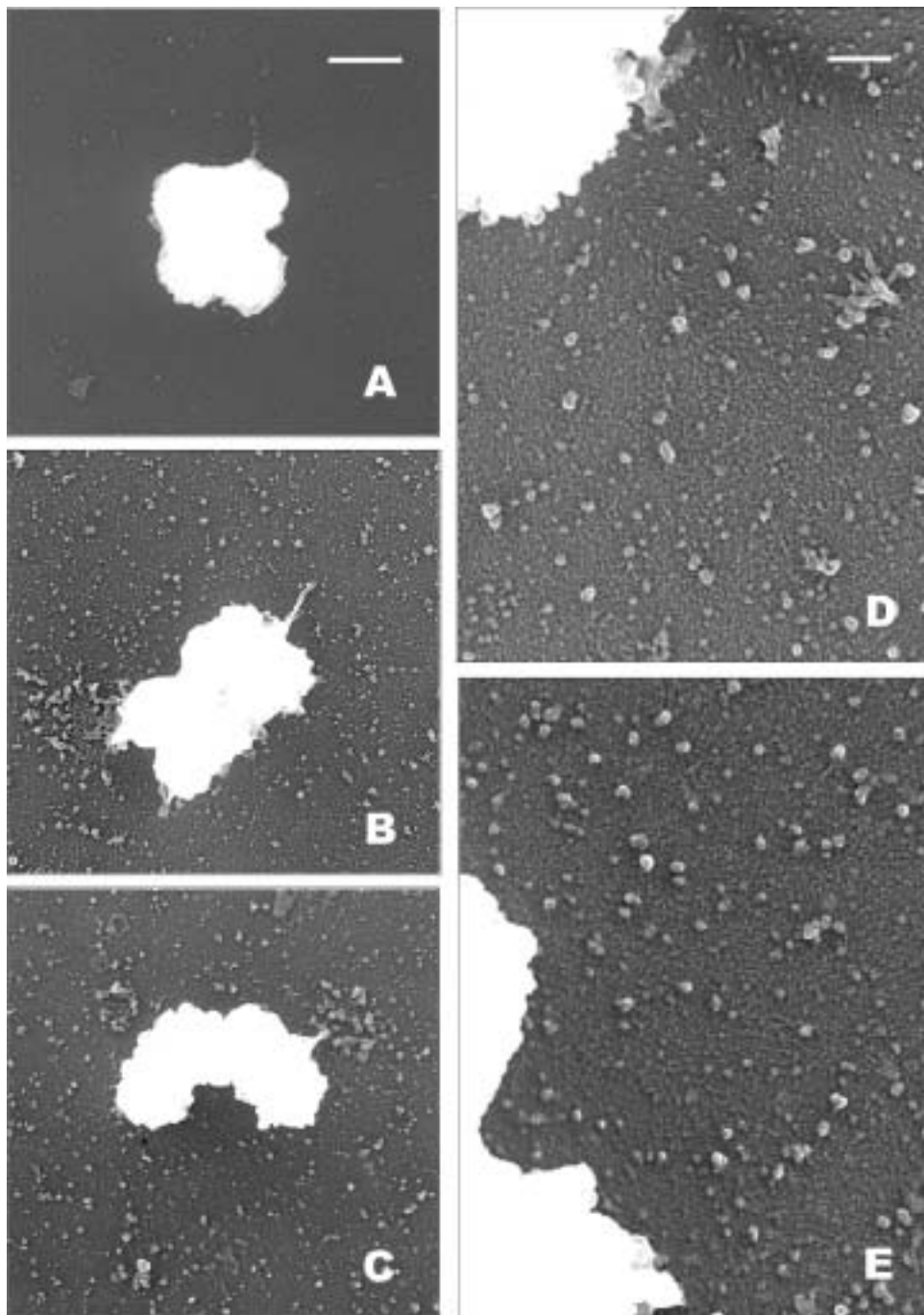


Figura 3.5.1. Las estructuras mostradas en esta figura proceden de cromosomas aislados mediante gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) (A) (B) y (D) o obtenidos en presencia de poliaminas (sección 2.2.2.2) (C) y (E). En todos los paneles a continuación la muestra fue depositada por centrifugación en rejilla (sección 2.3.5.1.) y, en caso de B y D, además los cromosomas fueron digeridos con nucleasa micrococcal en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 50% (punto 1.1 de la tabla 2.3.5). Finalmente los cromosomas fueron fijados [sección 2.3.8.1 (A), (B) y (D) o sección 2.3.8.2 (C) y (E)] y platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1). Barras: 600 nm en A, B y C; 200 nm en D y E.

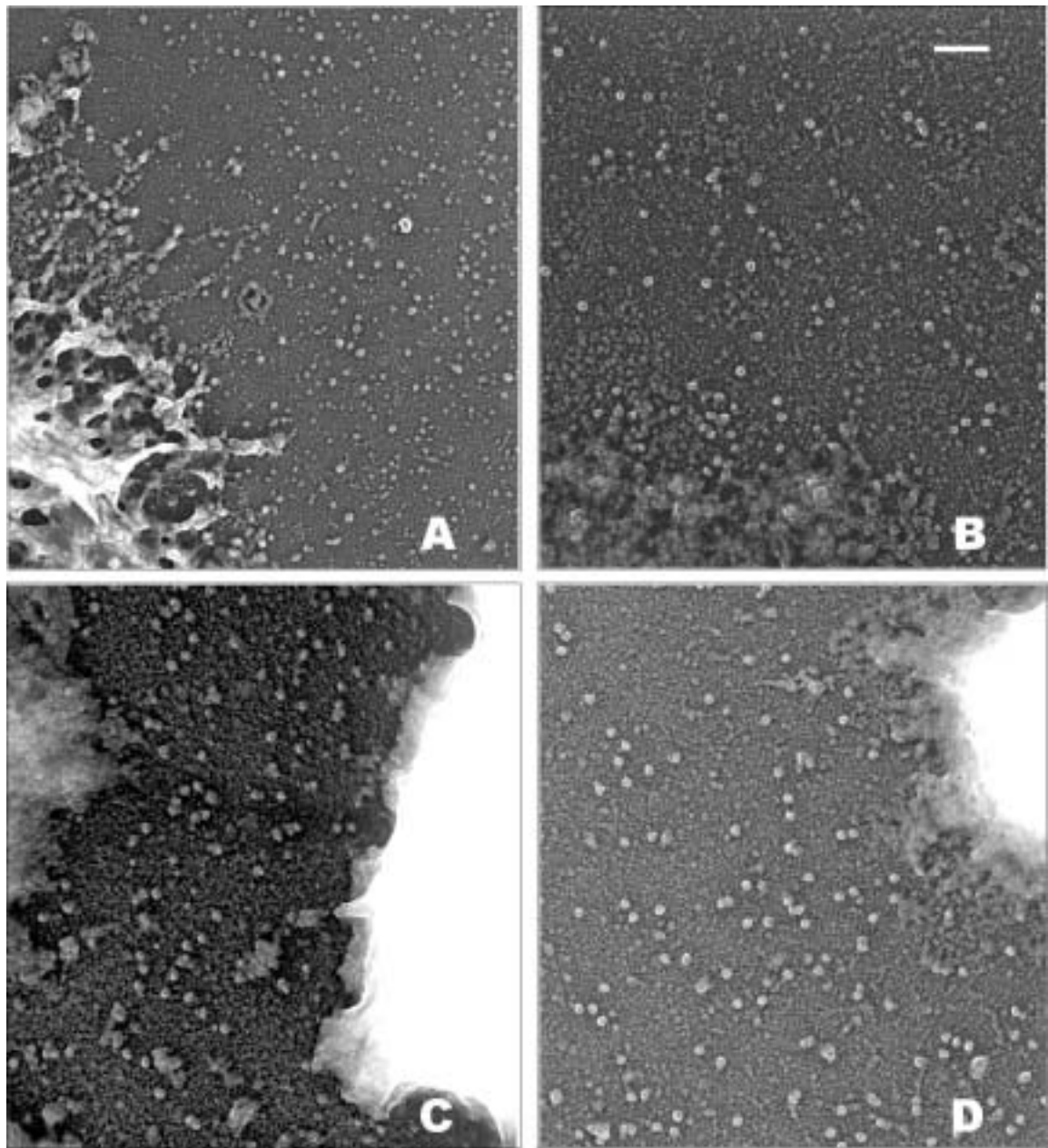


Figura 3.5.2. Cuerpos circulares de 30-40 nm de diámetro procedentes de cromosomas aislados mediante gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) (A) y (B) o obtenidos directamente en presencia de TeaKMC-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.3.2) (C) y (D). Seguidamente los cromosomas fueron depositados en rejilla (sección 2.3.5.1) y excepto en el panel C sometidos a los siguientes cambios de medio:

- Pipes 0.1 mM pH 7.2 (punto 5.0 de la tabla 2.3.3) (A).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 50% (punto 3.1 de la tabla 2.3.3) (B).
- TeaKMC 1.7 mM de MgCl₂ (sección 2.2.2.3.2) (D).

Finalmente fueron fijados (sección 2.3.8.1) y platinados (sección 2.3.9.1). La barra representa 200 nm

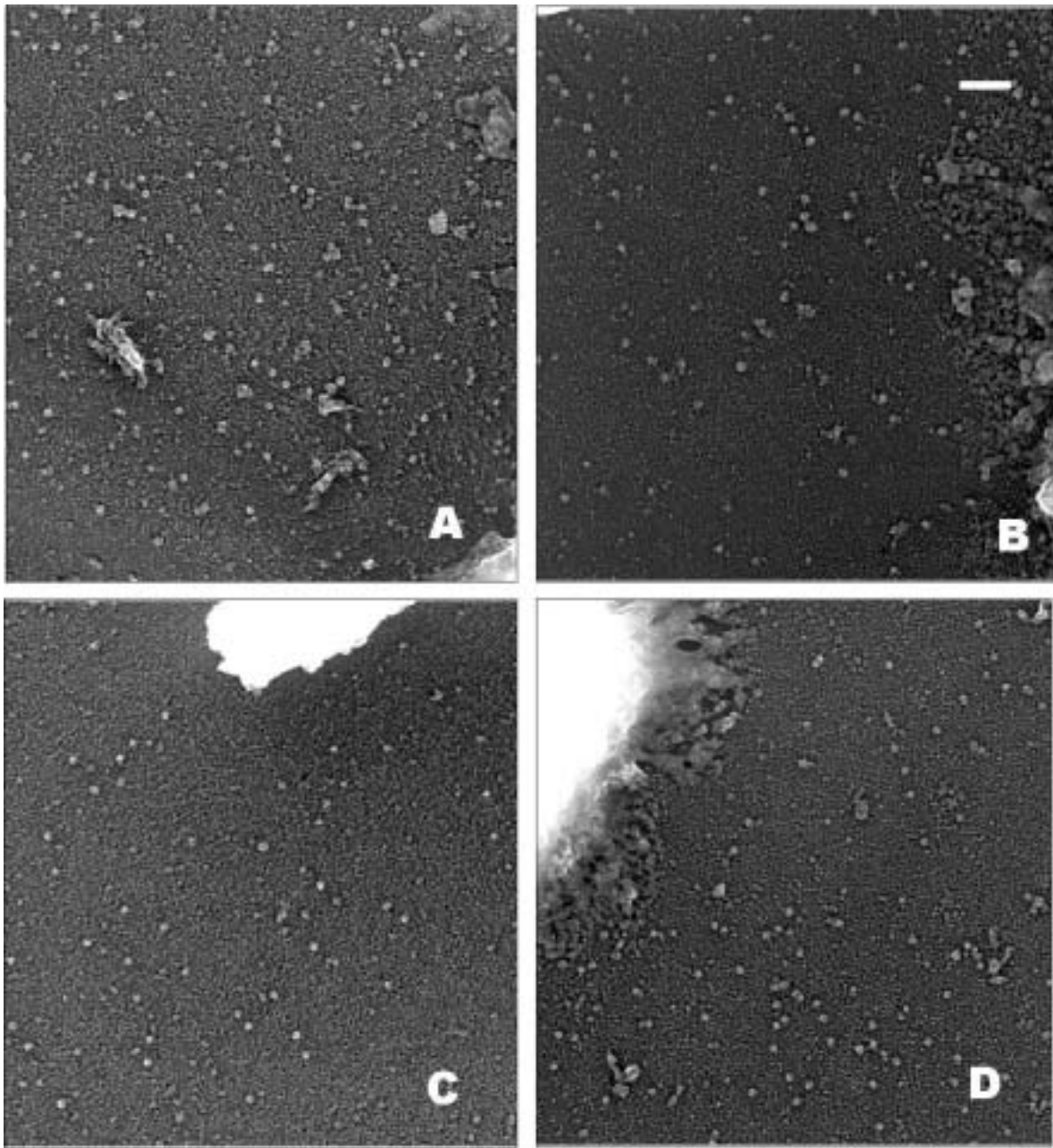


Figura 3.5.3. Los gránulos mostrados en esta figura proceden de cromosomas purificados mediante gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (**A**), (**B**) y (**D**) o en presencia de iones monovalentes (**C**) (sección 2.2.2.5). Excepto en el panel **C**, a continuación los cromosomas ya extendidos sobre rejilla (sección 2.3.5.1) fueron tratados con los siguientes medios:

- Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 1.7 mM (punto 10.1 de la tabla 2.3.3) (**A**).
- Acetato sódico 55 mM, KCl 55 mM (0.8:4) pH 7.2 (punto 5.4 de la tabla 2.3.3) (**B**).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM (punto 6.0 de la tabla 2.3.3) (**D**).

La fijación y platinación de la muestra se realizó de la forma habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1, respectivamente). La barra equivale a 200 nm.

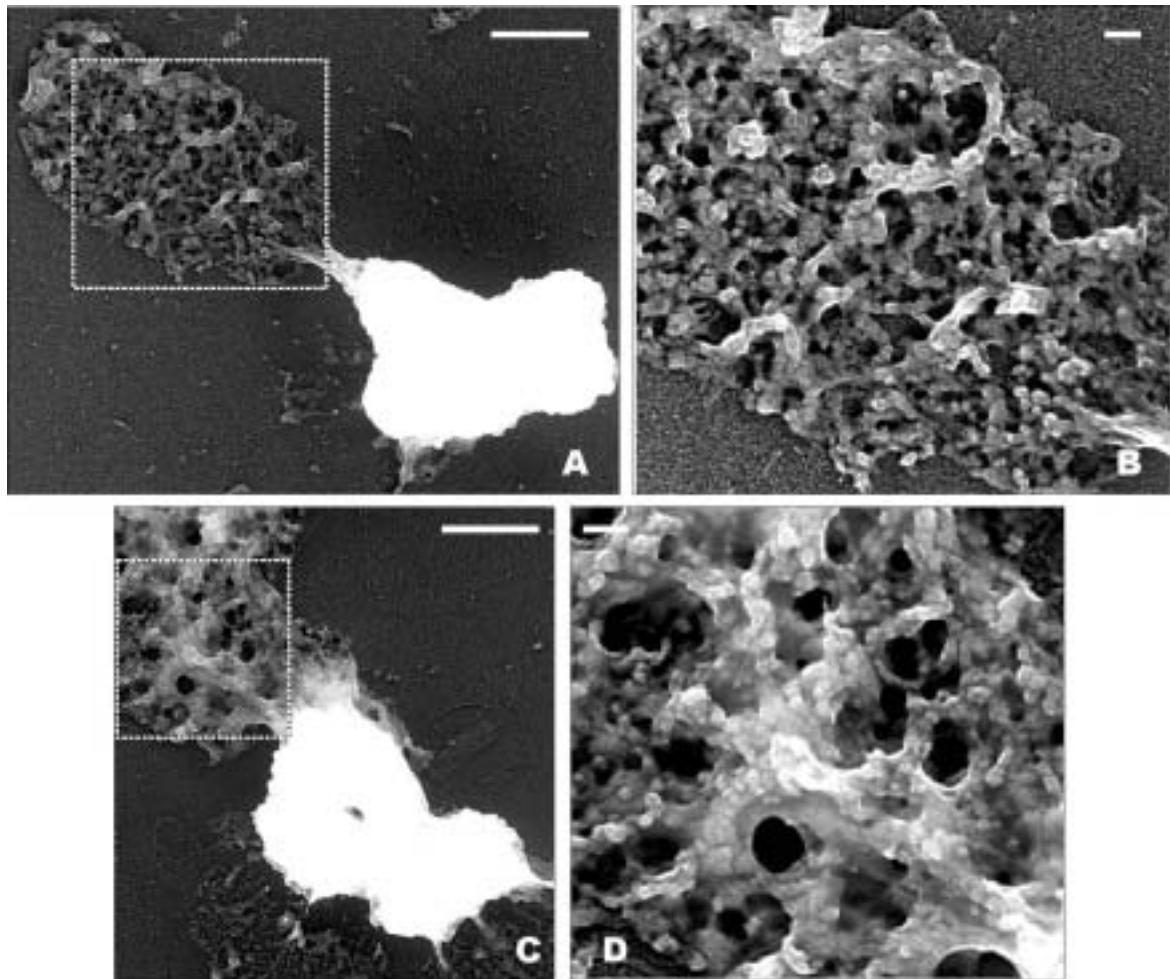


Figura 3.5.4. Las estructuras expuestas provienen de cromosomas obtenidos mediante gradiente de sacarosa en poliaminas (**A**) o en PME-MgCl₂ 5 mM (**B**) (sección 2.2.2.5). Los cromosomas, seguidamente fueron depositados por centrifugación (sección 2.3.5.1) y en caso del panel **C** tratados con Pipes 5 mM pH 7.2, espermina 0.1 mM, espermidina 0.25 mM (punto 8.0 de la tabla 2.3.3). Finalmente los cromosomas fueron fijados [sección 2.3.8.2 (**A**) o sección 2.3.8.1 (**B**)]. Los paneles **B** y **D** muestran una ampliación de la zona marcada en **A** y **C**. Barras: 600 nm en **A** y **C**; 100 nm en **B** y **D**.

