



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**Estructura de la cromatina a lo largo del ciclo celular.
Aplicación de la crio-tomografía electrónica al estudio
de la estructura de las placas de cromatina metafásica.**

**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biociències**

Memoria presentada para adquirir el grado de doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por Andrea Chicano Jimenez.

Trabajo realizado en la Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Joan-Ramon Daban.

Andrea Chicano Jimenez

Dr. Joan-Ramon Daban

Bellaterra, 10 de noviembre de 2015

Índice general

I	INTRODUCCIÓN	1
1.	Componentes fundamentales de la cromatina eucariota	3
1.1.	El DNA	3
1.2.	Las histonas	4
1.3.	Proteínas no histonas	5
1.3.1.	El grupo de las HMG	5
1.3.2.	La Topoisomerasa II	6
1.3.3.	El grupo de las SMC	7
2.	El nucleosoma	9
2.1.	Estructura del nucleosoma	9
2.2.	Dinámica del nucleosoma	10
2.3.	Propiedades autoasociativas de la NCP	11
3.	La fibra de cromatina	15
3.1.	Introducción a la fibra de cromatina	15
3.2.	El modelo del solenoide	18
3.3.	Modelos con DNA <i>linker</i> cruzado	18
3.4.	El solenoide interdigitado compacto	20
3.5.	Modelaje dinámico	22
4.	Estructura de la cromatina a lo largo del ciclo celular	23
4.1.	El ciclo celular	23
4.2.	Condiciones iónicas a lo largo del ciclo celular	24
4.3.	Organización de la cromatina en el interior del núcleo interfásico	25
4.4.	Modelos estructurales para el cromosoma metafásico	27
4.4.1.	Modelo de láminas delgadas para el cromosoma metafásico	30
5.	Técnicas empleadas	33
5.1.	Citometría de flujo	33
5.1.1.	Fundamentos de la citometría de flujo	33
5.1.2.	Separación celular mediante citometría de flujo	34
5.1.3.	Separación de células de diversas fases del ciclo celular	34
5.2.	Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)	36
5.2.1.	Fundamentos de la técnica de SAXS	36
5.2.2.	Instrumentación en SAXS	37

5.3.	Microscopía electrónica de transmisión y crio-tomografía electrónica	38
5.3.1.	Crio-tomografía electrónica	39
5.3.2.	Nuevos avances en crio-tomografía electrónica	41
6.	Objetivos	43
II	MATERIALES Y MÉTODOS	45
7.	Procedimientos generales	47
7.1.	Diálisis e incubación de muestras	47
7.1.1.	Diálisis en saco	47
7.1.1.1.	Preparación de los sacos de diálisis	47
7.1.1.2.	Diálisis de la muestra	47
7.1.2.	Incubación en cámara	48
7.2.	Microscopía óptica	48
7.3.	Microscopía electrónica de transmisión	49
7.3.1.	Condiciones de trabajo en microscopía electrónica	49
7.3.2.	Evaporación de carbono y carbono-platino	50
7.3.3.	Generación del soporte de carbono	51
7.3.4.	Activación del film de carbono	52
7.3.4.1.	Activación con Alcian Blue	52
7.3.4.2.	Activación mediante <i>glow discharge</i>	53
7.3.5.	Extensión de material sobre rejilla	53
7.3.5.1.	Extensión directa	53
7.3.5.2.	Extensión por centrifugación	54
7.3.6.	Fijación del material	54
7.3.6.1.	Fijación de fragmentos de cromatina interfásica	55
7.3.6.2.	Fijación sobre rejilla	55
7.3.6.3.	Criofijación por inmersión	55
7.3.7.	Generación de contraste en muestras deshidratadas	56
7.3.8.	Observación de muestras en el microscopio electrónico de transmisión	56
8.	Cultivos celulares	57
8.1.	Cultivo de células HeLa	57
8.2.	Establecimiento del cultivo celular	57
8.3.	Mantenimiento del cultivo celular	58
8.4.	Expansión del cultivo celular	58
8.5.	Metodología del cultivo celular en interfase	59
8.5.1.	Aislamiento de células interfásicas	59
8.5.2.	Purificación de núcleos interfásicos	60
8.6.	Metodología del cultivo celular en metafase	61
8.6.1.	Sincronización de células en metafase	61
8.6.2.	Obtención de células en metafase	61
8.7.	Recuento celular	62