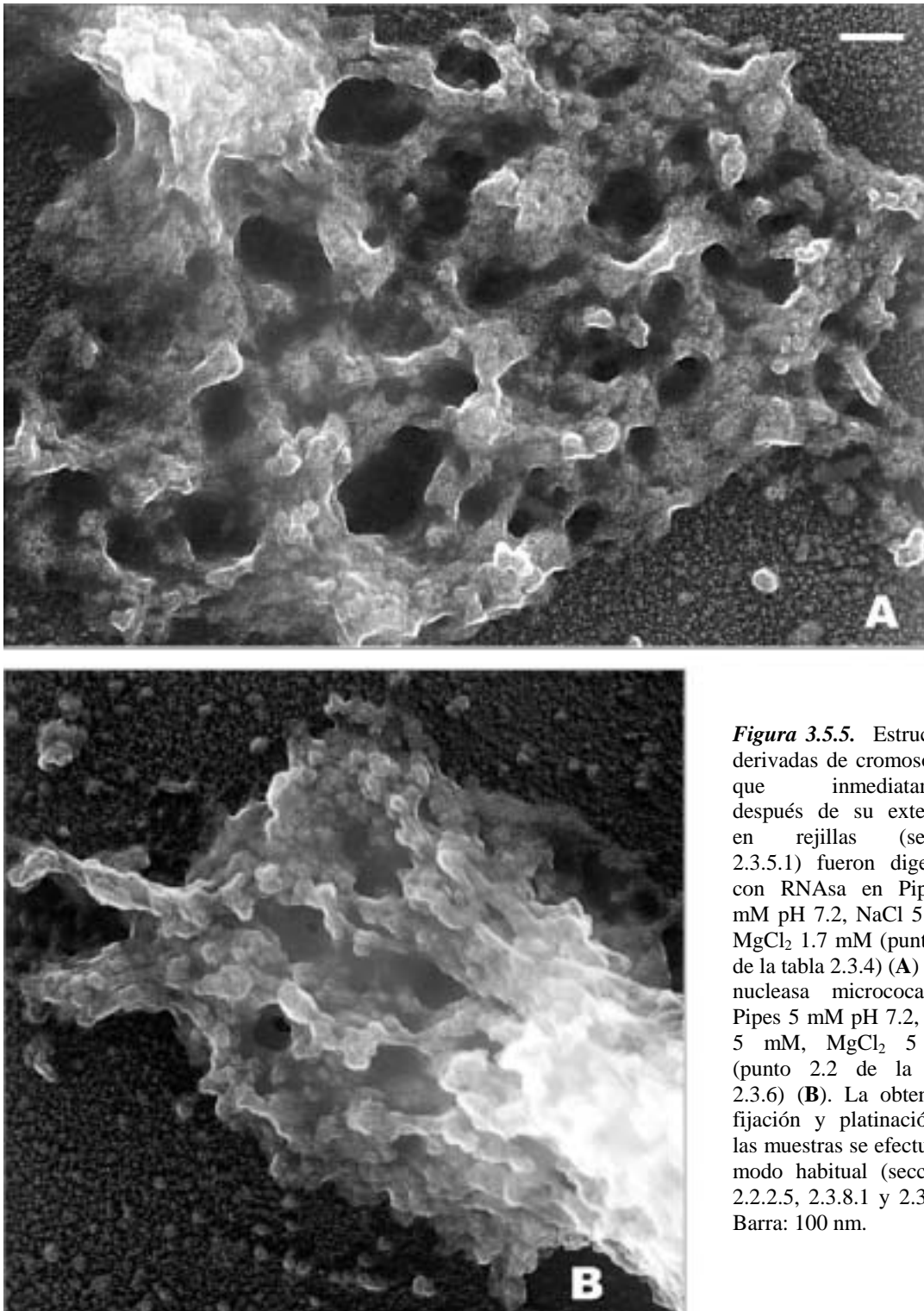


Figura 3.5.5. Estructuras derivadas de cromosomas, que inmediatamente después de su extensión en rejillas (sección 2.3.5.1) fueron digeridos con RNasa en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 1.7 mM (punto 1.0 de la tabla 2.3.4) (A) o con nucleasa micrococcal en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM (punto 2.2 de la tabla 2.3.6) (B). La obtención, fijación y platinación de las muestras se efectuó del modo habitual (secciones 2.2.2.5, 2.3.8.1 y 2.3.9.1). Barra: 100 nm.

El hecho de que los cromosomas mantengan una parte importante de su integridad física después de estos tratamientos tan drásticos, remarca el importante papel de la fuerza iónica en el mantenimiento de la estructura cromosómica.

3.5.2 Características estructurales del gránulo

Los corpúsculos circulares denominados gránulos en esta tesis, son unas estructuras circulares que frecuentemente tienen entre 30 y 40 nm de diámetro y un anillo periférico blanco muy intenso correspondiente a la depositación rotacional del platino (ver por ejemplo figuras 3.5.2 y 3.5.3).

Estas estructuras circulares ya habían sido observadas por microscopía electrónica por nuestro grupo con fragmentos de entre 10 y 30 nucleosomas de eritrocito de pollo (Bartolomé *et al.*, 1995). Nuestro laboratorio las describió como fibras de estructura cilíndrica que se colocan verticalmente sobre la rejilla del microscopio. Estas fibras cilíndricas son la base del modelo de solenoide interdigitado compacto, descrito ampliamente en la sección 1.2.3 de la Introducción.

3.6 Elementos estructurales del cromosoma: la fibra

El último elemento estructural descrito en este trabajo es la fibra. Estas se han clasificado en dos tipos diferentes en función de su diámetro: fibras gruesas (sección 3.6.1) y fibras delgadas (sección 3.6.2).

3.6.1 Fibras gruesas

3.6.1.1 Formación de fibras

Las fibras agrupadas en esta categoría corresponden a aquellas que tienen un diámetro que oscila entre los 100 y los 500 nm (ver por ejemplo figuras 3.6.4, 3.6.5 y 3.6.6). Esta gran variabilidad es debida, tal como veremos, a que las fibras son las propias cromátidas que se han ido deformando alargándose hasta alcanzar en ocasiones grandes

longitudes. En función del grado de deformación de la cromátida estas fibras son más o menos gruesas, así, en cromátidas muy deformadas y alargadas los diámetros observados son pequeños, y viceversa, en cromátidas poco deformadas los diámetros son considerablemente más grandes.

Esta capacidad de alargamiento de las cromátidas la observamos por primera vez en experimentos con microscopía óptica, en los cuales se había incubado a temperatura ambiente células metafásicas a diferentes tiempos. En general, las células incubadas durante tiempos cortos mostraban una perfecta integridad, con todos sus cromosomas en perfecto estado (ver por ejemplo 3.1.1C y D). Sin embargo, algunas de las células empezaban ya a degradarse y sus cromosomas tendían a deformarse (figura 3.6.1).

Al incrementar el tiempo de incubación, la mayoría de las células perdían su integridad, quedando los cromosomas esparcidos por el medio. En estas condiciones, las cromátidas mostraban evidentes señales de alargamiento (figura 3.6.2).

Finalmente, después de una larga exposición de los cromosomas al medio, éstos se habían fibrilado totalmente perdiendo toda similitud con la forma original de los cromosomas metafásicos (figura 3.6.3).

La formación de fibras gruesas a partir de cromátidas también la hemos observado a través de la microscopía electrónica. La presencia de este tipo de fibras es totalmente independiente de las condiciones iónicas del medio, ya que las encontramos tanto en medios compactos como en medios de fuerza iónica baja. Esto nos permite concluir que la formación de estas fibras está inducida principalmente por tensiones mecánicas durante los diferentes procesos de preparación de las muestras para microscopía electrónica (centrifugaciones, pipeteados, vorteados, etc).

Probablemente, debido a la plasticidad de las cromátidas, cuando dos o más cromosomas quedan unidos entre sí, tienden a ir en direcciones diferentes, provocando de esta manera la formación de estas fibras.

Normalmente cuando observamos la aparición de una fibra gruesa, como mínimo hay implicados dos cromosomas. En la figura 3.6.4 se ha intentado mostrar la secuencia de formación de estas fibras, a partir de diferentes micrografías que muestran la presencia de este tipo de estructuras. Así, en la figura 3.6.4A, B y C se observan varias parejas de cromosomas unidos antes de formarse las fibras gruesas. En los paneles D, E y F, puede

verse ejemplos de cromátidas que empiezan a alargarse gracias a su plasticidad. Finalmente en **G**, **H** y **E**, los ejemplos corresponden a fibras que son tan largas que prácticamente ya no distinguimos los cromosomas.

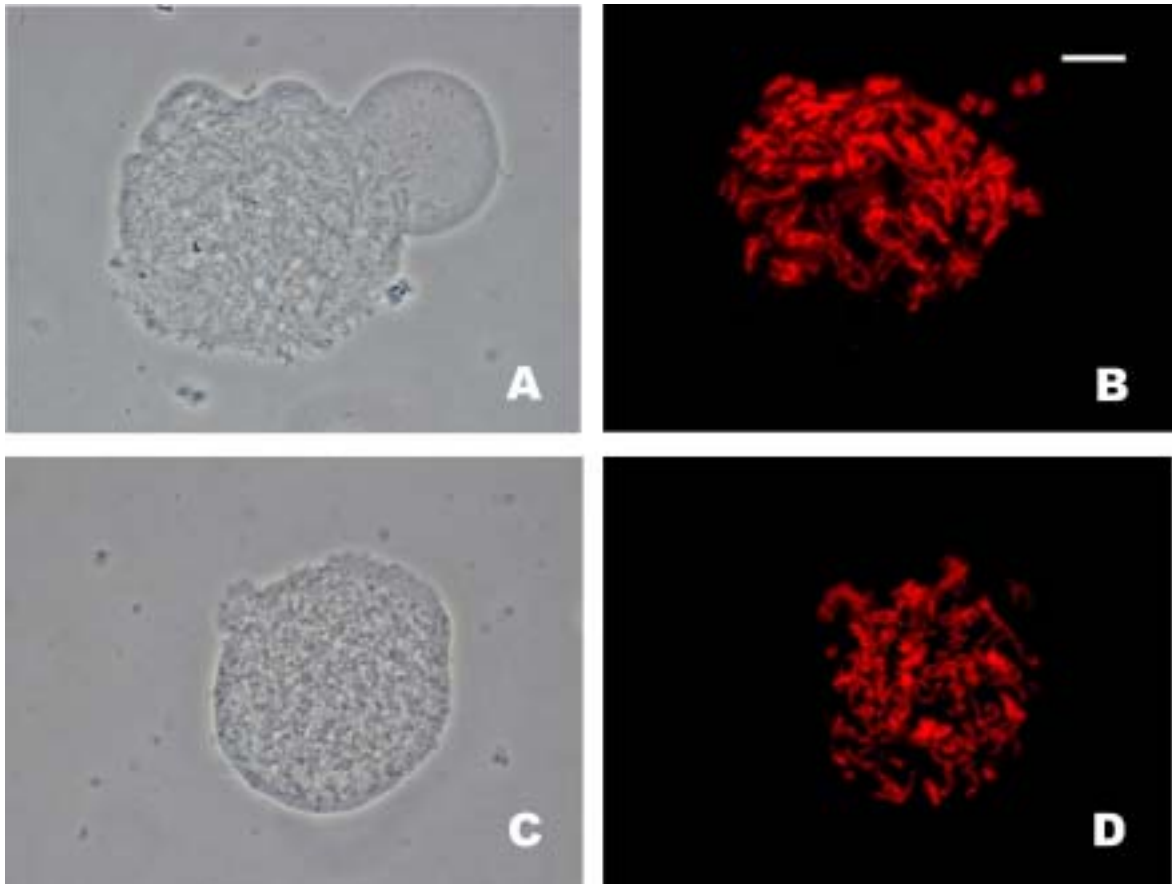


Figura 3.6.1. Células resuspendidas en un medio de poliaminas antes de proceder a la rotura de sus membranas (sección 2.2.2.2). La tinción de las células se efectuó con yoduro de propidio (sección 2.2.3.1). Las muestras se observaron por microscopía de contraste de fases (**A**) y (**C**) y de fluorescencia (**B**) y (**D**). Barra: 10 μm .

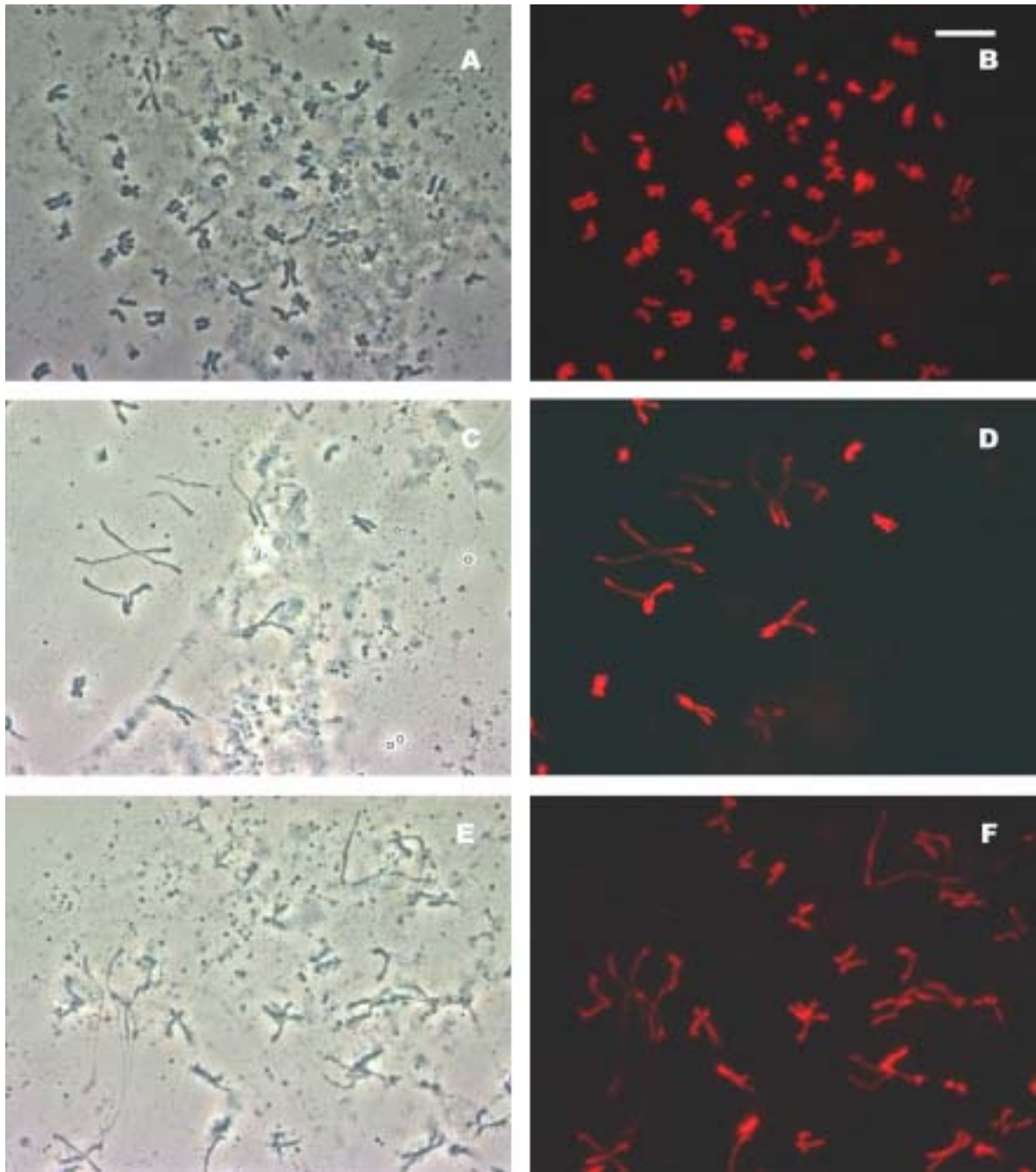


Figura 3.6.2. Cromosomas desestructurados procedentes de células resuspendidas directamente en TeaKMC-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.3.2). En caso de los paneles **A** y **B** las células estuvieron resuspendidas durante 15 minutos en el tampón indicado, mientras que en el resto de los paneles el tiempo fue de 5.30h. Previamente a la observación microscópica, las células fueron teñidas con yoduro de propidio (sección 2.2.3.1). La observación se efectuó por microscopía óptica de contraste de fases (**A**), (**C**) y (**E**) y de fluorescencia (**B**), (**D**) y (**F**). Barra: 10 μ m.

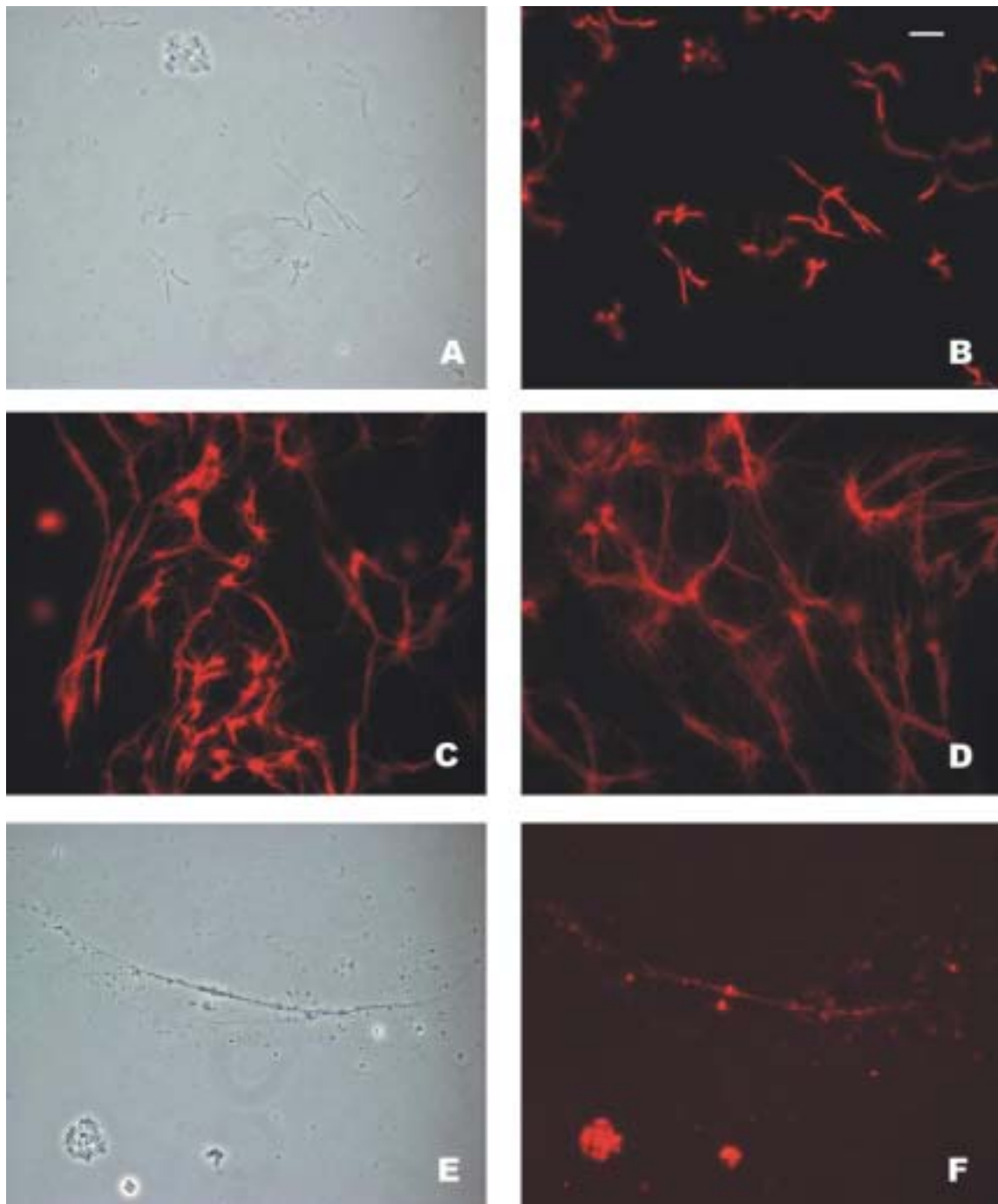


Figura 3.6.3. Cromosomas totalmente desestructurados después de una larga incubación de las células metafásicas en tampón TeaKMC-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.3.2) (A), (B), (E) y (D) o en poliaminas (sección 2.2.2.2) (C) y (D). Después de teñir la muestra con yoduro de propidio, los cromosomas fueron observados por microscopía óptica de contraste de fases (A) y (E) y de fluorescencia (B), (C), (D) y (F). Barra: 10 μm.