9. Métodos para el estudio de la estructura de la cromatina de núcleos interfásicos	63
9.1. Medios empleados en el estudio de la cromatina interfásica	63
9.2. Métodos de desestructuración de núcleos interfásicos	64
9.3. Separación de núcleos en diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo	65
9.4. Obtención de fragmentos de cromatina interfásica	67
9.4.1. Digestión con nucleasa micrococcal	67
9.4.2. Lavados en condiciones de baja fuerza iónica	67
9.4.3. Análisis de fragmentos de digestión: electroforesis de DNA . .	68
9.5. Tratamientos para la autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica	69
9.5.1. Diálisis en condiciones fisiológicas	69
10. Métodos para el estudio de la estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos	71
10.1. Medios empleados en el estudio de la cromatina metafásica	71
10.2. Extracción de cromosomas. Purificación en gradiente de sacarosa . .	72
10.3. Experimentos de SAXS de cromosomas	73
10.3.1. Generación de un sedimento de cromosomas	73
10.3.2. Introducción del sedimento de cromosomas en el capilar . . .	73
10.3.3. El soporte de la muestra dentro de la cabina experimental . .	74
10.3.4. Adquisición de medidas	74
10.3.5. Procesamiento de las medidas	75
10.4. Métodos para la reconstrucción tridimensional de placas metafásicas mediante crio-TE	77
10.4.1. Precauciones con el nitrógeno líquido	77
10.4.2. Rejillas para criomicroscopía electrónica	77
10.4.3. Procedimiento para la obtención de placas en gran cantidad .	77
10.4.4. Deposición de la muestra sobre rejillas para criomicroscopía .	78
10.4.5. Adición de nanopartículas de oro y vitrificación de la muestra	78
10.4.6. Adquisición de series de proyecciones	79
10.4.7. Reconstrucción tridimensional a partir de las series de proyecciones	80
10.4.7.1. Alineamiento de las proyecciones	80
10.4.7.2. Algoritmos de reconstrucción	80
10.4.7.3. Análisis de las reconstrucciones	81
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
11. Estructura de la cromatina en el núcleo interfásico	85
11.1. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la compactación de la cromatina	85
11.2. Desestructuración de núcleos interfásicos mediante métodos químicos	88
11.3. Desestructuración de núcleos interfásicos mediante métodos mecánicos	91

11.3.1. Desestructuración mediante paso por aguja hipodérmica a presión	91
11.3.2. Desestructuración mediante ultrasonidos	93
11.3.3. Desestructuración por agitación con bolas de vidrio	94
12. Estructura de la cromatina interfásica en función de la fase del ciclo celular	101
12.1. Estructura de la cromatina en la fase G ₁	101
12.2. Estructura de la cromatina en la fase S	104
12.3. Estructura de la cromatina en la fase G ₂	107
13. Estudio de la autoasociación de fragmentos de cromatina interfási- ca	111
13.1. Análisis de los fragmentos de cromatina obtenidos	111
13.2. Formación de placas de cromatina interfásica	113
13.3. Formación de placas de cromatina en diferentes fases del ciclo celular	125
14. Preparación de muestras y análisis mediante SAXS	133
14.1. Preparación de muestras: Observación de cromosomas	133
14.2. Resultado del análisis de cromosomas mediante SAXS	136
15. Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos: Carac- terización ultraestructural mediante crio-ET	139
15.1. Resultados obtenidos en la preparación de suspensiones de cromatina metafásica para su estudio mediante crio-ET	139
15.1.1. Optimización de las condiciones de deposición de placas de cromatina sobre rejillas para criomicroscopía	142
15.2. Caracterización ultraestructural de las placas de cromatina metafásica mediante crio-ET	145
15.2.1. Reconstrucciones sin placa de fase a una magnificación de 27500x	146
15.2.2. Reconstrucciones con placa de fase Volta a una magnificación de 33000x	157
IV DISCUSIÓN GENERAL	189
16. Estructura de la cromatina en el núcleo interfásico	191
16.1. Estructura de la cromatina interfásica	191
16.2. Estudio de la capacidad autoasociativa de la cromatina interfásica .	193
17. Estructura de la cromatina en el cromosoma metafásico	195
17.1. Estructura interna del cromosoma condensado	195
17.2. Ultraestructura de las placas de cromatina metafásica	195

V CONCLUSIÓN FINAL	199
18. Conclusiones	201
VI BIBLIOGRAFÍA	203
Bibliografía	210
VII APÉNDICES	211
A. Índice de Figuras	213
B. Índice de Tablas	221
C. Símbolos y abreviaturas	223
D. Agradecimientos	227

Parte I

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

Componentes fundamentales de la cromatina eucariota

La cromatina está compuesta básicamente por DNA e histonas, que son por tanto sus unidades estructurales fundamentales. Pero en el núcleo celular, existen también muy diversas proteínas, que son necesarias para la expresión génica y la duplicación del DNA durante el ciclo celular. De todas estas proteínas, solo algunas juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la cromatina.

1.1. El DNA

La molécula de DNA se compone de dos polinucleóticos antiparalelos dispuestos helicoidalmente. Cada nucleótido presente en esta larga molécula, se compone a su vez de un grupo fosfato, una pentosa (2'-desoxirribosa) y una base nitrogenada: adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G). Las bases nitrogenadas ocupan el centro de la hélice y establecen puentes de hidrógeno (A-T y C-G) que mantienen la cohesión de la doble hélice (Watson y Crick, 1953).

El genoma humano, por ejemplo, contiene aproximadamente 3×10^9 pb, lo que supone una longitud aproximada de 1 m si la molécula de DNA se extendiera por completo. La célula es capaz de confinar todo el material genético en el interior del núcleo, de $5 \mu\text{m}$ de diámetro (Wolffe, 1998), lo que implica que el DNA está altamente empaquetado. Todo este material debe ser accesible a factores de transcripción y otras proteínas para que puedan llevarse a cabo procesos de regulación y expresión génica, por lo que debe existir además una adecuada organización del DNA.

Generalmente, el grado de compactación del DNA se calcula determinando la relación entre la longitud del DNA extendido y la longitud de la estructura que contiene el DNA. El valor de la concentración local de DNA resulta más adecuado para la validación de modelos de condensación de DNA (Daban, 2000). La concentración de DNA oscila entre 0.10 g/ml (núcleo interfásico) y 0.17 g/ml (cromosoma metafásico) a lo largo del ciclo celular.

1.2. Las histonas

Las histonas son las principales proteínas asociadas con el DNA, y las más abundantes del núcleo celular. La estructura y función de estas proteínas, así como también sus modificaciones postraduccionales, han sido estudiadas ampliamente. Las histonas son proteínas pequeñas ricas en aminoácidos básicos (lisinas y argininas; van Holde, 1989). Poseen una región globular altamente conservada, conocida como dominio de pliegue histónico (*histone fold domain*) y un extremo N-terminal carente de estructura secundaria (Figura 1.1 A; Watson et al., 2003). Las colas desestructuradas son susceptibles de ser modificadas, lo cual puede provocar cambios importantes en la estructura de la cromatina. Las modificaciones postraduccionales más importantes que afectan a las histonas son la fosforilación, metilación y acetilación, entre otras (Wolffe, 1998).