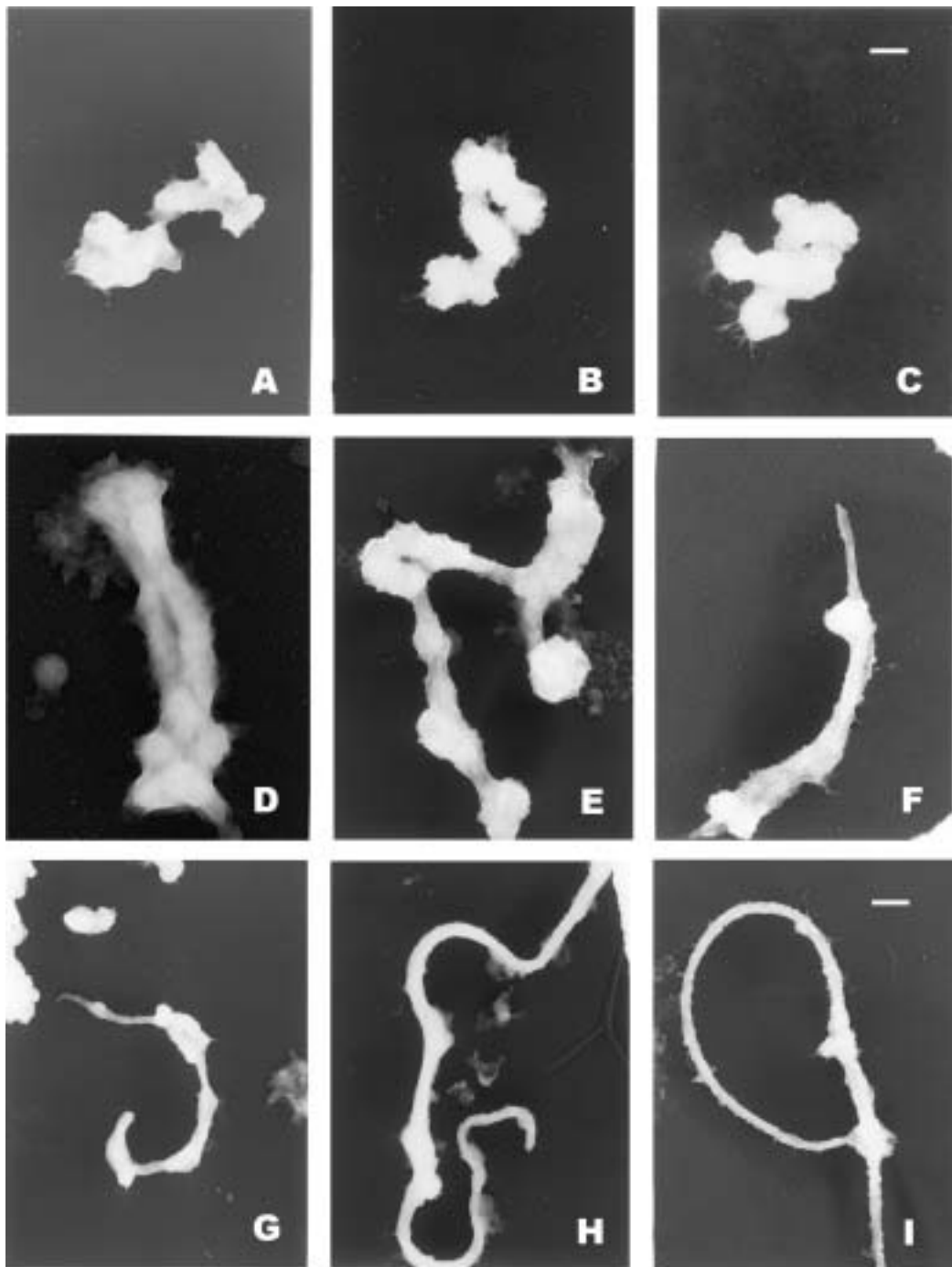


Figura 3.6.4. Cromosomas metafásicos aislados mediante un gradiente de sacarosa escalonado en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) (A), (B), (C), (E), (F), (G), (H) y (I). En el panel D, los cromosomas fueron obtenidos en TeaBM-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.4). A continuación, las muestras fueron extendidas en rejilla (sección 2.3.5.1), fijadas (secciones 2.3.8.2 para el panel D y 2.3.8.1 para el resto) y platinados rotacionalmente (sección 2.3.9.1). Barras: A, B, C, D, E y F, 600 nm; G, H y I, 1200 nm.

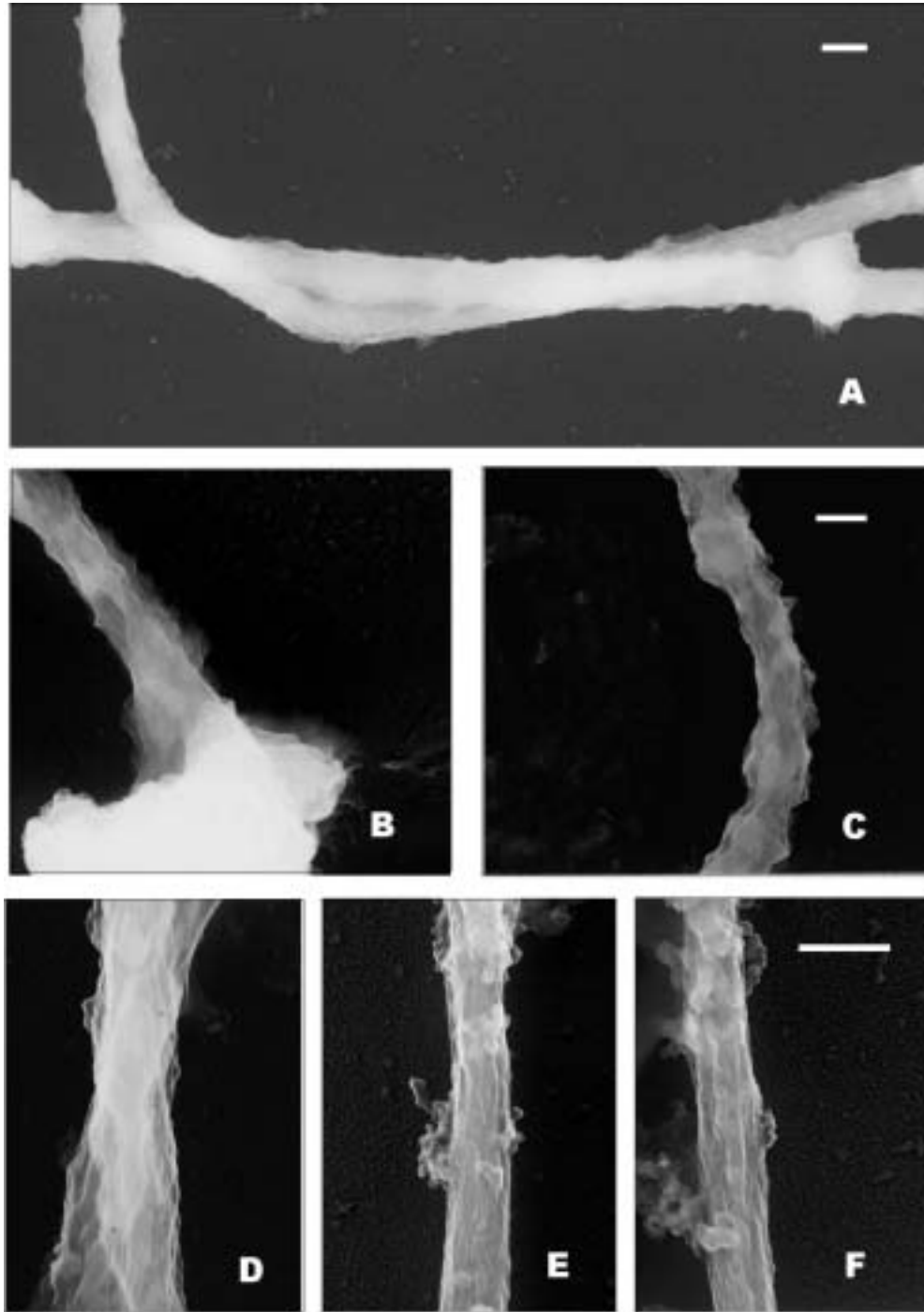
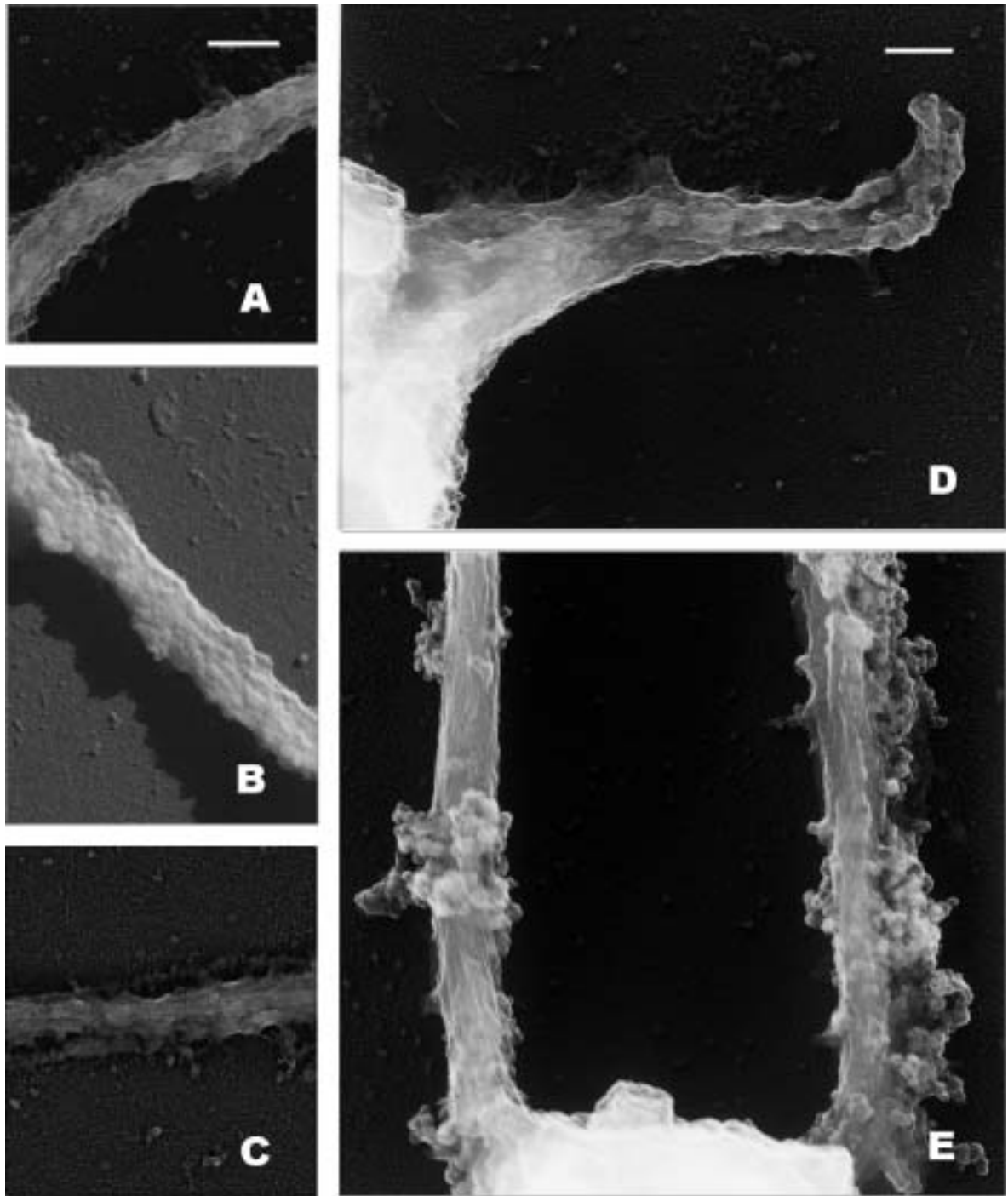
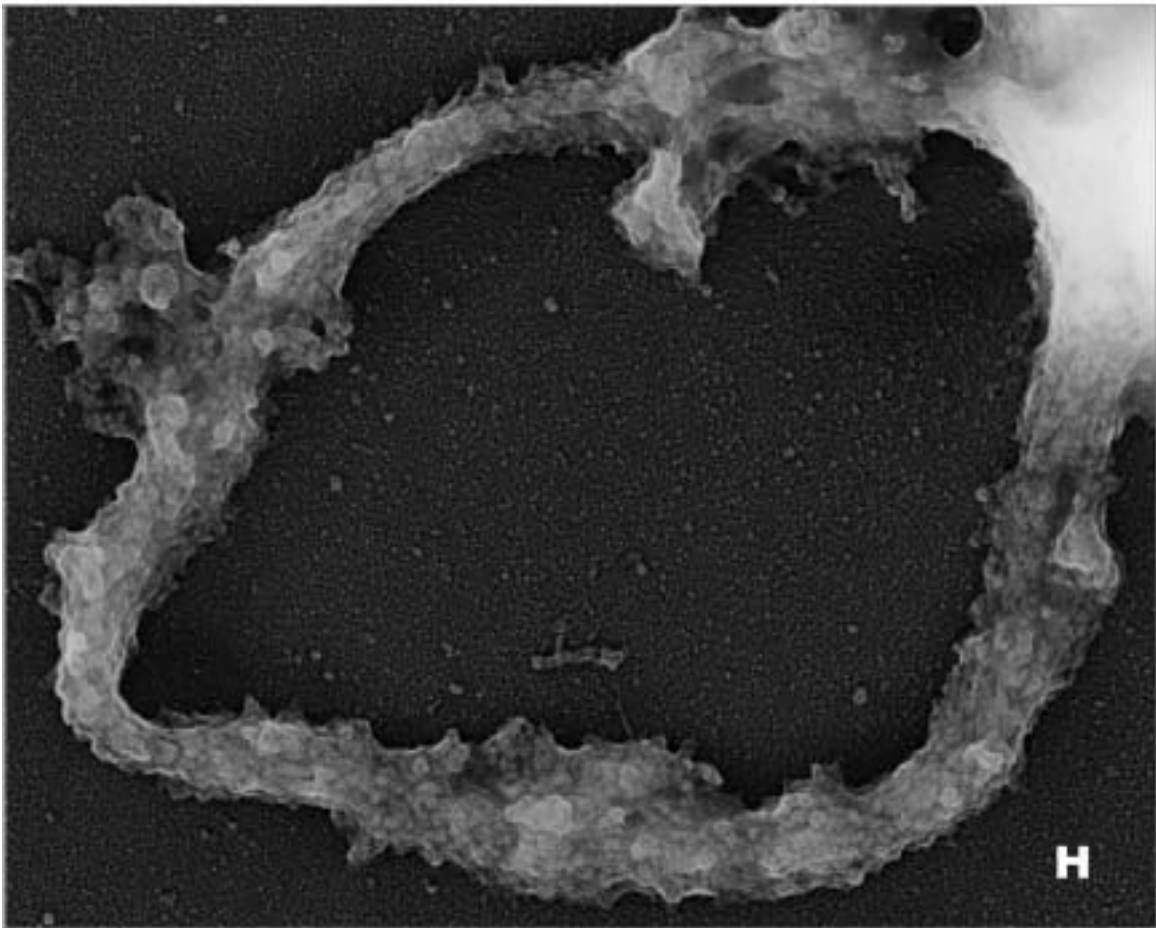
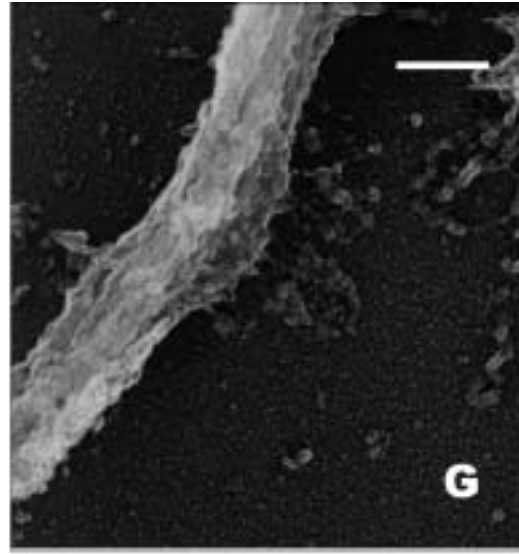
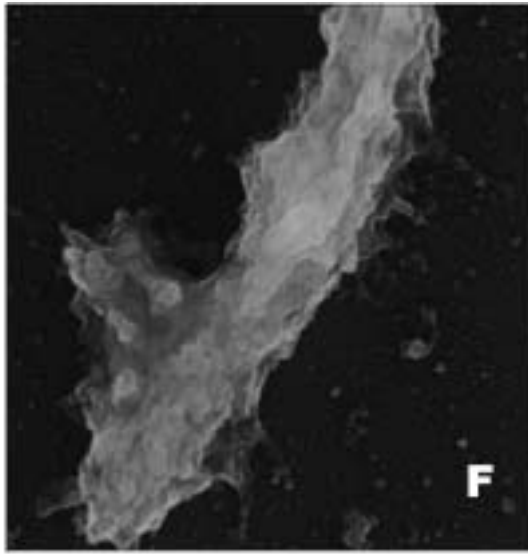


Figura 3.6.5. Fibras gruesas procedentes de cromosomas metafásicos aislados mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Los cromosomas fueron extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1). La muestra del panel **B** fue digerida en 0.2 mg/ml de tripsina (sección 2.3.7.1), y los cromosomas de los paneles **E** y **F** sometidos a un cambio de medio en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 1.7 mM (punto 6.1 de la tabla 2.3.3). En el resto de paneles no se efectuó ningún tratamiento posterior después de la extensión de la muestra en la rejilla. Finalmente las muestras fueron fijadas y platinadas de la manera habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra representa 400 nm en **A**, 300 nm en **B** y **C**, y 250 nm en **D**, **E** y **F**.



El pie de esta figura está en la página 157.



El pie de esta figura está en la página 157.

Figura 3.6.6. Fibras de grandes diámetros originarias de cromosomas metafásicos purificados a través de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Después de extender la muestra sobre la rejilla (sección 2.3.5.1) los cromosomas fueron tratados con los siguientes medios:

- Pipes 0.1 mM pH 7.2 (punto 5.0 de la tabla 2.3.3) (**A**) y (**F**).
- Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 40 mM (punto 11.4 de la tabla 2.3.3) (**B**).
- Pipes 0.1 mM pH 7.2, MgCl₂ 0.1 mM (punto 5.1 de la tabla 2.3.3) (**C**) y (**G**).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 1.7 mM (punto 6.1 de la tabla 2.3.3) (**E**).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 20 mM (punto 6.6 de la tabla 2.3.3) (**H**).

Finalmente los cromosomas fueron fijados y platinados de la manera habitual, excepto en el panel **B** en el que la platinación fue unidireccional (sección 2.3.9.2). Barras: 300 nm en **A**, **B** y **C**; 200 nm en **D** y **E**; 250 nm en **F**, **G** y **H**.

3.6.1.2 Características estructurales

Las fibras gruesas están formadas por los dos elementos estructurales descritos más arriba: el gránulo y la placa.

Cuando los cromosomas están en medios estructurantes con fuerzas iónicas elevadas, las fibras gruesas producidas por las cromátidas están compuestas por placas escalonadas (ver figura 3.6.5). El elemento estructural placa le confiere a la fibra un aspecto muy compacto y denso. En cambio, al disminuir la fuerza iónica, el número de placas observadas en el interior de las fibras va disminuyendo, a la vez que los cuerpos de 30-40 nm aparecen como un elemento estructural abundante. En la figura 3.6.6, se puede apreciar como el interior de las fibras gruesas está compuesto en su mayoría de los gránulos, aunque en algunas fibras puede observarse también placas.

3.6.2 Fibras delgadas

3.6.2.1 Presencia de las fibras delgadas en el cromosoma

En esta sección están agrupadas las fibras cuyos diámetros están comprendidos entre los 30 y 40 nm (ver por ejemplo figuras 3.6.7, 3.6.8, 3.6.9, 3.6.10 y 3.6.11). Estas fibras las hemos observado en muchos medios, siendo más frecuentes en los medios de fuerza iónica baja. Sin embargo, únicamente cuando la fuerza iónica es extremadamente baja, la

presencia de fibras delgadas es mayoritaria respecto a los otros dos elementos estructurales básicos (tabla 3.4.1). En estas condiciones también podemos observar la aparición de un gran número de nucleosomas, muchas veces formando lazos desde el interior del cromosoma (ver figura 3.6.9). En condiciones completamente distintas, al incrementar considerablemente la fuerza iónica en el medio, añadiendo iones Mg^{2+} hasta 100 mM, también se produce la aparición de fibras delgadas (ver figura 3.6.11D y E). A esta concentración tan elevada, el ion divalente pasa a tener un papel desestructurante. Por tanto podemos concluir, que al igual que la placa y el gránulo, la aparición del elemento fibra es dependiente de las condiciones iónicas del medio.

3.6.2.2 Características estructurales de la fibra delgada

La observación de las figuras 3.6.7, 3.6.8, 3.6.9, 3.6.10 y 3.6.11 indica que las fibras delgadas de cromatina están compuestas por una sucesión de cuerpos de 30-40 nm colocados de una forma irregular, a lo largo de toda la extensión de la fibra. Estos cuerpos, correspondientes a los gránulos descritos en la sección 3.5, se apilan los unos sobre los otros mediante interacciones cabeza-cola, formando fibras de considerable longitud, tal como puede verse en particular en la figura 3.6.7. Estos resultados junto con los presentados en las secciones precedentes permiten sugerir que en condiciones iónicas de baja concentración, las interacciones electrostáticas laterales entre cuerpos de 30-40 nm, no son tan estables como las de apilamiento, por lo que la formación de fibras se ve más favorecida que la formación de estructuras más extendidas basadas en interacciones laterales entre estos elementos.

La estructura de estas fibras de 30-40 nm es muy irregular. Puede apreciarse la existencia de gránulos colocados frontalmente o de perfil (ver por ejemplo figura 3.6.7, 3.6.9 y 3.6.11A). También en ocasiones podemos ver pequeñas constricciones entre gránulo y gránulo que probablemente corresponden a DNA (ver por ejemplo figuras 3.6.8 y 3.6.11B y C).

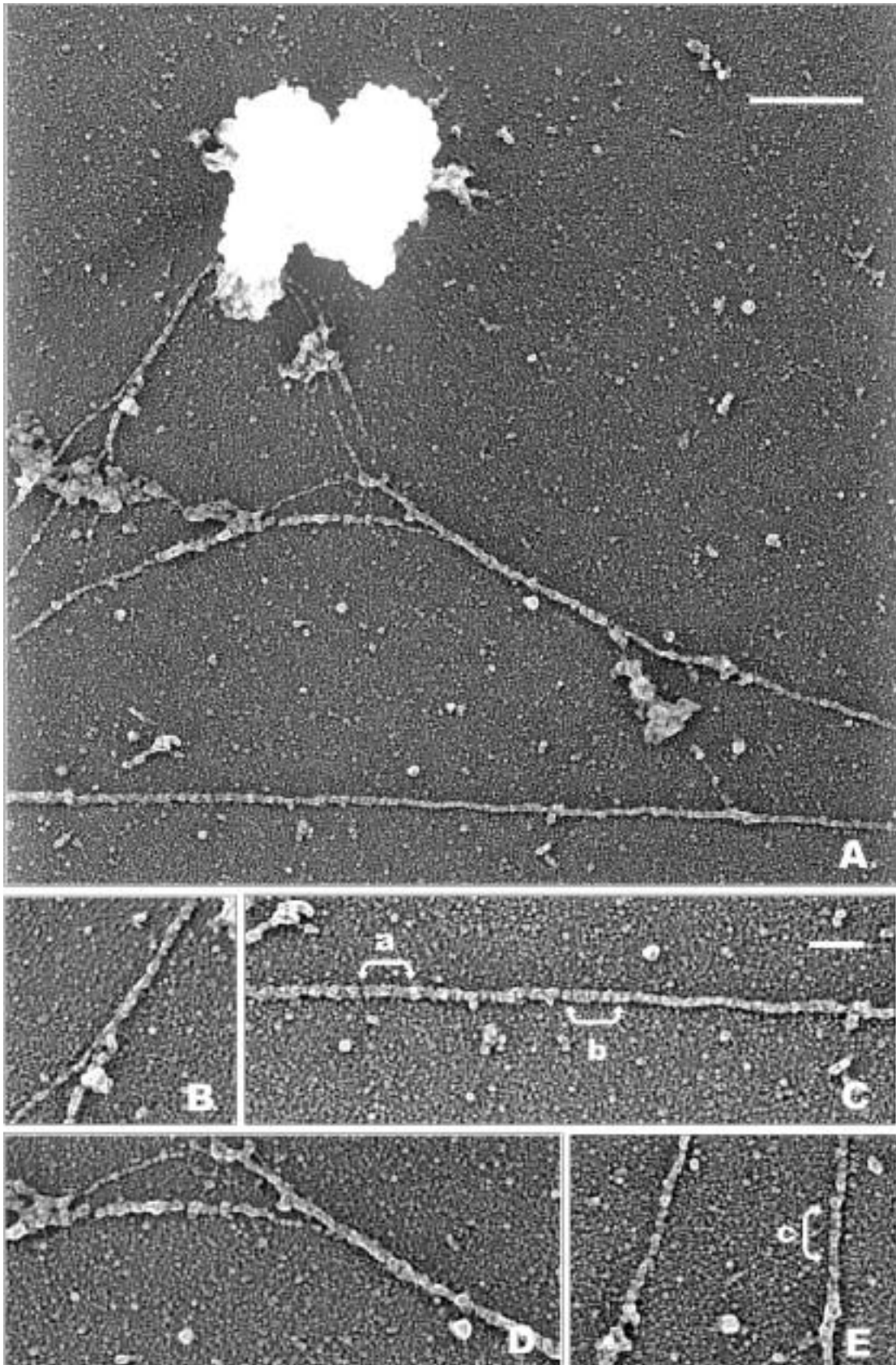


Figura 3.6.7. Cromosoma metafásico aislado mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5) (A). Después de extender la muestra en rejilla (sección 2.3.5.1) ésta se sometió a una digestión con RNasa en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM (punto 2.2 de la tabla 2.3.4). Los paneles B, C, D y E son ampliaciones de determinadas zonas del panel A. En las regiones marcadas por a, b y c se midió el grosor de los gránulos colocados de perfil. Los procesos de fijación y platinación se realizaron de la forma habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra en A indica 600 nm, mientras que en el resto de paneles representa 200 nm.

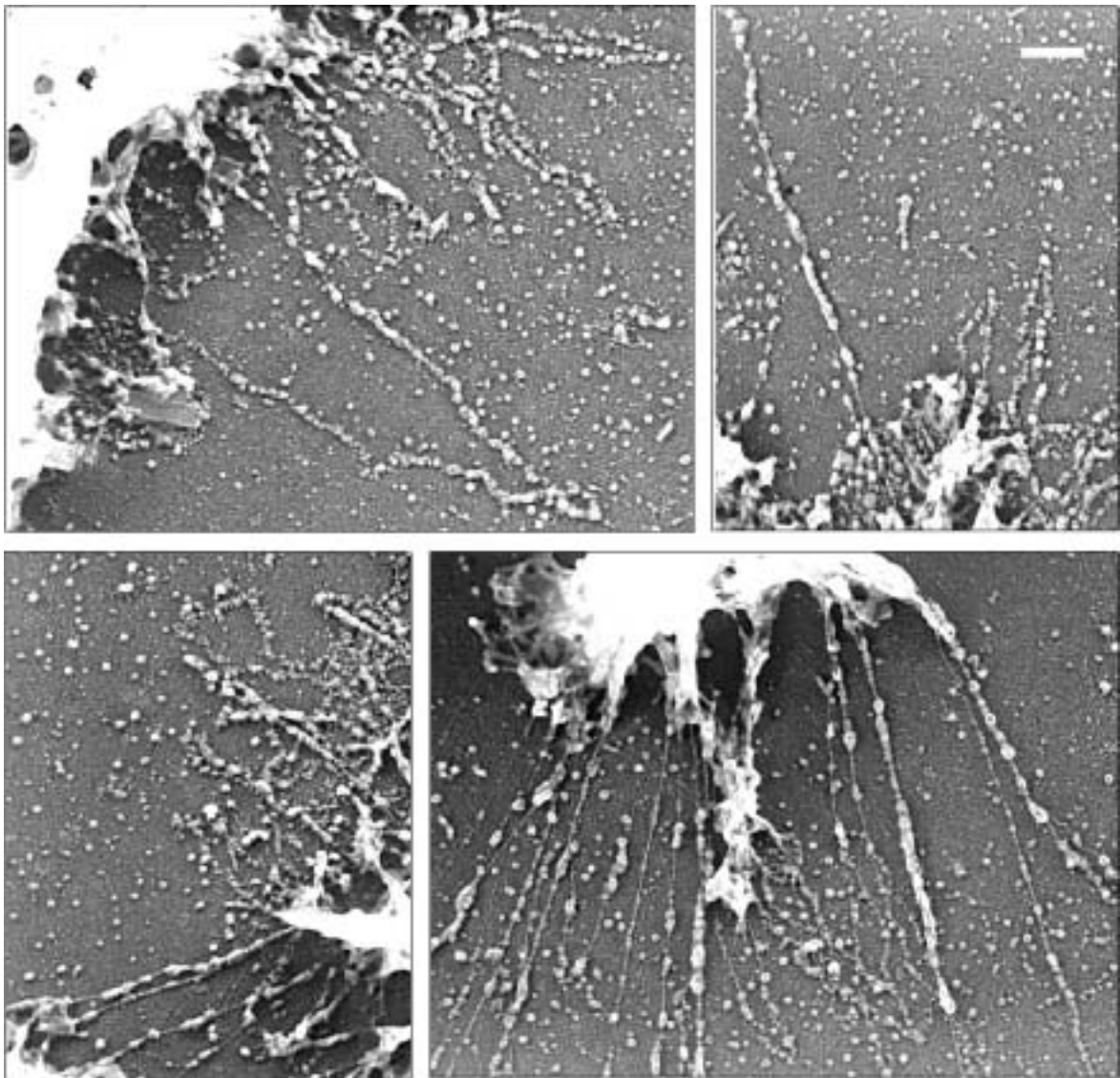


Figura 3.6.8. Fibras delgadas protuberantes de cromosomas purificados a través de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Estos cromosomas fueron extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1) y tratados con Pipes 0.1 mM pH 7.2 (punto 5.0 de la tabla 2.3.3). Procesos de fijación y platinación habituales (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra indica 200 nm.

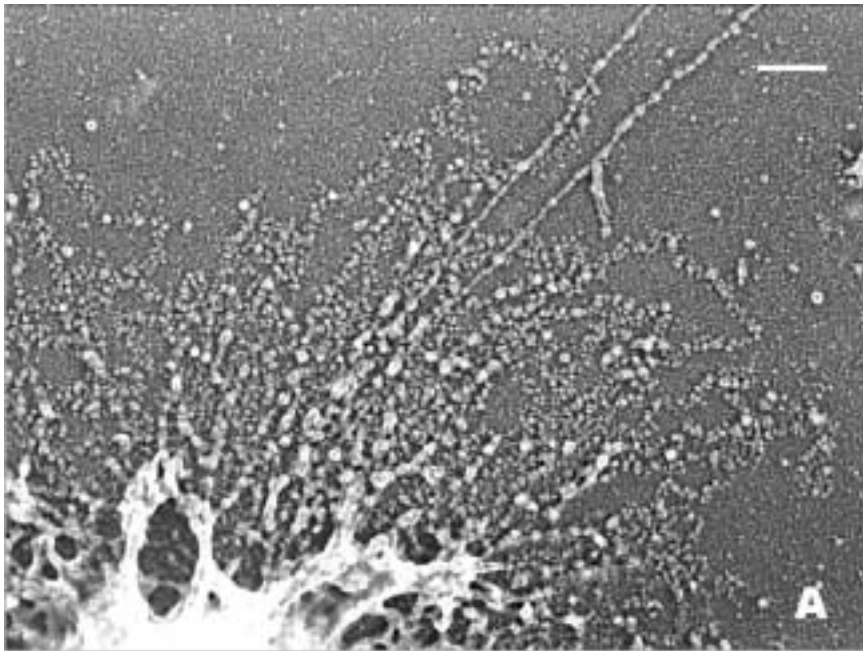
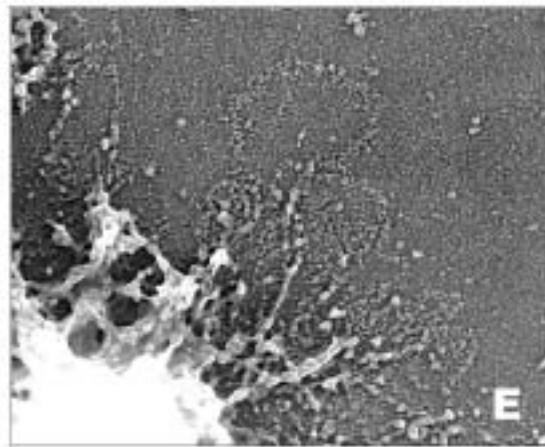
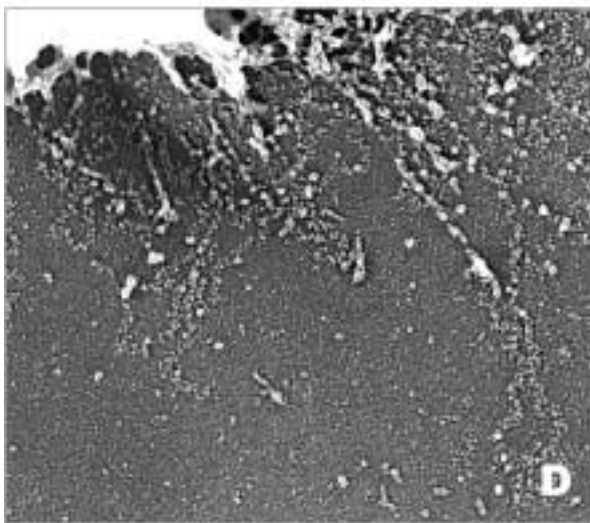
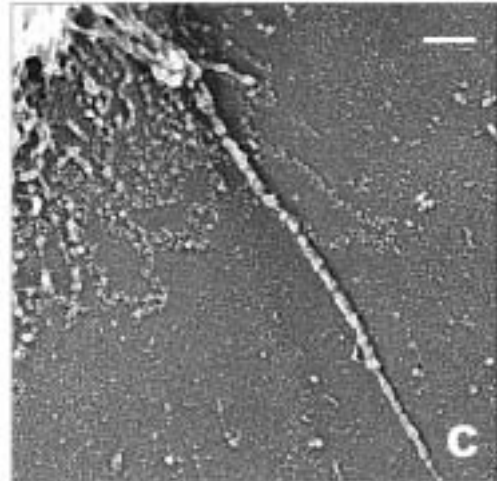
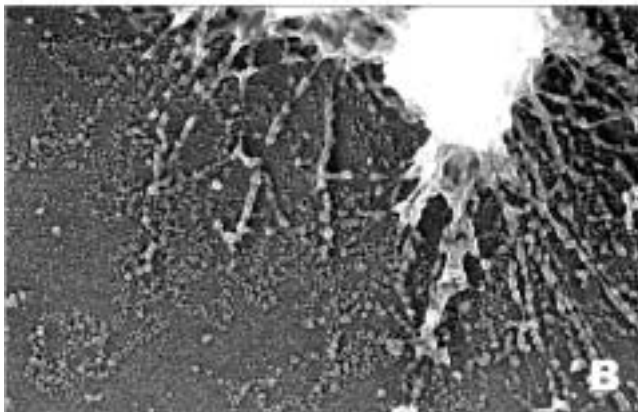


Figura 3.6.9. Las fibras expuestas en esta figura proceden de la misma rejilla que las mostradas en la figura 3.6.8. La barra equivale a 200 nm en **A**. La barra del panel **C** (que corresponde también a los paneles **B**, **D** y **E**) indica también 200 nm.



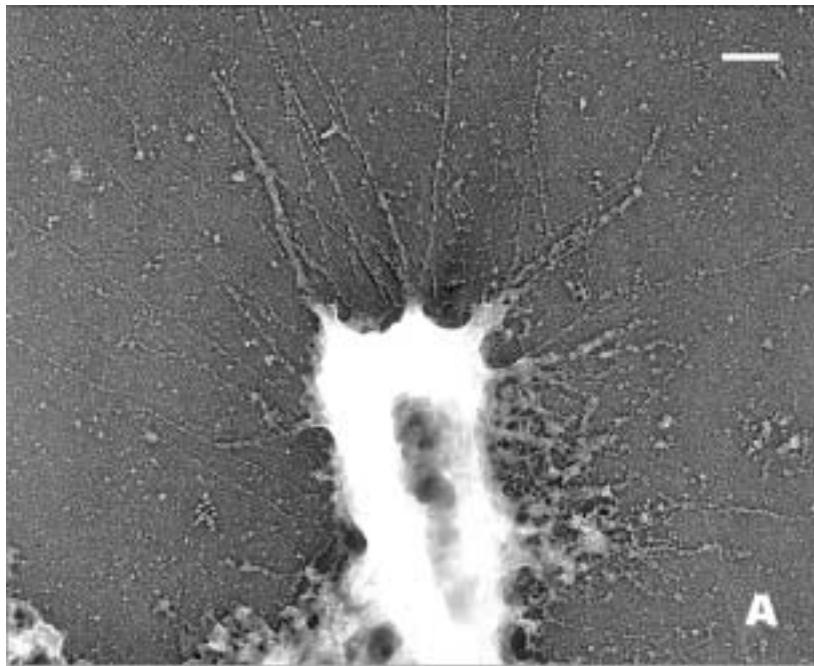
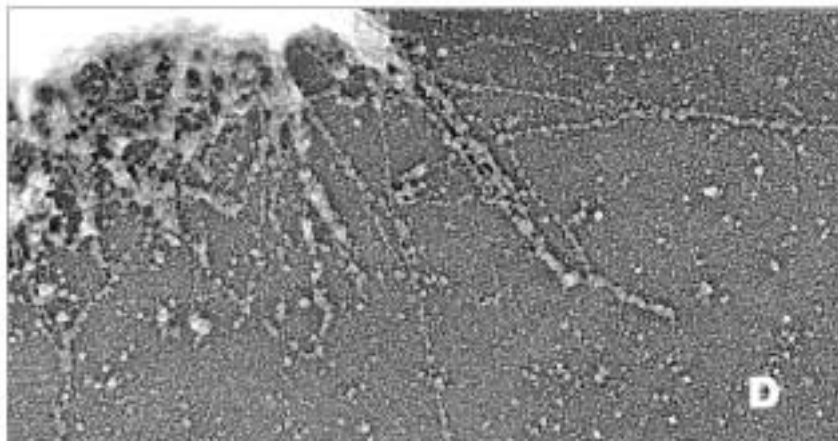
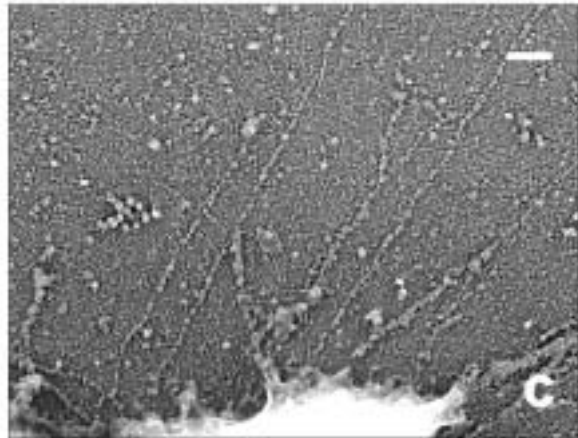
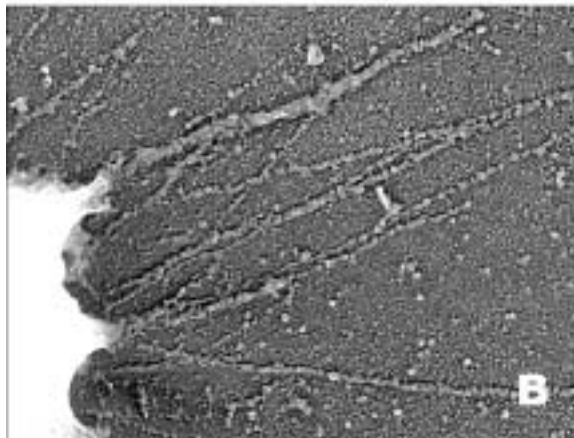


Figura 3.6.10. Ampliación de parte de un cromosoma metafásico procedente de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Este cromosoma, después de ser extendido en rejilla (sección 2.3.5.1), fue tratado con Pipes 0.1 mM pH 7.2, EDTA 10 mM (punto 13.1 de la tabla 2.3.3) (A). Los paneles B, C, D son ampliaciones de las fibras derivadas del cromosoma. Procesos de fijación y platinación habituales (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1, respectivamente). Barras: 400 nm en A; 200 nm en el resto.