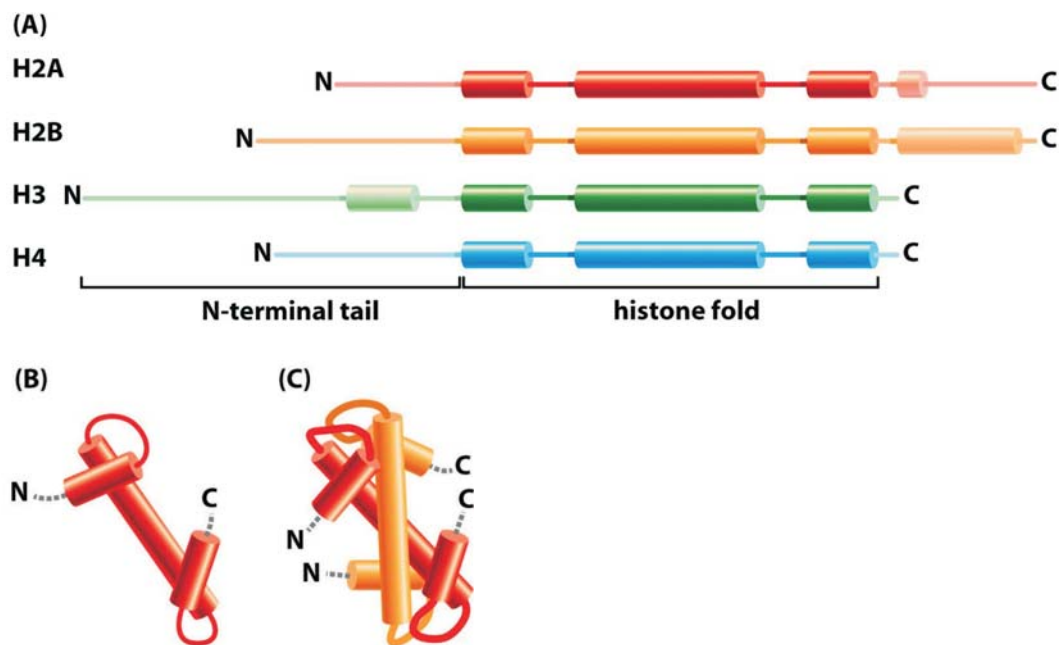


Figura 1.1: Representación esquemática de la estructura de las proteínas histonas. A El dominio de pliegue histónico se compone de tres zonas que forman hélices α . **B** Plegamiento del dominio de pliegue histónico. **C** Estructura del dímero H2A-H2B. Fuente: Alberts et al. (2008), Figura 4-25.

Existen varios tipos de histonas: H1 (20.8 kDa), H2A (14 kDa), H2B (13.9 kDa), H3 (15.4 kDa) y H4 (11.4 kDa). Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 constituyen el núcleo proteico del nucleosoma, alrededor del cual se enrolla el DNA. La histona H1 (denominada H5 en eritrocitos de aves, reptiles, anfibios y peces) se conoce también como histona de unión. Esta proteína no forma parte del núcleo proteico del nucleosoma, sino que interacciona con la región de entrada y salida del DNA en torno al octámero de histonas. Además, sus extremos N y C terminales son capaces de interactuar también con el DNA de unión (DNA *linker*), entre nucleosomas

sucesivos. De entre todas las histonas, las histonas de unión interaccionan de forma más débil con el DNA, de manera que son más fácilmente asociables/disociables. Son también ampliamente modificadas a lo largo del ciclo celular, con importantes consecuencias para la funcionalidad de la cromatina. Las histonas que forman el núcleo del nucleosoma presentan una secuencia altamente conservada entre especies, siendo las histonas H3 y H4 las más conservadas. Todas ellas tienen un dominio globular que participa en las interacciones entre histonas o entre histonas y DNA (Wolffe, 1998) (Figura 1.1 B).

1.3. Proteínas no histonas

1.3.1. El grupo de las HMG

Las proteínas HMG o *High Mobility Group* son las proteínas no-histona más abundantes que están asociadas a la cromatina. Presentan un dominio de unión a DNA y forman parte de una red de proteínas implicadas en procesos de regulación de la replicación, reparación de DNA y transcripción génica (Catez y Hock, 2010).

Las proteínas HMG presentan una estructura modular con regiones definidas de unión al DNA y extremos con residuos ácidos. Según el tipo de dominio de unión a DNA, se subdividen en tres familias: HMGA, caracterizadas por su dominio *AT-hook*; HMGB, con dominios *HMG-box* y HMGN, con dominios de unión a nucleosoma (ver Figura 1.2; Bustin, 2001; Catez y Hock, 2010). Las proteínas HMGA (excepto HMGA1c) poseen tres dominios *AT-hook* separados entre ellos por regiones flexibles ricas en residuos básicos, que en conjunto forman una región de unión a DNA (Bustin y Reeves, 1996). Cada dominio *AT-hook* consta de 9 aminoácidos que unen regiones ricas en adenina y timina (Bianchi y Agresti, 2005). Recientemente, Fonfría-Subirós et al. (2012) han descrito la estructura cristalográfica de uno de los dominios *AT-hook* de la HMGA1 junto a una secuencia concreta de DNA rica en pares de bases AT. Los autores observan que la asociación del dominio *AT-hook* ocurre preferencialmente en secuencias AATT. La región de unión a DNA de las proteínas HMGB está formada por un dominio *HMG-box* A en posición N-terminal y un segundo dominio *HMG-box* B central. Cada dominio *HMG-box* consta de 80 aminoácidos e interacciona con secuencias aparentemente no específicas de DNA (Bianchi y Agresti, 2005). Finalmente, el grupo de las HMGN posee un dominio de unión al nucleosoma flanqueado por dos pequeñas regiones cuya función no está del todo clara. Este dominio, a diferencia de los otros dos, no interacciona directamente con el DNA, sino que se dispone entre el DNA y el octámero de histonas (Bianchi y Agresti, 2005).