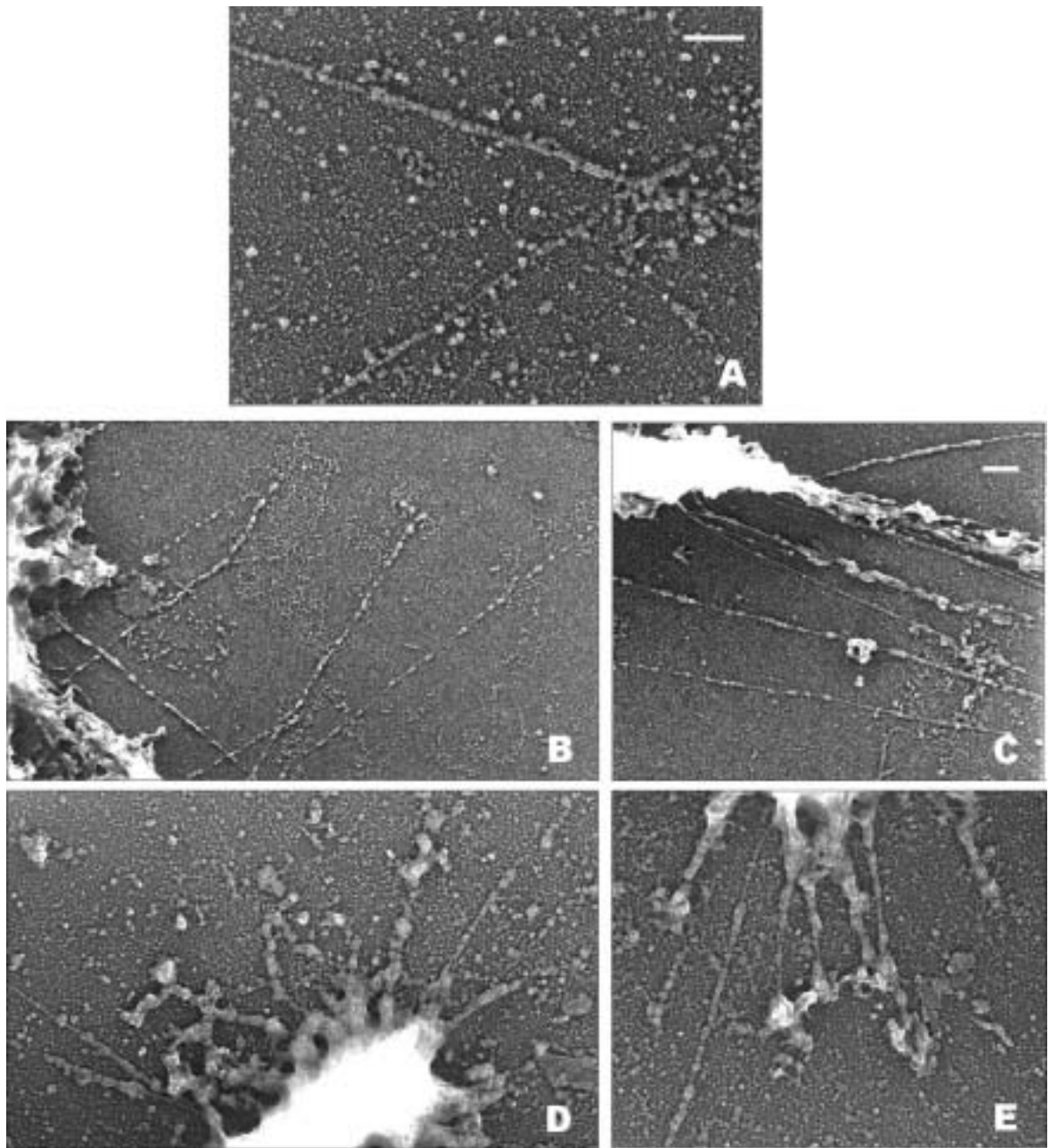


Figura 3.6.11. Ampliación de diversas fibras procedentes de cromosomas. En todos los casos la muestra proviene de cromosomas purificados mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Estos cromosomas fueron extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1) y sometidos a los siguientes cambios de medio:

- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 50% (punto 3.1 de la tabla 2.3.3) (A).
- Agua milliQ (punto 3.0 de la tabla 2.3.3) (B) y (C).
- Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 100 mM, sacarosa 50% (punto 3.6 de la tabla 2.3.3) (D) y (E).

La fijación y platinación de la muestra se realizó de la forma habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). Barras: 200 nm en A y también 200 nm en C (la barra de este último panel también es válida para los paneles B, D y E).

Los diámetros de estas fibras a veces son inferiores a 30 nm (figuras 3.6.7B y D, 3.6.10 y 3.6.11B y C) o superiores a los 40 nm (figuras 3.6.9C y 3.6.10B). En presencia de 100 mM de MgCl₂ (figura 3.6.10D y E) las fibras presentan una gran irregularidad y tienen diámetros mayores.

En las fibras en que fue posible se midieron los grosores de los cuerpos de 30-40 nm colocados de perfil (ver las zonas indicadas en figura 3.6.7C y E). Los valores obtenidos fueron de 13 y 22 nm (figura 3.6.7C) y de 24 nm (figura 3.6.7E).

3.7 Relación entre los diferentes elementos

Según los datos obtenidos y las micrografías presentadas en este trabajo, hay una evidente interrelación entre los tres elementos estructurales básicos. La fuerza iónica del medio sería la causa de que la cromatina en el interior del cromosoma se condensara en forma de fibra, gránulo o placa.

La correlación entre la placa y el gránulo se puede apreciar en muchas micrografías. Por ejemplo en la figura 3.7.1 se muestra la presencia de material procedente de las cromátidas, en el que hay una mezcla de placas y de estructuras extendidas irregularmente compuestas por gránulos de 30-40 nm. Ampliaciones más grandes de este tipo de estructuras (figuras 3.7.2 y 3.7.3) muestran de forma más contundente la existencia de gránulos en zonas de las placas donde éstas todavía no son muy compactas. Nuestros resultados sugieren que cuando las condiciones y la fuerza iónica son lo suficientemente compactantes, entonces estos gránulos se acaban de conjuntar para formar la placa, y viceversa, en condiciones iónicas bajas, las placas se desestructuran dando a lugar a los cuerpos de 30-40 nm.

La vinculación entre fibra y gránulo es también evidente, ya que prácticamente todas las fibras de 30-40 nm observadas en este estudio en diversas condiciones están compuestas por gránulos (ver sección 3.6.2).

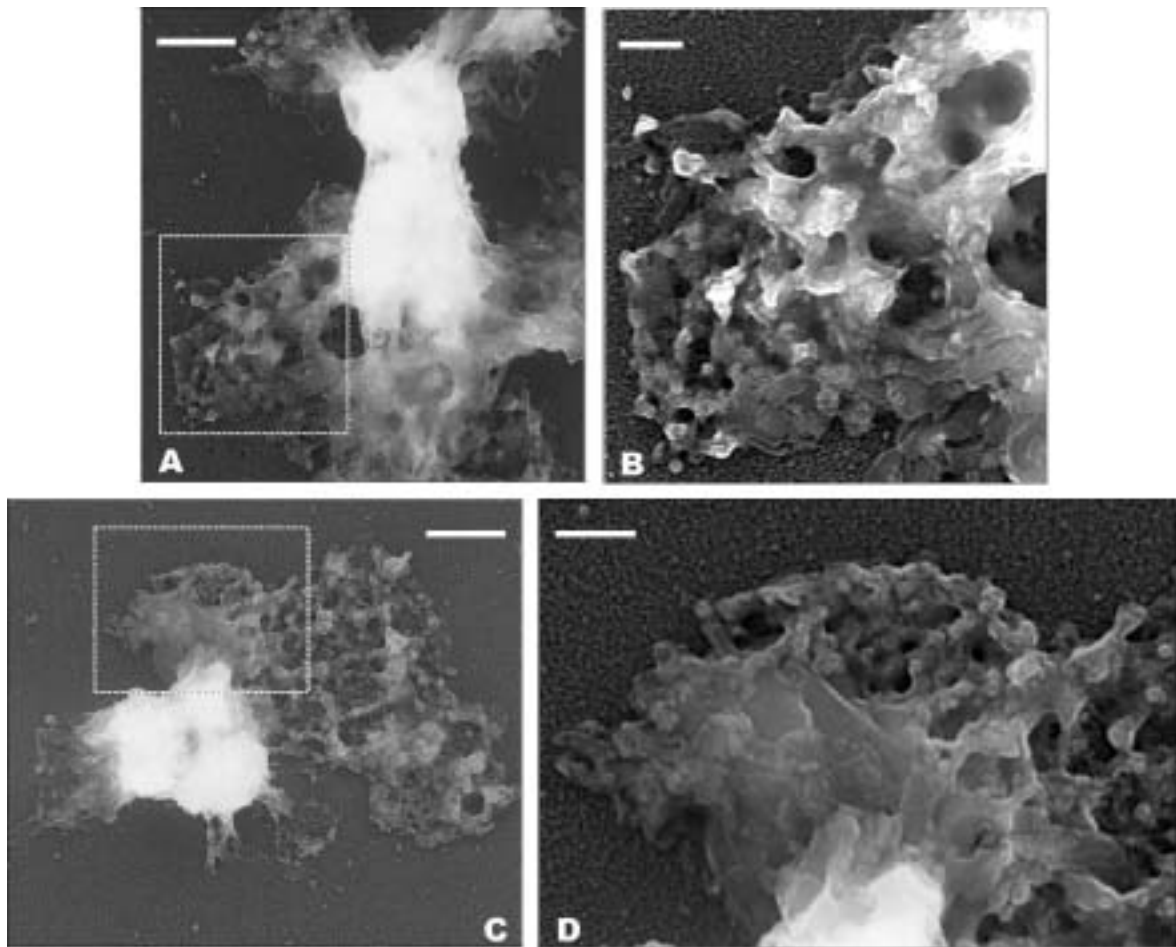


Figura 3.7.1. Estructuras extendidas procedentes de cromosomas aislados mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). La muestra fue digerida con nucleasa micrococcal en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 25% (punto 2.0 de la tabla 2.3.5) y a continuación extendida sobre rejilla (sección 2.3.5.1). Los paneles **B** y **D** muestran una ampliación de la zona marcada en **A** y **C**. La fijación y platinación de las muestras se efectuó de la manera habitual (2.3.8.1 y 2.3.9.1). Barras: 600 nm en **A** y **C**; 200 nm en **B** y **D**.

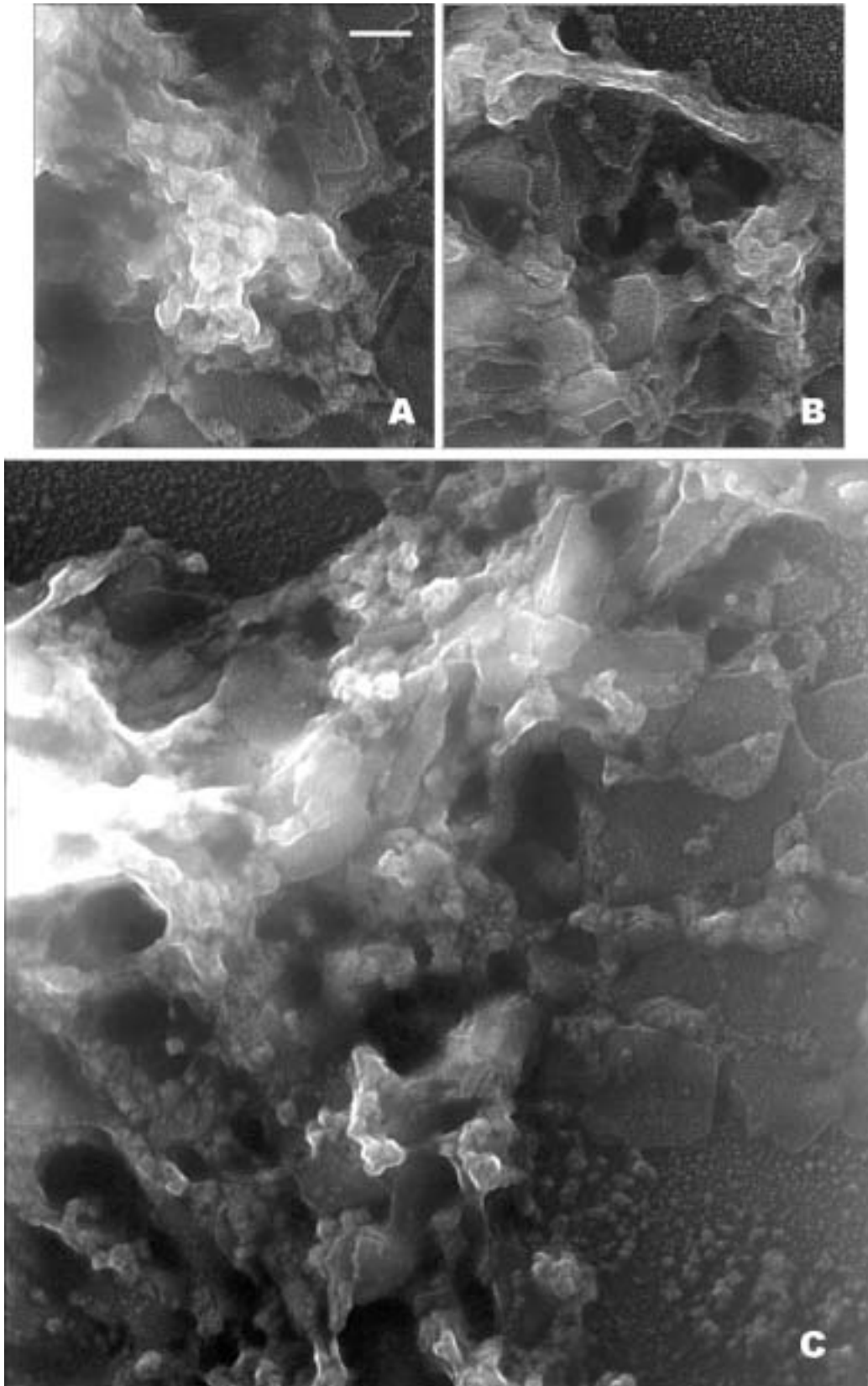


Figura 3.7.2. Ampliación de estructuras extendidas procedentes de cromosomas. Los cromosomas de los cuales se originaron fueron purificados a través de un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). En el panel **A** y **B** la muestra fue digerida en solución con nucleasa micrococcal en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 25% (punto 2.0 de la tabla 2.3.5) y posteriormente extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1). En cambio, en el panel **C**, los cromosomas fueron previamente extendidos en rejilla y a continuación digeridos con nucleasa micrococcal en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM (punto 2.4 de la tabla 2.3.6). La fijación y platinación de las muestras se efectuó de la manera habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). Barra: 100 nm.

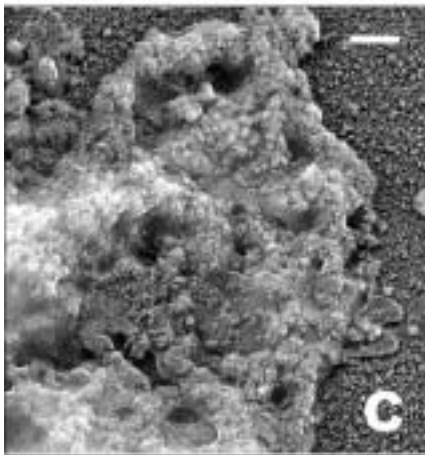
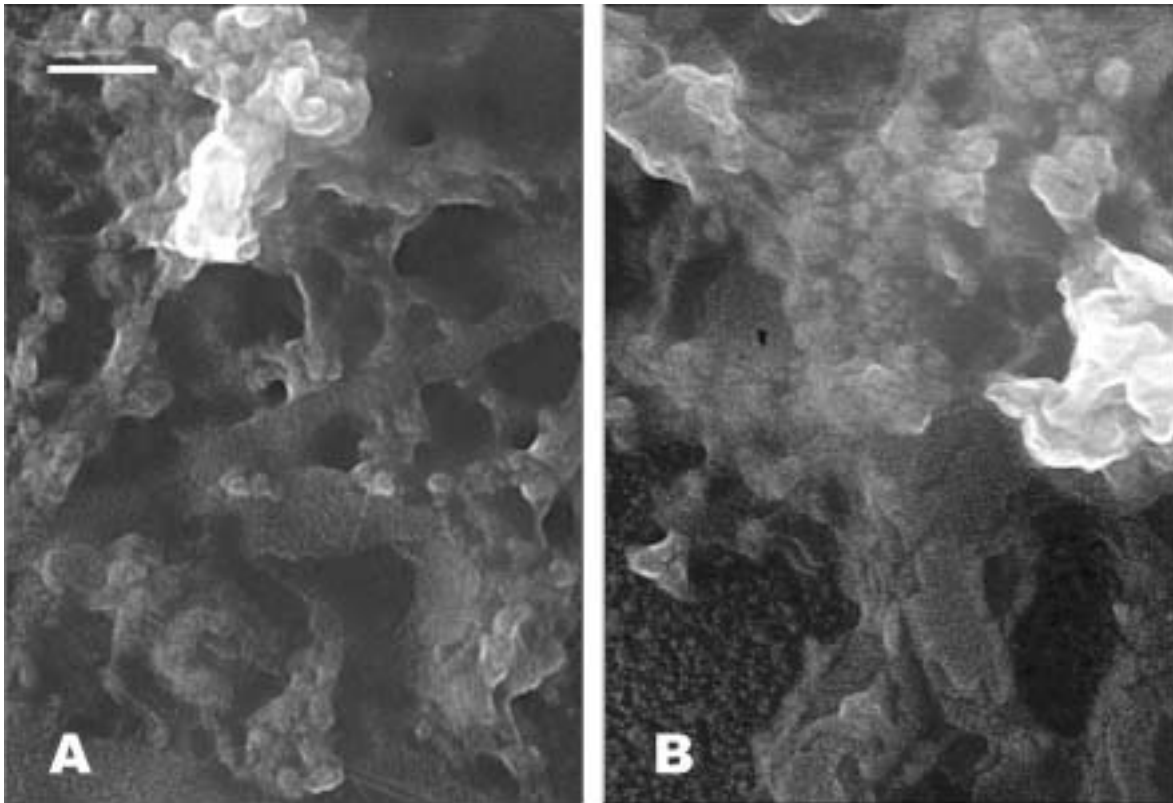


Figura 3.7.3. Estructuras extendidas irregularmente procedentes de cromosomas aislados mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Los cromosomas del panel **A** fueron extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1) y digeridos con nucleasa micrococcal en fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM (punto 3.1 de la tabla 2.3.6). En el panel **B**, la digestión se efectuó en Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, sacarosa 25% (punto 2.0 de la tabla 2.3.5), antes de la extensión de la muestra. Finalmente en el panel **C** los cromosomas fueron tratados con Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 10 mM (punto 6.2 de la tabla 2.3.3). La fijación y platinación de las muestras se efectuó de la manera habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). Barra: 100 nm.