Las funciones específicas que llevan a cabo estas proteínas pueden variar en función de la familia o incluso el subtipo de HMG dentro de una misma familia. Como ocurre con las histonas, el grupo de las proteínas HMG son también susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales que modulan su función. Se ha descrito que

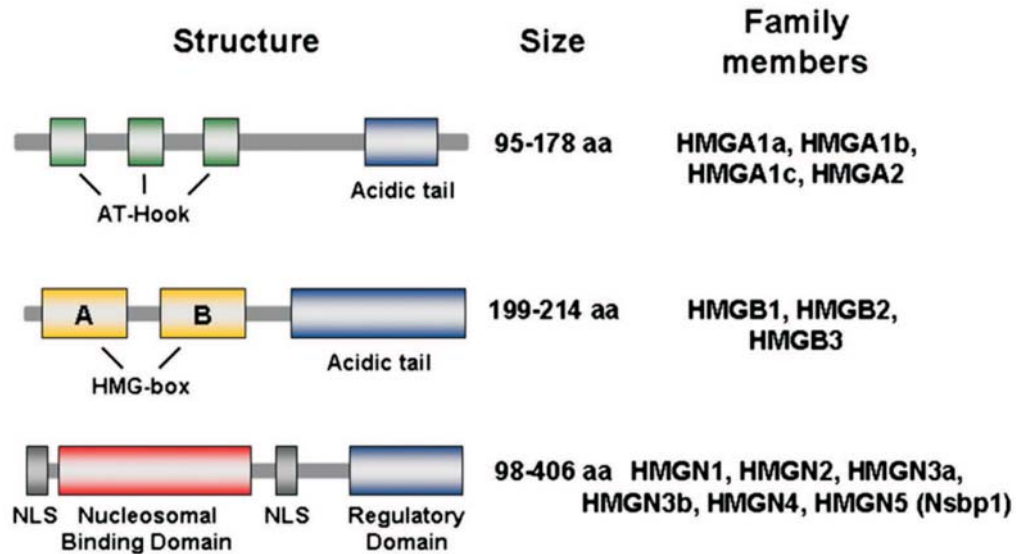


Figura 1.2: Familias de proteínas HMG según su dominio de unión a DNA. Los miembros de las tres familias de proteínas HMG presentan una estructura modular (rojo, amarillo y azul) que contiene el dominio de unión a DNA y una cola con carácter ácido. En la figura se indica el contenido en aminoácidos de cada familia. Fuente: Catez y Hock (2010), Figura 1.

las HMGA y HMGB pueden actuar como reguladores tanto positivos como negativos en procesos como la transcripción génica, la replicación, o incluso la reparación del DNA (únicamente HMGB; Reeves, 2010). Las proteínas de la familia de las HMGN parecen estar relacionadas con la regulación positiva de la transcripción, pero también se ha observado que intervienen en procesos de reparación de DNA y participan en el proceso de replicación del DNA (Reeves, 2010).

1.3.2. La Topoisomerasa II

La topoisomerasa II es una de las proteínas más abundantes asociadas al cromosoma metafásico. A nivel estructural, la topoisomerasa II eucariota es una proteína dimérica de tamaño considerable (peso molecular de cada monómero: ~175 kDa) formada por tres dominios (ATPasa, B' y A'; Collins et al., 2009). Aunque inicialmente fue identificada como parte del esqueleto proteico del cromosoma, por lo que se le atribuía una función principalmente estructural (Earnshaw et al., 1985; Earnshaw y Heck, 1985; Gasser et al., 1986), estudios posteriores han permitido definir su función específica (Moser y Swedlow, 2011).

La función principal y mejor caracterizada de la topoisomerasa II es la de relajar el DNA durante la replicación a través de la hidrólisis de ATP (ver Figura 1.3). Algunos autores han señalado que esta proteína es imprescindible para la compactación de la cromatina y la formación del cromosoma metafásico (Uemura et al., 1987; Wood y Earnshaw, 1990; Hirano y Mitchinson, 1991). Mientras que unos autores apuntan hacia una distribución uniforme de esta proteína en el cromosoma (Christensen et al., 2002), otros sugieren que su distribución es dinámica. Experimentos recientes mediante fluorescencia (FRAP) muestran un rápido intercambio

de topoisomerasa II con el medio citoplasmático (Tavormina et al., 2002) por lo que los autores sugieren que es improbable que se trate de un componente estructural. Otros estudios señalan que la Topoisomerasa II es necesaria para el mantenimiento de la flexibilidad del cromosoma (Kawamura et al., 2010).

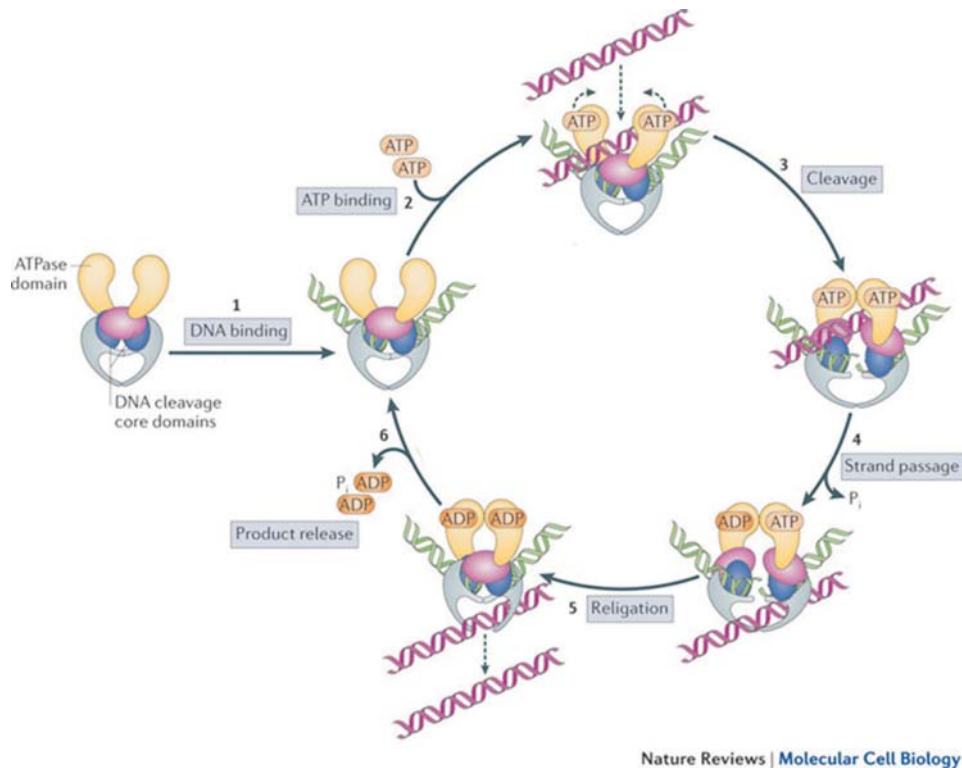


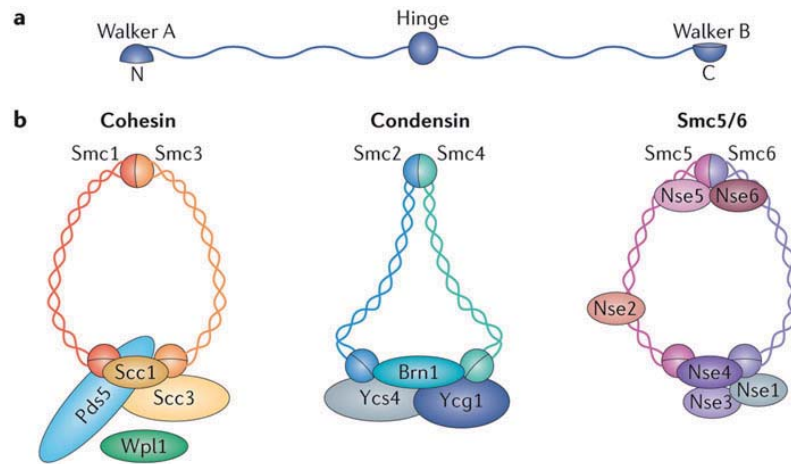
Figura 1.3: Mecanismo de relajación del DNA por parte de la topoisomerasa II. 1 La topoisomerasa II une un fragmento de DNA doble hebra y entonces es capaz de asociarse a un segundo fragmento de DNA. La unión de ATP (2) estimula el corte del primer fragmento de DNA unido (3) y el segundo fragmento de DNA pasa a través del hueco producido tras el corte del primer fragmento (4). Se produce entonces la ligación de los extremos del fragmento cortado (5) y, finalmente, es liberado (6). Fuente: Vos et al. (2011), Figura 6.