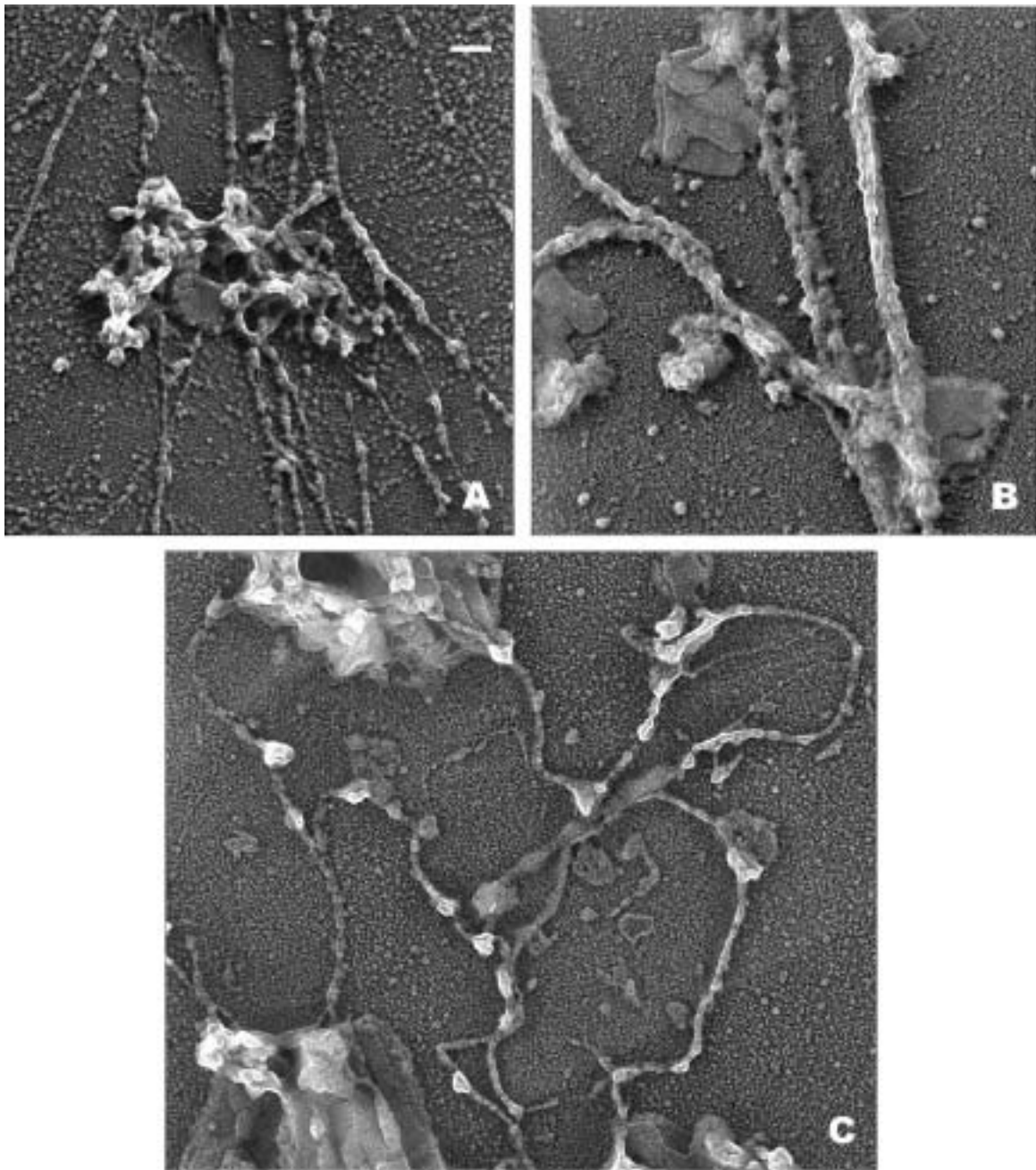


Figura 3.7.4. Las estructuras mostradas en esta figura proceden de cromosomas aislados mediante un gradiente de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5), extendidos en rejilla (sección 2.3.5.1) y sometidos a un cambio de medio en agua (punto 3.0 de la tabla 2.3.3) (A) o en Pipes pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 20 mM (punto 6.3 de la tabla 2.3.3) (B). En el panel C, antes de extender la muestra en rejilla, ésta se digirió con nucleasa micrococcal en Pipes 5 mM, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, sacarosa 25% (punto 2.1 de la tabla 2.3.5). La fijación y platinación de las muestras se efectuó de la manera habitual (secciones 2.3.8.1 y 2.3.9.1). La barra representa 100 nm.

Finalmente, también encontramos condiciones en las que los tres elementos coexisten, mostrando su interrelación. En la figura 3.7.4B y C, vemos la aparición de fibras granuladas a partir de placas que a su vez también contienen gránulos. En la figura 3.7.4A, incluso podemos ver la presencia de nucleosomas entre los tres elementos básicos. Esto únicamente pasa en condiciones iónicas de concentración extremadamente baja.

El hecho de que tanto las fibras delgadas como las placas estén compuestas por los cuerpos de 30-40 nm, nos permite sugerir que el componente principal de la cromatina en el interior de los cromosomas metafásicos es el gránulo. En función de las condiciones iónicas del medio éste se agruparía mayoritariamente por interacciones laterales formando placas (concentración salina elevada) o por interacciones cabeza-cola constituyendo fibras (concentración salina baja).

4 DISCUSIÓN GENERAL

4.1 *Obtención de cromosomas metafásicos*

4.1.1 Procedimiento estándar de obtención de cromosomas

En el transcurso de este trabajo se han ensayado diversos medios y técnicas con el fin de obtener cromosomas metafásicos para su posterior estudio por microscopía óptica y electrónica. El objetivo principal de esta parte de la tesis ha sido purificar el mayor número posible de cromosomas íntegros.

La observación directa mediante microscopía electrónica de las propias células, para estudiar los cromosomas intactos (figura 3.2.1), no ha sido posible debido a que la presencia de material contaminante celular nos impidió ver con claridad la estructura de los cromosomas. La utilización de técnicas más clásicas como la fijación de las células en metanol-ácido acético, nos ha dado buenos resultados al observar los cromosomas mediante microscopía óptica (figuras 3.1.2 y 3.1.3). Incluso estos cromosomas, observados al microscopio electrónico, presentan en ocasiones una buena integridad física (figura 3.2.2). No obstante, la presencia de restos celulares y el hecho de que el medio de Carnoy esté muy alejado de las condiciones fisiológicas de la célula, nos han hecho desestimar este tipo de técnicas para la obtención de cromosomas adecuados para nuestros estudios estructurales. Tampoco han resultado satisfactorios las técnicas de purificación en medios con *hexylene glycol*. Cuando observamos los cromosomas así obtenidos mediante microscopía electrónica, éstos se encontraban totalmente desestructurados y eran apenas reconocibles (figura 3.2.3). Utilizando medios con poliaminas, el nivel de integridad de los cromosomas observados es notable (figura 3.2.4), si bien aún encontramos restos de material celular entremezclado con las estructuras cromosómicas. Este problema no ocurre al someter a los cromosomas a un paso más en su purificación. Las muestras purificadas mediante un gradiente escalonado de sacarosa (sección 2.2.2.5) presentan menos restos celulares no cromosómicos. Además presentan una integridad estructural óptima, especialmente los cromosomas obtenidos en PME-MgCl₂ 5 mM (figura 3.2.5). Por estos motivos, y por el hecho de conseguir un rendimiento de obtención de cromosomas

aceptable, se optó por este método como procedimiento estándar para aislar y purificar cromosomas.

Así pues, la obtención de cromosomas en poliaminas y mediante la aplicación de gradientes de sacarosa seguida de fijación con glutaraldehído, genera cromosomas en perfecto estado. No obstante, para tener el correcto contraste que nos permita observar los detalles estructurales mediante microscopía electrónica ha sido esencial la platinación de las muestras. Los cromosomas no platinados (figura 3.2.7) tienen muy bajo contraste.

4.1.2 Integridad física de los cromosomas obtenidos

En la sección anterior, el criterio utilizado para determinar el buen estado de los cromosomas, ha sido la visualización de su aspecto global al microscopio electrónico. No obstante, también hemos procedido a estudiar otros parámetros estructurales que nos han ayudado a caracterizar mejor la integridad de los cromosomas obtenidos. Uno de estos parámetros es el diámetro de sus cromátidas.

La literatura científica considera que el diámetro de los cromosomas metafásicos oscila desde los 500 nm hasta los 850 nm en células humanas (Pienta y Coffey, 1984; Manuelidis y Chen, 1990; Cook, 1995; Alberts *et al.*, 2002; Maeshima y Laemmli, 2003; Strukov *et al.*, 2003). Esta variación en los datos presentados por los diversos autores es debida a las técnicas empleadas y a las diferentes condiciones en las cuales se obtuvieron los cromosomas.

Los diámetros hallados en esta tesis para los cromosomas obtenidos en poliaminas y en PME-MgCl₂ 5 mM, son $0.50 \pm 0.05 \mu\text{m}$ y $0.53 \pm 0.06 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 3.2.3). Ambos valores están dentro del rango descrito en la bibliografía e indican que se trata de estructuras muy compactadas. Esto es debido a la composición iónica de los medios utilizados. El medio de poliaminas contiene un elevado número de cargas positivas debidas a los iones sodio y potasio y a las propias poliaminas, mientras que en el caso del medio PME-MgCl₂ 5 mM encontramos iones sodio, pero sobretodo una alta concentración de iones divalentes magnesio. Todos estos iones tienen un efecto estructurante que provoca la compactación de las cromátidas metafásicas. Debemos destacar que de acuerdo con el reciente trabajo de Strick *et al.* (2001), sabemos que los cromosomas metafásicos en la célula contienen una elevada concentración de sodio, potasio y de iones divalentes (12-22

mM Mg^{2+} , 20-32 mM Ca^{2+}). Por lo tanto, las condiciones en las cuales hemos realizado las medidas de diámetro son coherentes con las condiciones celulares.

La determinación de la altura de las cromátidas es otro parámetro que nos ha ayudado a confirmar la excelente integridad de los cromosomas obtenidos en este trabajo. Las sombras proyectadas por los cromosomas cuando éstos son platinados de forma unidireccional (sección 2.3.9.2) demuestran que éstos no se encuentran aplastados (figura 3.2.8), tal como podría suceder al depositarse la muestra en las rejillas por centrifugación. Este resultado inicial viene apoyado por las estimaciones efectuadas de la altura de las cromátidas en presencia de Mg^{2+} (tabla 3.2.5). Los valores encontrados son compatibles con los hallados para el diámetro de las cromátidas en presencia de $MgCl_2$ 5 mM. Estos resultados descartan la posibilidad de que los cromosomas preparados en medios estructurantes se encuentren aplastados.

Los valores de concentración local de DNA estimados para los cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas y de $MgCl_2$ son de 0.21 y 0.18 g/ml, respectivamente (tabla 3.2.6). Este último parámetro también nos confirma una correcta integridad física. Si nuestros cromosomas estuvieran desestructurados, las densidades halladas deberían ser inferiores al promedio encontrado de forma experimental por otros laboratorios (0.17 g/ml) (sección 1.3.3), pero nuestras estimaciones indican que la densidad de nuestros cromosomas es incluso algo superior.

4.1.3 Relación entre los diferentes tipos de estructura cromosómica

Nuestros resultados indican que la estructura global de los cromosomas en diversos medios puede ser de tres tipos: (1) compacta (sección 3.3.1), (2) granular (sección 3.3.2) y (3) fibrosa (sección 3.3.3).

Tal como se ha descrito en las secciones precedentes, los tres tipos de estructuras globales coexisten en los mismos medios. La dominancia de un tipo de estructura sobre las otras dos depende del tipo de medio en el cual se hallan los cromosomas, lo cual sugiere una relación entre las tres morfologías.

La tabla 3.3.1 muestra los medios en los cuales se encuentra de forma mayoritaria cada una de estas estructuras. En medios donde la fuerza iónica es medio-elevada

encontramos predominancia de estructuras compactas, mientras que el aspecto granulado y sobretodo el fibroso, los encontramos mayoritariamente a fuerzas iónicas bajas. Estos resultados confirman la importancia de las interacciones electroestáticas en el mantenimiento de la estructura del cromosoma metafásico.

Para visualizar mejor esta dependencia en función de la concentración iónica se ha representado de forma esquemática un diagrama de fases (ver figura 4.1.1) donde se ve la distribución de las diferentes morfologías en función de la concentración de cationes divalentes y de la concentración de tampón y cationes monovalentes.

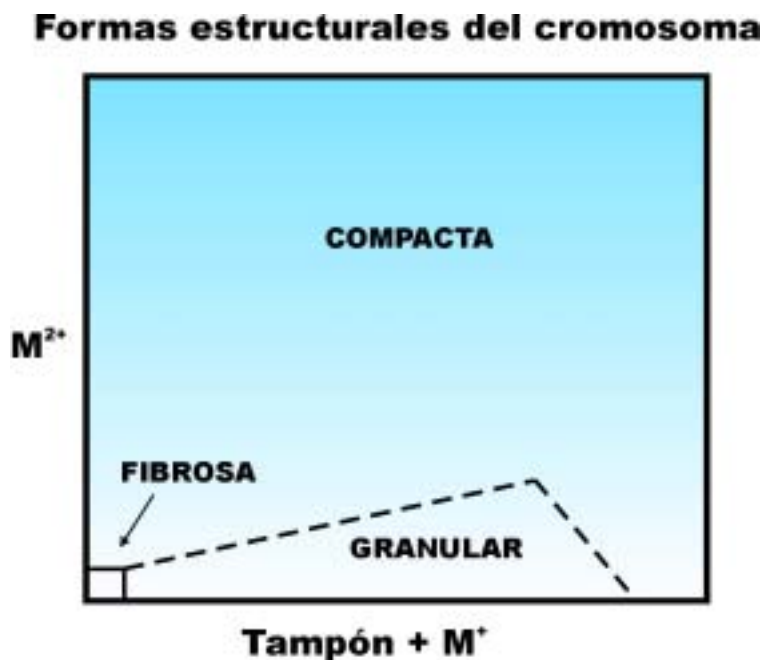


Figura 4.1.1. Distribución de las diferentes formas estructurales del cromosoma, en función de la composición iónica del medio.

Es importante resaltar, que la predominancia de la morfología fibrosa, se da únicamente en aquellas condiciones en que la fuerza iónica es extremadamente baja, y que estas condiciones están muy alejadas de las existentes en la célula.

En cambio, los medios en los cuales se da de forma mayoritaria las otras dos morfologías, se asemejan más a las condiciones fisiológicas de las células metafásicas (Guyton y Hall, 2000; Strick *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002; Nicholls y Ferguson, 2002).

4.2 Elementos estructurales del cromosoma

4.2.1 La fibra

Varios autores han planteado modelos para explicar la condensación de la cromatina hasta formar los cromosomas metafásicos (ver sección 1.3.2). Todos ellos coinciden en que la unidad básica para el plegamiento es la fibra de 30 nm. Esta fibra se empaquetaría de diversas maneras según los diferentes autores, para formar estructuras más grandes que al final constituirían los cromosomas.

Así por ejemplo, Laemmli y colaboradores proponen que las fibras de 30 nm se organizan en forma de lazos anclándose después en un eje proteico. Todo este conjunto acabaría plegándose para formar otra fibra de diámetro superior (Saitoh y Laemmli 1993). Otros autores han planteado modelos similares (Pienta y Coffey 1984; Filipisky *et al.*, 1990). Los partidarios de los modelos helicoidales argumentan que la fibra de 30 nm se plegaría helicoidalmente hasta llegar al cromosoma, pasando por la formación de sucesivas fibras intermedias de diversos diámetros (ver por ejemplo Sedat y Manuelidis 1978, Taniguchi y Takayama 1986). Modelos más recientes sugieren que las largas fibras de cromatina se agruparían formando lazos en el interior de unas estructuras llamadas cromómeros (Cook, 1995; Wanner y Formanek 2000). Incluso en el modelo de estructura reticular de Poirier *et al.* (2002) la estructura base del cromosoma es la fibra de 30 nm empaquetada en forma de ovillo (figura 1.3.6).

Por tanto, según todos estos autores parece claro que la morfología dominante en los cromosomas es fibrosa. Consecuentemente, si provocamos cualquier tipo de desestructuración o desmoronamiento sobre la estructura de éstos, es de esperar una abundante presencia de elementos en forma de fibra de diferentes diámetros y longitudes procedentes del cromosoma. En este trabajo experimental se ha provocado esta desestructuración parcial mediante cambios de medio (sección 2.3.6) o digestiones con diferentes enzimas (sección 2.3.7). Los resultados obtenidos mediante estos tratamientos, después de ser analizados por microscopía electrónica, muestran que la fibra es el elemento estructural más abundante, únicamente en condiciones muy alejadas a las existentes en la célula. Nuestros resultados demuestran que las fibras solamente dominan sobre otros

elementos estructurales en medios con una fuerza iónica extremadamente baja (ver tabla 3.3.1 y figura 4.1.1). También hemos encontrado fibras, pero de diámetros considerablemente superiores, en cromosomas cuyas cromátidas se han visto deformadas por procesos mecánicos. Esta capacidad de deformación de los cromosomas ya ha sido descrita por varios laboratorios (Claussen *et al.*, 1994; Houchmandzadeh *et al.*, 1997; Poirier *et al.*, 2002). No obstante, estos procesos difícilmente se ocasionarían de forma natural en el interior de las células. Por tanto, podemos concluir que nuestros resultados son contrarios al punto de vista generalmente aceptado de que los cromosomas están organizados por largas fibras de cromatina empaquetadas en su interior.

4.2.2 El gránulo

Han sido diversos los laboratorios que han observado una morfología granulada en los cromosomas. Por ejemplo, los autores que defienden un modelo de plegamiento para los cromosomas en forma de cromómeros (sección 1.3.2.3.1), se basan principalmente en la observación al microscopio electrónico de una serie de gránulos de unos 200 nm de diámetro formando parte de la estructura interna del cromosoma (Borland *et al.*, 1988; El-Afly *et al.*, 1994; Wanner y Formanek, 2000). Esta corriente también se ha visto apoyada por trabajos efectuados con microscopía de fuerza de barrido en los cuales se observó la existencia de un tipo de estructura similar sobre la superficie de cromosomas premetafásicos (Schaper *et al.*, 2000).

En el presente trabajo, también hemos observado la existencia de cuerpos esféricos parecidos, de unos 100-150 nm de diámetro, en cromosomas obtenidos en poliaminas (figura 3.3.5). Sin embargo, el tipo de gránulo dominante en la estructura de los cromosomas observados en nuestros estudios, es el cuerpo de 30-40 nm. Este cuerpo ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo, en trabajos realizados con fragmentos de cromatina de eritrocitos de pollo (Bartolomé *et al.*, 1995; Daban y Bermúdez, 1998) y ha sido interpretado como una forma de plegamiento solenoidal de la fibra de cromatina de 30-40 nm que le confiere a ésta un elevado nivel de compactación (modelo de solenoide interdigitado compacto, ver sección 1.2.3). Este gránulo también lo hemos observado en cromatina interfásica de células HeLa (Caravaca, 2000). Estos datos serían indicativos de

que esta estructura compacta de 30-40 nm, no solamente existe en cromatina de eritrocito de pollo donde ésta se encuentra muy compactada, sino también en la cromatina de otros tipos de células y organismos, con niveles de compactación diferentes.

Otros autores también han observado en sus estudios cuerpos de 30-40 nm de diámetro en el interior de los cromosomas. Sin embargo, ninguno de ellos le da a este tipo de elementos ningún valor estructural significativo o simplemente lo atribuyen a la presencia de fibras de 30-40 nm. Harrison *et al.* (1982) observaron por microscopía electrónica de barrido, cromosomas humanos que habían sido tratados con tripsina. Estos cromosomas mostraban una superficie totalmente granulada formada por unos cuerpos circulares de aproximadamente unos 30 nm. En experimentos similares realizados con células que habían sido irradiadas con luz ultravioleta e incubadas con inhibidores de la síntesis de DNA, también se ha observado la existencia de los mismos gránulos. Los cromosomas de estas células, cuando eran observados por microscopía electrónica de barrido después de un tratamiento con tripsina, mostraban una cierta descondensación, en el interior de la cual se apreciaban estructuras de orden superior de unos 20-40 nm de diámetro (Mullinger y Johnson, 1987). Summer (1998) ha encontrado estos mismos cuerpos en cromosomas de ratón, e incluso en el nuevo modelo de Wanner y Formanek (2000), se pueden apreciar gránulos de 30-40 nm entre las micrografías de microscopía presentadas por estos autores, de cromosomas humanos y plantas. Si estos gránulos observados por todos estos autores corresponden a las mismas estructuras observadas por nuestro laboratorio, se confirmaría el carácter universal de esta estructura compacta de la cromatina.