1.3.3. El grupo de las SMC

Las proteínas SMC o *Structural Maintenance of Chromosome* presentan una longitud de 1000-1500 aminoácidos, y se componen de un dominio globular central, del que salen dos dominios helicoidales que finalizan cada uno en un dominio globular (motivo Walker A y Walker B; ver Figura 1.4 a). Estas proteínas forman grandes complejos junto a otras proteínas accesorias que determinan su función.

Las proteínas más representativas y mejor descritas del grupo de las SMC son las proteínas eucariotas cohesina, condensina y los complejos Smc5/6, por su participación en el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas, en la condensación del DNA y en su reparación, respectivamente. Pero realmente, no puede serles atribuida una única función, ya que pueden influir sobre muchos procesos (Jeppsson et al., 2014).

La cohesina está formada por las proteínas SMC1, SMC3 y otras proteínas accesorias (ver Figura 1.4 b). Algunos autores sugieren que la cohesina es necesaria para el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas, desde su formación hasta su separación (Tanaka et al., 2000). La condensina está formada por las proteínas SMC2 y SMC4 y otras proteínas accesorias que conforman los subtipos condensina I y II (ver Figura 1.4 b). Se ha sugerido que este conjunto proteico facilita la compactación de las cromátidas hermanas y colabora en su separación (Losada y Hirano, 2001). Existen indicios que sitúan a estas proteínas en el eje cromosómico (Ono et al., 2003). Finalmente, el complejo Smc5/6 (ver Figura 1.4 b) se relaciona con procesos de reparación del DNA, aunque también se ha sugerido que contribuye a la organización del cromosoma (Jeppsson et al., 2014).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.4: Composición y estructura de los complejos SMC. a Representación esquemática de la estructura de los complejos SMC. b La cohesina se compone de las subunidades Smc1, Smc3, Scc1 y Scc3, aunque otras proteínas accesorias pueden unirse a este complejo y regular su acción. La condensina es un heterodímero formado por Smc2-Smc4, y en eucariotas va acompañado de otras tres subunidades accesorias, que forman los dos subtipos condensina I y II. El complejo Smc5/6 es un heterodímero formado por Smc5-Smc6 y suele ir acompañado de, al menos, cuatro proteínas más. Fuente: Jeppsson et al. (2014), box 1.

Capítulo 2

El nucleosoma

El nucleosoma es la unidad estructural fundamental de la cromatina. Millones de nucleosomas forman largos filamentos que se identifican bajo el microscopio electrónico por su similitud con un “collar de perlas”. El nucleosoma es el primer nivel estructural de orden superior de la cromatina. La formación del nucleosoma implica una reducción de la longitud del DNA hasta una sexta parte de su longitud original. El nucleosoma tiene una clara implicación en la dinámica de la cromatina.

2.1. Estructura del nucleosoma

Cada nucleosoma está compuesto por una partícula núcleo (NCP) y un segmento de DNA de 20-90 pb (según especies) que une partículas núcleo entre sí, al que se le da el nombre de DNA de unión o *linker*. La estructura de la partícula núcleo ha sido determinada a diferente resolución por varios grupos de investigación (Richmond et al., 1984; Uberbacher y Bunick, 1989; Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Cada partícula núcleo está formada por un octámero de histonas (2 moléculas H2A, 2 H2B, 2 H3 y 2 H4) y un fragmento de DNA de aproximadamente 146 pb que da 1.65 vueltas helicoidales levógiras alrededor del núcleo proteico. La estructura tiene forma de disco achatado y presenta un diámetro de 11 nm y una altura de 5.7 nm. Presenta un eje de simetría binario perpendicular al eje longitudinal de la hélice de DNA, que divide la partícula en dos mitades de 72 y 73 pb respectivamente, conectados a través de un par de bases que coincide con el eje de simetría (ver Figura 2.1).