La morfología granulada se encuentra de forma mayoritaria en medios con fuerza iónica intermedia-baja (ver tabla 3.3.1 y diagrama de fases de la figura 4.1.1) mucho más cercanos a las condiciones fisiológicas (Guyton y Hall, 2000; Strick *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002; Nicolls y Ferguson, 2002), que los medios en los cuales predominan los cromosomas fibrosos. En estas condiciones, el interior de las cromátidas presenta una gran cantidad de gránulos, lo cual sugiere que estos cuerpos son la unidad básica a partir de la cual se condensa el cromosoma. No sólo hemos hallado estos cuerpos en las condiciones detalladas en la tabla 3.3.1, sino que también están presentes en diversas proporciones en el resto de condiciones estudiadas. Así por ejemplo, son abundantes en la periferias de los

cromosomas (figura 3.5.2 y 3.5.3), especialmente aquellos que han sido tratados con nucleasa micrococcal (3.5.1B y C). También los encontramos constituyendo las típicas estructuras extendidas correspondientes a material desestructurado de los cromosomas (figuras 3.5.4 y 3.5.5) o en el interior de las fibras gruesas en condiciones poco compactantes (figura 3.6.6). También se encuentran gránulos agrupados por interacciones cabeza-cola formando largas fibras de 30-40 nm de diámetro vinculadas al cromosoma (figura 3.6.7). Finalmente, también están presentes en el interior de las placas (ver próxima sección y figuras 3.7.1, 3.7.2, 3.7.3 y 3.7.4).

Todas estas consideraciones parecen señalar que los cromosomas y las estructuras derivadas por desnaturalización parcial están compuestas por gránulos de 30-40 nm, interpretados anteriormente en nuestro grupo como un solenoide interdigitado compacto (ver sección 1.2.3). Una prueba adicional a favor de la importancia estructural de estos cuerpos vendría dada a partir de la concentración local de DNA de los cromosomas (sección 3.2.8.3). En nuestro caso los datos obtenidos son de 0.18 y 0.21 g de DNA/ml para cromosomas en presencia de Mg^{2+} y poliaminas, respectivamente. Estos elevados valores exigen que las estructuras cromatínicas de las cuales se componen los cromosomas han de tener un elevado nivel de compactación. En este sentido, hay que destacar que de entre todos los modelos planteados por la literatura para la fibra de 30 nm, únicamente el modelo de solenoide interdigitado compacto cumple las expectativas de elevada densidad requeridas (Daban, 2000).

4.2.3 La placa

El estudio de cromosomas con un grado de desestructuración no muy elevado nos ha mostrado la inesperada existencia de un tipo de estructura, no descrita anteriormente en la literatura científica de la cromatina, a la cual hemos llamado placa. Estas placas se caracterizan por su regularidad y su apariencia compacta. En el presente trabajo, la presencia de placas compactas ha sido ampliamente detectado en gran cantidad de medios y condiciones (tabla 3.4.1). Esto descartaría que las placas sean un tipo de artefacto causado por un medio o condición determinado. Muy significativo es el hecho de haberlas encontrado en medios muy similares a los fisiológicos (ver tabla 3.4.1) con condiciones de fosfato, ATP, iones monovalentes y divalentes muy parecidos a los existentes en la célula

(tabla 1.2.1). No obstante, la prueba más evidente en contra de la posibilidad artefactual, es la estrecha vinculación espacial de las placas con los cromosomas y sus estructuras parcialmente desnaturalizadas. Hemos encontrado estas estructuras en el interior de las cromátidas (figuras 3.3.3, 3.4.1 y 3.4.2), en sus periferias (figuras 3.4.4, 3.4.5 y 3.4.6A) y en cromosomas parcialmente desmoronados (figura 3.4.3). Estructuras similares también las hemos observado formando parte de las fibras de diámetros grandes que protuberan de los cromosomas (figuras 3.6.5) o en las típicas estructuras extendidas correspondientes a material desestructurado de los cromosomas (figura 3.7.1). En ampliaciones de estas últimas estructuras hemos podido constatar la abundancia de gránulos de 30-40 nm sobre la superficie de ciertas zonas poco estructuradas de las placas (figuras 3.7.2, 3.7.3 y 3.7.4).

Todas estas observaciones señalarían al cuerpo de 30-40 nm como la unidad base en la composición de éstas. Los gránulos, posiblemente mediante interacciones laterales, se compactarían entre sí formando las placas.

Los datos obtenidos a partir de la tinción unidireccional, nos indican que la altura de las placas oscila entre los 6.2 y los 6.9 nm (ver tabla 3.4.3). A priori, parece imposible que la unidad básica para la formación de placas sea el cuerpo de 30-40 nm, ya que se hace difícil aceptar, que un cuerpo de casi 40 nm de diámetro, que contiene varios nucleosomas por vuelta con unas dimensiones de 6 nm de alto por 11 nm de diámetro para cada nucleosoma, pueda formar placas con una altura de 6.2-6.9 nm. No obstante, esto podría ser posible si tenemos en cuenta que los nucleosomas en el solenoide clásico tienen un paso de rosca de 11 nm (Widom y Klug, 1985), que es un valor que no está muy alejado de la estimación más alta obtenida (6.9 ± 1.7 nm). En caso del modelo interdigitado compacto, para fibras con casi 6 nucleosomas por vuelta, presenta un paso de rosca de 4.7 nm (Daban y Bermúdez, 1998). Este paso de rosca, sería incluso inferior al valor de la altura más baja obtenida para las placas (6.2 nm). Además hay que tener en cuenta, que en el modelo del solenoide interdigitado compacto corresponde a una familia de estructuras con distinto número de nucleosomas por vuelta, en las cuales el paso de rosca puede llegar a tener un valor de tan sólo 2.4 nm (ver figura 1.5). Todo esto refuerza la posibilidad de que las placas estén compuestas por los gránulos de 30-40 nm unidos mediante interacciones laterales, ya que la altura de cada piso es compatible con la gran compactación que puede adoptar estos cuerpos de 30-40 nm.

Algunos laboratorios ya han documentado la existencia de estructuras cromatínicas fuertemente empaquetadas. Son diversos los grupos que han trabajado con partículas núcleo aisladas, y han descrito la fuerte tendencia de interacción de sus caras para constituir pilas de nucleosomas altamente compactas en forma de arcos y hélices (Dubochet y Noll, 1978; Finch *et al.*, 1977; Uberbacher y Bernich, 1985). Más recientemente, Livolant y colaboradores también han observado la formación de estructuras muy compactas a partir de partículas núcleo purificadas. Estas estructuras compactas se han visto en condiciones similares a las fisiológicas (Leforestier *et al.*, 2001). Estos autores han hipotetizado incluso sobre la posibilidad de que la cromatina se organice en el interior del cromosoma en estructuras líquidas cristalinas (Mangenot *et al.*, 2003).

4.3 Relaciones estructurales entre los diferentes elementos

Los resultados de nuestros estudios indican que el cromosoma metafásico está compuesto por tres elementos estructurales (gránulos, fibras y placas). La coexistencia de estos tres elementos en el cromosoma señala una interrelación entre ellos. El hecho de que un determinado tipo de elemento estructural domine sobre los otros, dependiendo de las condiciones iónicas, demuestra que las interacciones electroestáticas juegan un papel crucial en esta relación. Concretamente hemos podido apreciar que en condiciones de fuerza iónica muy baja, encontramos mayoritariamente la presencia de fibras. Sin embargo, estas fibras están compuestas por una sucesión de cuerpos de 30-40 nm (figuras 3.6.7, 3.6.8, 3.6.9). Si subimos ligeramente la concentración iónica, el elemento estructural fibra se deshace para dar a lugar a la morfología granulada, en la cual hay una gran abundancia de cuerpos de 30-40 nm (ver figuras 3.3.6, 3.3.7, 3.3.8, 3.3.9 y 3.3.12). Finalmente, en condiciones de concentraciones iónicas más elevadas, el elemento dominante es la placa. Sin embargo, también este tipo de elemento está compuesto por los gránulos de 30-40 nm agrupados lateralmente (figuras 3.7.1, 3.7.2 y 3.7.3). Por tanto, tal como ha sido discutido en la sección precedente, parece ser que el gránulo es el componente principal de la cromatina en el interior de los cromosomas metafásicos. Esta estructura básica actuaría de vínculo o puente entre los otros dos elementos estructurales. En condiciones de elevada concentración

de cationes monovalentes y divalentes, el cuerpo de 30-40 nm se agruparía mayoritariamente por interacciones laterales formando placas, mientras que en ausencia de iones divalentes en tampones muy diluidos dominarían las interacciones cabeza-cola entre los gránulos, constituyendo largas fibras delgadas.

La importancia de la fuerza iónica en la estructura del cromosoma, ha sido ampliamente estudiada por algunos grupos. Por ejemplo, Maniotis *et al.* (1997) a partir de cromosomas físicamente extraídos de la célula metafásica, comprobó la habilidad de éstos en condensarse y descondensarse en respuesta a cambios en la concentración salina. Fisiológicamente más relevantes son los estudios de Bojonowski y Ingber (1998) y Poirier *et al.* (2002) con cromosomas metafásicos *in situ*. Estos dos grupos han podido confirmar los cambios reversibles de condensación y descondensación en función de las diferentes concentraciones de iones Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} . Además, estos laboratorios han coincidido en que los mayores efectos sobre la densidad cromosómica se producen en un rango corto de concentración de iones divalente. Resultados compatibles con estas observaciones han sido obtenidos por Livolant y colaboradores (Leforestier *et al.*, 1999; de frutos *et al.*, 2001) a partir de partículas núcleo aisladas. Estos autores han encontrado que los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} y también las poliaminas, a relativamente baja concentración, provocan la agregación de partículas núcleo de nucleosomas. La importancia de los iones divalentes podría tener una fuerte relevancia fisiológica a raíz de los estudios publicados por Strick *et al.* (2001). Este trabajo ha analizado la composición catiónica *in vivo* de los cromosomas y de la cromatina interfásica en células humanas, mostrando que hay un remarcable incremento de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} en el cromosoma metafásico en comparación al núcleo interfásico. En este punto es importante señalar que en muchos de nuestros experimentos (tabla 2.3.3) hemos mantenido las condiciones fisiológicas típicas de la célula eucariota (recordar tabla 1.2.1), variando únicamente las concentraciones de Mg^{2+} en una cantidad similar a la encontrada en el artículo de Strick (fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl_2 0-40 mM). En este rango de concentraciones hemos podido observar las estructuras descritas en este trabajo, concretamente la existencia de gránulos en el interior de las cromátidas para concentraciones bajas de Mg^{2+} , y la existencia de placas a concentraciones elevadas de este catión. (ver tabla 3.3.1).

El papel clave de la fuerza iónica en la integridad de los cromosomas también se puede apreciar a partir de nuestros resultados con cromosomas digeridos con nucleasa micrococcal (sección 2.3.7.3). En estos experimentos, a pesar de trabajar con altas concentraciones de enzima, los cromosomas mantienen su estructura gracias a las condiciones iónicas estructurantes del medio (figura 3.5.1**B**). Esto estaría en concordancia con experimentos similares realizados por Poirier y Marko (2002), con cromosomas aislados y estudiados en disolución, en los cuales los cromosomas también conservaban su estructura después de ser digeridos con nucleasa micrococcal. El conjunto de estos resultados demuestra que la unión covalente del DNA no es necesaria para preservar la integridad del cromosoma, puesto que éste es capaz de sostenerse únicamente a través de interacciones no covalentes entre elementos de la cromatina. Estas interacciones son extremadamente dependientes de la concentración y composición de los iones presentes en el medio.

5. CONCLUSIONES

Se ha realizado un estudio exhaustivo de microscopía electrónica de transmisión sobre la estructura de los cromosomas metafásicos de células HeLa. Se han estudiado un total de 4410 micrografías de cromosomas metafásicos, que en su mayor parte han sido tratados con diversos medios parcialmente desnaturalizantes, para poder analizar su estructura interna.

Para mayor claridad expositiva, las conclusiones se agrupan en tres apartados distintos.

5.1 Métodos de preparación e integridad de los cromosomas obtenidos

5.1.1. Se han ensayado diferentes procedimientos para la obtención de cromosomas metafásicos de células HeLa. De todos los métodos estudiados el más eficiente ha sido el gradiente escalonado de sacarosa en PME-MgCl₂ 5 mM. Este método nos ha permitido aislar de manera relativamente sencilla y rápida grandes cantidades de cromosomas en buen estado estructural y sin apenas material extracromosómico. Por este motivo, este método ha sido adaptado en nuestro laboratorio como procedimiento estándar para la obtención y purificación de cromosomas metafásicos.

5.1.2. Los valores obtenidos para el diámetro (0.53 ± 0.06 nm) y la altura aparente (0.59 ± 0.13 nm) de las cromátidas de los cromosomas obtenidos en medios estructurantes (Mg²⁺ ~5 mM) nos permiten asegurar que los cromosomas aislados mediante el procedimiento estándar no se encuentran aplastados, incluso después de ser depositados por centrifugación sobre las rejillas de microscopía electrónica.

5.1.3. La concentración local del DNA estimada para los cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas y Mg²⁺ es, respectivamente, de 0.21 y 0.18 g/ml. Estos valores indican que la cromatina en el interior de los cromosomas en presencia de cationes estructurantes presenta una elevada densidad.

5.1.4. Los resultados obtenidos indican que el sombreado con platino de los cromosomas parcialmente desnaturalizados es esencial para obtener un buen contraste y

poder estudiar detalladamente su estructura interna mediante microscopía electrónica de transmisión.

5.2 Estructura global de los cromosomas

5.2.1. Morfológicamente, los cromosomas estudiados en este trabajo pueden agruparse en tres tipos diferentes: compactos, granulados y fibrilados. La dominancia de una de las morfologías depende de las condiciones iónicas del medio y no excluye la presencia de elementos de los otros dos tipos estructurales.

5.2.2. La morfología más abundante es la compacta y se observa en presencia de cationes monovalentes y divalentes a concentración similar a la presente en la cromatina metafásica (Mg^{2+} 1.7-40 mM). Estos cromosomas tienen las cromátidas muy densas, con lo cual apenas pueden visualizarse detalles internos de su estructura. En los bordes de las cromátidas se aprecian una serie de estructuras planas superpuestas.

5.2.3. En condiciones de menor concentración de cationes ($Mg^{2+} \leq 1.7$ mM), la morfología dominante es la granular. Estos cromosomas están compuestos principalmente por gran cantidad de cuerpos circulares de 30-40 nm de diámetro.

5.2.4. Únicamente en condiciones de fuerza iónica extremadamente baja podemos encontrar la morfología fibrilar, la cual se caracteriza por la abundancia de fibras de 30-40 nm y de menor diámetro que protuberan de las cromátidas parcialmente desnaturalizadas.

5.3 Estructura de la cromatina en el interior de los cromosomas metafásicos

5.3.1. Los resultados obtenidos con cromosomas parcialmente desnaturalizados nos permiten concluir que existen tres elementos estructurales: la fibra, el gránulo y la placa.

5.3.2. Las fibras gruesas con diámetros que oscilan entre los 100 y los 500 nm son el resultado de la deformación plástica de las cromátidas durante los diferentes procesos de preparación de las muestras. En función de las condiciones iónicas del medio las fibras gruesas muestran gránulos o placas en su interior. Las fibras delgadas están formadas por una sucesión de cuerpos de 30-40 nm de diámetro unidos irregularmente mediante

interacciones cabeza-cola. Las fibras delgadas se observan predominantemente en condiciones de concentración salina extremadamente baja.

5.3.3. Los gránulos son unos cuerpos circulares compactos de unos 30-40 nm de diámetro con un marcado anillo periférico provocado por la abundante depositación de platino durante el sombreado rotacional. Estos cuerpos compactos fueron descritos previamente por nuestro grupo en trabajos realizados a partir de cromatina de eritrocito de pollo. Se encuentran presentes en todas las condiciones estudiadas en este trabajo, siendo especialmente abundantes en presencia de iones divalentes a concentración baja y en muestras tratadas con nucleasa micrococcal.

5.3.4. La placa es un elemento estructural característico de los cromosomas cuando éstos se encuentran en su forma más compacta, en presencia de concentraciones elevadas de cationes divalentes. Esta estructura no había sido descrita previamente por otros laboratorios. Es una estructura cromatínica de gran regularidad y con una superficie muy lisa. Las estimaciones realizadas a partir de muestras sombreadas unidireccionalmente con platino nos indican que la altura de estas placas está comprendida entre 6.2 y 6.9 nm.

5.3.5. En conjunto los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir que el componente principal de la cromatina en los cromosomas metafásicos es el gránulo de 30-40 nm. Dependiendo de las condiciones iónicas, este elemento estructural fundamental se agrega a través de uniones cabeza-cola para formar fibras (fuerza iónica muy baja), o bien se agrega mediante interacciones laterales para formar placas (condiciones salinas próximas a las de la cromatina metafásica). Las interacciones electrostáticas tienen pues un papel crucial en el mantenimiento de la estructura de los cromosomas. Además, nuestros resultados indican que los cromosomas compactos digeridos con nucleasa micrococcal mantienen su integridad física gracias a que las condiciones iónicas del medio preservan la cohesión de la cromatina, incluso cuando se pierde la continuidad covalente del DNA.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Adams, C. C. y Workman, J. L.** (1995). Binding of disparate transcriptional activators to nucleosomal DNA is inherently cooperative. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1405-1421.
- **Adolph, K. W.** (1980). Isolation and structural organization of human mitotic chromosomes. *Chromosoma* **76**, 23-33.
- **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P.** (2002). *Molecular biology of the cell*. Fourth edition. Garland Science, New York (USA).
- **Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E. y Moudrianakis, E. N.** (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148-10152.
- **Arents, G. y Moudrianakis, E. N.** (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10489-10493.
- **Ausió, J., Borochoy, N., Seger, D. y Eisenberg, H.** (1984). Interaction of chromatin with NaCl and MgCl₂, solubility and binding studies, transition to and characterization of the higher-order structure. *J. Mol. Biol.* **177**, 373-398.
- **Bak, A. L., Zeuthen, J. y Crick, F. H.** (1977). Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 1595-1599.
- **Bal-Tec.** (1992). *Accesorios and consumables*, pp 64.
- **Barch, M. J.** (1991). *The ACT cytogenetics laboratory manual*. Second edition. Raven Press, New York (USA).
- **Bartolomé, S.** (1994). Estudio de la autoorganización y estructura de pequeños fragmentos de cromatina. *Tesis doctoral*. Facultad de ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona.
- **Bartolomé, S., Bermúdez, A. y Daban, J.-R.** (1994). Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. *J. Cell Sci.* **107**, 2983-2992.
- **Bartolomé, S., Bermúdez, A. y Daban, J.-R.** (1995). Electrophoresis of chromatin on nondenaturing agarose gels containing Mg²⁺. Self-assembly of small chromatin fragments and folding of the 30-nm fiber. *J. Biol. Chem.* **22**, 22514-22521.
- **Belmont, A. S., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W. y Agard, D. A.** (1989). Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma* **98**, 129-143.

- **Belmont, A. S. y Bruce, K.** (1994). Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell Biol.* **127**, 287-302.
- **Belmont, A. S., Sedat, J. W. y Agard, D. A.** (1987). A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *J. Cell Biol.* **105**, 77-92.
- **Bennett, M. D., Heslop-Harrison, J. S., Smith, J. B. y Ward, J. P.** (1983). DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals. *J. Cell Sci.* **63**, 173-179.
- **Benyajati, C. y Worcel, A.** (1976). Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **9**, 393-407.
- **Bermúdez, A., Bartolomé, S. y Daban, J.-R.** (1998). Partial denaturation of small chromatin fragments: direct evidence for the radial distribution of nucleosomes in folded chromatin fibers. *J. Cell Sci.* **111**, 1707-1715.
- **Bohrmann, B., Haider, M. y Kellenberger, E.** (1993). Concentration evaluation of chromatin in unstained resin-embedded sections by means of low-dose ratio-contrast imaging in STEM. *Ultramicroscopy* **49**, 235-251.
- **Bojanowski, K. y Ingber, D. E.** (1998). Ionic control of chromosome architecture in living and permeabilized cells. *Exp. Cell Res.* **244**, 286-294.
- **Bojanowski, K., Maniotis, A. J., Plisov, S., Larsen, A. K. y Ingber, D. E.** (1998). DNA topoisomerase II can drive changes in higher order chromosome architecture without enzymatically modifying DNA. *J. Cell Biochem.* **69**, 127-142.
- **Borland, L., Harauz, G., Bahr, G. y van Heel, M.** (1988). Packing of the 30 nm chromatin fiber in the human metaphase chromosome. *Chromosoma* **97**, 159-163.
- **Boy de la Tour, E. y Laemmli, U. K.** (1988). The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly opposite helical handedness. *Cell* **55**, 937-944.
- **Bozzola, J. J. y Russell, L. D.** (1992). *Electron microscopy. Principles and techniques for biologists*. Jones and Bartlett Publishers, Boston (USA).
- **Burkholder, G. D. y Duczek, L. L.** (1980). Proteins in chromosome banding. I. Effect of G-banding treatments on the proteins of isolated nuclei. *Chromosoma* **79**, 29-41.
- **Burton, D. R., Butler, M. J., Hyde, J. E., Phillips, D., Skidmore, C. J. y Walker, I. O.** (1978). The interaction of core histones with DNA: equilibrium binding studies. *Nucleic Acids Res.* **5**, 3643-3663.
- **Callan, H. G.** (1986). Lampbrush chromosomes. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **36**, 1-252.

-
- **Caravaca, J. M.** (2000). Relaciones estructura-función en la cromatina de células HeLa. *Trabajo experimental de tercer ciclo*. Facultad de ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona.
- **Clark, D. J. y Kimura, T.** (1990). Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J. Mol. Biol.* **211**, 883-896.
- **Claussen, U., Mazur, A. y Rubtsov, N.** (1994). Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet. Cell Genet.* **66**, 120-125.
- **Cook, P. R.** (1995). A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J. Cell Sci.* **108**, 2927-2935.
- **Craig, J.** (1999) in *Chromosome structural analysis. A practical approach* (ed. W. A. Bickmore), pp 59-80. Oxford University Press, Oxford (UK).
- **Cuatrecasas, P., Fuchs, S. y Anfinsen, C. B.** (1967). Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol Chem.* **242**, 1541-1547.
- **Christensen, M. O., Larsen, M. K., Barthelmes, H. U., Hock, R., Andersen, C. L., Kjeldsen, E., Knudsen, B. R., Westergaard, O., Boege, F. y Mielke, C.** (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J. Cell Biol.* **157**, 31-44.
- **Daban, J.-R.** (2000) Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochemistry* **39**, 3861-3866.
- **Daban, J.-R. y Bermúdez, A.** (1998). Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry* **37**, 4299-4304.
- **Dasso, M., Dimitrov, S. y Wolffe, A. P.** (1994). Nuclear assembly is independent of linker histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12477-12481.
- **de Frutos, M., Raspaud, E., Leforestier, A. y Livolant, F.** (2001). Aggregation of nucleosomes by divalent cations. *Biophys. J.* **81**, 1127-1132.
- **Dietzel, S. y Belmont, A. S.** (2001). Reproducible but dynamic positioning of DNA in chromosomes during mitosis. *Nat. Cell Biol.* **3**, 767-770.
- **DiNardo, S., Voelkel, K. y Sternglanz, R.** (1984). DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2616-2620.
- **Dubochet, J. y Noll, M.** (1978). Nucleosome arcs and helices. *Science* **202**, 280-286.

- **Earnshaw, W. C.** (1988). Mitotic chromosome structure. *Bioessays* **9**, 147-150.
- **Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. y Liu, L. F.** (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* **100**, 1706-1715.
- **Earnshaw, W. C. y Heck, M. M.** (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* **100**, 1716-1725.
- **Earnshaw, W. C. y Laemmli, U. K.** (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* **96**, 84-93.
- **El-Alfy, M., Turner, J. P., Nadler, N. J., Liu, D. F. y Leblond, C. P.** (1994). Subdivision of the mitotic cycle into eleven stages, on the basis of the chromosomal changes observed in mouse duodenal crypt cells stained by the DNA-specific Feulgen reaction. *Anat. Rec.* **238**, 289-296.
- **Filipski, J., Leblanc, J., Youdale, T., Sikorska, M. y Walker, P. R.** (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* **9**, 1319-1327.
- **Finch, J. T. y Klug, A.** (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-1901.
- **Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M. y Klug, A.** (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* **269**, 29-36.
- **Fletcher, T. M. y Hansen, J. C.** (1995). Core histone tails domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 25359-25362.
- **Franke, W. W., Scheer, U., Trendelenburg, M. F., Spring, H. y Zentgraf, H.** (1976). Absence of nucleosomes in transcriptionally active chromatin. *Cytobiologie* **13**, 401-434.
- **Fritzsche, W. y Henderson, E.** (1996). Volume determination of human metaphase chromosomes by scanning force microscopy. *Scanning Microsc.* **10**, 103-110.
- **Gasser, S. M. y Laemmli, U. K.** (1987). Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. *Exp. Cell Res.* **173**, 85-98.
- **Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E. y Laemmli, U. K.** (1986). Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J. Mol. Biol.* **188**, 613-629.
- **Gray, J. W. y Langlois, R. G.** (1986). Chromosome classification and purification using flow cytometry and sorting. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**, 195-235.

-
- **Guo, X. W., Th'ng, J. P., Swank, R. A., Anderson, H. J., Tudan, C., Bradbury, E. M., y Roberge, M.** (1995). Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *EMBO J.* **14**, 976-985.
 - **Guyton, A. C. y Hall, J. E.** (2000). *Textbook of medical physiology*. Tenth edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia (USA).
 - **Hansen, J. C.** (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: Determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361-392.
 - **Harrison, C. J., Allen, T. D., Britch, M. y Harris, R.** (1982). High-resolution scanning electron microscopy of human metaphase chromosomes. *J. Cell Sci.* **56**, 409-422.
 - **Hernandez-Verdun, D. y Gautier, T.** (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* **16**, 179-185.
 - **Heslop-Harrison, J. S., Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Smith, J. B., Atkinson, M. D. y Bennett, M. D.** (1989). The volumes and morphology of human chromosomes in mitotic reconstructions. *Hum. Genet.* **84**, 27-34.
 - **Hirano, T.** (1998). SMC protein complexes and higher-order chromosome dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 317-322.
 - **Hirano, T.** (2000). Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 115-144.
 - **Hirano, T. y Mitchison, T. J.** (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* **120**, 601-612.
 - **Houchmandzadeh, B. y Dimitrov, S.** (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* **145**, 215-223.
 - **Houchmandzadeh, B., Marko, J. F., Chatenay, D. y Libchaber, A.** (1997). Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J. Cell Biol.* **139**, 1-12.
 - **Internacional Human Genome Sequencing Consortium.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
 - **Jorcano, J. L., Meyer, G., Day, L. A. y Renz, M.** (1980). Aggregation of small oligonucleosomal chains into 300 Å globular particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6443-6447.

- **Kiryanov, G. I., Manamshjan, T. A., Polyakov, V. Y., Fais, D. y Chentsov, J. S.** (1976). Levels of granular organization of chromatin fibres. *FEBS Lett.* **67**, 323-327.
- **Koch, M. H. J., Sayers, Z., Michon, A. M., Marquet, R., Houssier, C. y Willführ, J.** (1988). The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. V. Effect of linker length, condensation by multivalent cations, solubility and electric dichroism properties. *Eur. Biophys. J.* **16**, 177-185.
- **Leforestier, A., Dubochet, J. y Livolant, F.** (2001) Bilayers of nucleosome core particles. *Biophys. J.* **81**, 2414-2421.
- **Leforestier, A., Fudaley, S. y Livolant, F.** (1999). Spermidine-induced aggregation of nucleosome core particles: evidence for multiple liquid crystalline phases. *Biophys. J.* **81**, 1127-1132.
- **Leuba, S. H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K., Zlatanova, J. y Bustamante, C.** (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11621-11625.
- **Lewin, B.** (1997). *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford (UK).
- **Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. y Richmond, T. J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- **Machado, C. y Andrew, D. J.** (2000). D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J. Cell Biol.* **151**, 639-652.
- **Maeshima, K. y Laemmli, U. K.** (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev. Cell* **4**, 467-480.
- **Mangenot, S., Leforestier, A., Durand, D. y Livolant, F.** (2003). Phase diagram of nucleosome core particles. *J. Mol. Biol.* **333**, 907-916.
- **Maniotis, A. J., Bojanowski, K. y Ingber, D. E.** (1997). Mechanical continuity and reversible chromosome disassembly within intact genomes removed from living cells. *J. Cell Biochem.* **65**, 114-130.
- **Manning, G. S.** (1978). The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* **11**, 179-246.
- **Manuelidis, L. y Chen, T. L.** (1990). A unified model of eukaryotic chromosomes. *Cytometry* **11**, 8-25.
- **Marsden, M. P. y Laemmli, U. K.** (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* **17**, 849-858.

-
- **Marsmorstein, R. y Roth, S. Y.** (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 130-135.
 - **Martín, M.** (1999). Desestructuració de fragments de cromatina mitjançant proteòlisis limitada. *Trabajo experimental de tercer ciclo*. Facultad de ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona.
 - **McDonald, C.** (1994). Primary culture and the establishment of cell lines. In *Basic cell culture. A practical approach*. (ed. J. M. Davis), pp 149-178.
 - **McGhee, J. D., Nickol, J. M., Felsenfeld, G. y Rau, D. C.** (1983). Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell* **33**, 831-841.
 - **Miller, O. L. y Beatty, B. R.** (1969). Visualitzation of nucleolar genes. *Science* **164**, 955-957.
 - **Mullinger, A. M. y Johnson, R. T.** (1987). Disassembly of the mammalian metaphase chromosome into its subunits: studies with ultraviolet light and repair synthesis inhibitors. *J. Cell Sci.* **87**, 55-69.
 - **Narayanswami, S. y Hamkalo, B. A.** (1987). Hybridization to chromatin and whole chromosome mounts. In *Electron microscopy in molecular biology. A practical approach*. (ed. J. Sommerville y U. Scheer), pp 215-225.
 - **Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J.** (2002). *Bioenergetics*. Third edition. Academic Press, London (UK).
 - **Ohnuki, Y.** (1965). Demonstration of the spiral structure of human chromosomes. *Nature* **208**, 916-917.
 - **Paulson, J. R.** (1982). Isolation of chromosome clusters from metaphase-arrested HeLa cells. *Chromosoma* **85**, 571-581.
 - **Paulson, J. R. y Laemmli, U. K.** (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* **12**, 817-828.
 - **Pérez-Grau, L., Azorín, F. y Subirana, J. A.** (1982). Aggregation of mono- and dinucleosomes into chromatin-like fibers. *Chromosoma* **87**, 437-445.
 - **Pienta, K. J. y Coffey, D. S.** (1984). A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J. Cell Sci. Suppl.* **1**, 123-135.

- **Poirier, M. G., Eroglu, S., Chatenay, D. y Marko, J. F.** (2000). Reversible and irreversible unfolding of mitotic newt chromosomes by applied force. *Mol. Biol. Cell* **11**, 269-276.
- **Poirier, M. G. y Marko, J. F.** (2002). Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15393-15397.
- **Poirier, M. G., Monhait, T. y Marko, J. F.** (2002). Reversible hypercondensation and decondensation of mitotic chromosomes studied using combined chemical-micromechanical techniques. *J. Cell Biochem.* **85**, 422-434.
- **Rattner, J. B., Hendzel, M. J., Furbee, C. S., Muller, M. T. y Bazett-Jones, D. P.** (1996). Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J. Cell Biol.* **134**, 1097-1107.
- **Rattner, J. B. y Lin, C. C.** (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell* **42**, 291-296.
- **Rhodes, D.** (1997). The nucleosome core all wrapped up. *Nature* **389**, 231-233.
- **Robinett, C. C., Straight, A., Li, G., Willhelm, C., Sudlow, G., Murray, A. y Belmont, A. S.** (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J. Cell Biol.* **135**, 1685-1700.
- **Ruiz-Carrillo, A., Jorcano, J. L., Eder, G. y Lurz, R.** (1980). Stability and reversibility of higher ordered structure of interphase chromatin: continuity of deoxyribonucleic acid is not required for maintenance of folded structure. *Biochemistry* **19**, 2544-2554.
- **Saitoh, Y. y Laemmli, U. K.** (1993). From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of metaphase chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **58**, 755-765.
- **Saitoh, Y. y Laemmli, U. K.** (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* **76**, 609-622.
- **Schaper, A., Rossle, M., Formanek, H., Jovin, T. M. y Wanner, G.** (2000). Complementary visualization of mitotic barley chromatin by field-emission scanning electron microscopy and scanning force microscopy. *J. Struct. Biol.* **129**, 17-29.
- **Schwartz, D. C. y Cantor, C. R.** (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.
- **Sedat, J. y Manuelidis, L.** (1978). A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1**, 331-350.

-
- **Smith, M. F., Athey, B. D., Williams, S. P. y Langmore, J. P.** (1990). Radial density distribution of chromatin: evidence that chromatin fibers have solid centers. *J. Cell Biol.* **110**, 245-254.
 - **Smythe, C. y Newport, J. W.** (1991). Systems for the study of nuclear assembly, DNA replication, and nuclear breakdown in *Xenopus laevis* egg extracts. *Methods Cell Biol.* **35**, 449-468.
 - **Sommerville, J. y Scheer, U.** (1987). *Electron microscopy in molecular biology. A practical approach*. First edition. IRL Press, Oxford (UK).
 - **Strick, R., Strissel, P. L., Gavrillov, K. y Levi-Setti, R.** (2001). Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J. Cell Biol.* **155**, 899-910.
 - **Strukov, Y. G., Wang, Y. y Belmont, A. S.** (2003). Engineered chromosome regions with altered sequence composition demonstrate hierarchical large-scale folding within metaphase chromosomes. *J. Cell Biol.* **162**, 23-35.
 - **Strunnikov, A. V., Larionov, V. L. y Koshland, D.** (1993). SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J. Cell Biol.* **123**, 1635-1648.
 - **Stryer, L.** (1995). *Biochemistry*. Fourth edition. Freeman, New York (USA).
 - **Stubblefield, E. y Wray, W.** (1971). Architecture of the Chinese hamster metaphase chromosome. *Chromosoma* **32**, 262-294.
 - **Suau, P., Bradbury, E. M. y Baldwin, J. P.** (1979). Higher-order structures of chromatin in solution. *Eur. J. Biochem.* **97**, 593-602.
 - **Subirana, J. A.** (1992). Order and disorder in 30 nm chromatin fibers. *FEBS Lett.* **302**, 105-107.
 - **Sumner, A. T.** (1996). The distribution of topoisomerase II on mammalian chromosomes. *Chromosome Res.* **4**, 5-14.
 - **Sumner, A. T.** (1998). The mitotic chromosome. *Advances in genome biology.* **5A**, 211-262.
 - **Sumner, A. T.** (2003). *Chromosomes organization and function*. Blackwell Publishing, North Berwick (UK).
 - **Swedlow, J. R., Sedat, J. W. y Agard, D. A.** (1993). Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected in vivo by time-lapse, three-dimensional wide-field microscopy. *Cell* **73**, 97-108.

- **Taniguchi, T. y Takayama, S.** (1986). High-order structure of metaphase chromosomes: evidence for a multiple coiling model. *Chromosoma* **93**, 511-514.
- **Tavormina, P. A., Come, M. G., Hudson, J. R., Mo, Y. Y., Beck, W. T. y Gorbsky, G. J.** (2002). Rapid exchange of mammalian topoisomerase II alpha at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J. Cell Biol.* **158**, 23-29.
- **Thoma, F. y Koller, Th.** (1981). Unravelling nucleosomes, nucleosomes beads and higher order structures of chromatin: influence of non-histone components and histone H1. *J. Mol. Biol.* **149**, 709-733.
- **Thoma, F., Koller, Th. y Klug, A.** (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* **83**, 403-427.
- **Tsukiyama, T., Becker, P. B. y Wu, C.** (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoted mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* **367**, 525-532.
- **Uberbacher, E. C. y Bunick, G. J.** (1989). Structure of the nucleosome core particle at 8 Å resolution. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7**, 1-18.
- **Van Holde, K. E.** (1989). *Chromatin*. Springer-Verlag, New York (USA).
- **Wagner, R. P., Maguire, M. P. y Stallings, R. L.** (1993). *Chromosomes: A synthesis*. Wiley-Liss, New York (USA).
- **Wanner, G. y Formanek, H.** (2000). A new chromosome model. *J. Struct. Biol.* **132**, 147-61.
- **Widom, J.** (1986). Physicochemical studies of the folding of the 100 Å nucleosome filament into the 300 Å filament. Cation dependence. *J. Mol. Biol.* **190**, 411-424.
- **Widom, J.** (1989). Toward a unified model of chromatin folding. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 365-395.
- **Widom, J.** (1989). Toward a unified model of chromatin folding. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 365-395.
- **Widom, J.** (1997). Chromosome structure and gene regulation. *Physica A.* **244**, 497-509.
- **Widom, J.** (1998). Structure, dynamics and function of chromatin in vitro. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 285-327.
- **Widom, J. y Klug, A.** (1985). Structure of the 300 Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell* **43**, 207-213.

-
- **Williams, S. P., Athey, B. D., Muglia, L. J., Schappe, R. S., Gough, A. H. y Langmore, J. P.** (1986). Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys. J.* **49**, 233-248.
 - **Williams, S. P. y Langmore, J. P.** (1991). Small angle X-ray scattering of chromatin. Radius and mass per unit length depend on linker length. *Biophys. J.* **59**, 606-618.
 - **Wolffe, A. P.** (1998). *Chromatin, Structure and Function*. Third edition. Academic Press, London (UK).
 - **Wolffe, A. P. y Hayes, J. J.** (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* **27**, 711-720.
 - **Wolffe, A. P., Khochbin, S. y Dimitrov, S.** (1997). GAT do linker histone do in chromatin? *BioEssays* **19**, 249-255.
 - **Woodcock, C. L. y Dimitrov, S.** (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 130-135.
 - **Woodcock, C. L., Frado, L. L. y Rattner, J. B.** (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell Biol.* **125**, 11-19.
 - **Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Hprowitz, R. A. y Whitaker, N.** (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9021-9025.
 - **Woodcock, C. L. y Horowitz, R. A.** (1995). Chromatin organization re-viewed. *Trends Cell Biol.* **5**, 272-277.
 - **Wray, W., Stubblefield, E. y Humphrey, R.** (1972). Mammalian metaphase chromosomes with high molecular weight DNA isolated at pH 10.5. *Nat. New Biol.* **238**, 237-238.
 - **Yabuki, H., Dattagupta, N. y Crothers, D. M.** (1982). Orientation of nucleosomes in the thirty-nanometer chromatin fiber. *Biochemistry* **21**, 5015-5020.
 - **Zhang, Y. y Reinberg, D.** (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and development* **15**, 2343-2360.
 - **van Holde, K. y Zlatanova, J.** (1995). Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J. Biol. Chem.* **270**, 8373-8376.
 - **van Holde K, Zlatanova J.** (1996). What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10548-10555.