Figura 2.1: Partícula núcleo del nucleosoma. Vistas frontal y lateral. Se representan el fragmento de 146 pb de DNA (verde y naranja) y gran parte de las cadenas polipeptídicas de las 8 proteínas histona (H3-azul, H4-verde, H2A-amarillo, H2B-rojo). Fuente: Luger et al. (1997), Figura 1a.

Las histonas H3-H4 forman un tetrámero en la parte central del nucleosoma. A ambos lados de esta estructura se unen dos dímeros H2A-H2B, constituyendo el octámero completo (Arents et al., 1991; Arents y Moudrianakis, 1993). Numerosos puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes salinos mantienen la unión entre el núcleo proteico y el DNA. Las histonas tienen un núcleo rico en residuos de lisina y arginina, cuyas cargas positivas interactúan con el DNA cargado negativamente, estabilizándolo (Luger et al., 1997). Las largas colas N-terminales están relacionadas con el plegamiento de la cromatina (Widom, 1998). La histona H1 (o H5, según especies) también participa en la condensación de la cromatina modificando la trayectoria del DNA *linker* (Thoma et al., 1979). Este cambio morfológico en el DNA parece guiar la condensación de los nucleosomas en el proceso de formación de estructuras de orden superior.

2.2. Dinámica del nucleosoma

Tanto el nucleosoma como la cromatina en general, deben ser consideradas estructuras altamente dinámicas dentro de un contexto biológico en el que participan gran cantidad de proteínas. El concepto de nucleosoma como unidad elemental de la cromatina debe ser revisado si se tiene en cuenta el gran número de evidencias que indican una gran variabilidad nucleosomal en composición y morfología (Zlatanova et al., 2009). Hoy en día, el *nucleosoma* puede considerarse como una familia de partículas variables en estequiometría y morfología del DNA, como muestra la Tabla 2.1.

Existen numerosas evidencias experimentales de que el DNA que se organiza alrededor del octámero proteico, puede presentar regiones más o menos enrolladas de lo habitual. La variabilidad en el grado de enrollamiento del DNA se asocia a la presencia de determinadas variantes de histona. Las diferencias morfológicas entre variantes podrían determinar la conformación del DNA en torno a la partícula y afectar, por tanto, a las propiedades dinámicas de la

cromatina. Otra estructura descrita en numerosas publicaciones es el hexasoma, que está formado por un tetrámero H3-H4 y un solo dímero H2A-H2B. Se ha propuesto que podría tratarse de una estructura temporal que se forma durante el proceso de transcripción. La liberación de uno de los dímeros H2A-H2B por parte del nucleosoma facilitaría el proceso, y una vez finalizado se reensamblaría de nuevo, recuperando la estructura original. El tetrasoma, formado por un tetrámero H3-H4, es también una estructura ampliamente descrita y, aunque se creía que era la primera estructura formada durante el ensamblaje del nucleosoma, hoy en día no existe certeza al respecto. De hecho, también se han observado dímeros individuales H3-H4. Una variante del tetrasoma es el R-tetrasoma, que presenta un enrollamiento dextrógiro del DNA. El enrollamiento positivo en el DNA no sólo se ha descrito en partículas con un núcleo tetramérico, sino que también ha sido observado en nucleosomas completos (R-octasoma) (Zlatanova et al., 2009). Todas estas estructuras deben estar íntimamente relacionadas y posiblemente tengan funciones concretas en el entorno dinámico nuclear según el proceso biológico que se deba llevar a cabo.

Suggested Name	Traditional Name	Histone Composition/ Stoichiometry
Nucleosome (alternative equivalent names: L-octasome, L-nucleosome)	Nucleosome	H2A/H2B (H3/H4) ₂ H2A/H2B
R-nucleosome (R-octasome)	Reversome	H2A/H2B (H3/H4) ₂ H2A/H2B
Hexasome	Hexasome	H2A/H2B (H3/H4) ₂ or (H3/H4) ₂ H2A/H2B
L-tetrasome	Tetrasome	(H3/H4) ₂
R-tetrasome	Right-handed tetrasome	(H3/H4) ₂
Split nucleosome	Split nucleosome	H2A/H2B/H3/H4 + H3/H4/H2A/H2B
Hemisome	Half-nucleosome	H2A/H2B/H3/H4 (could be histone variant specific)

Tabla 2.1: Tipos de nucleosomas en función de la composición del núcleo proteico. Se muestran las variantes conformacionales encontradas, junto a su nombre tradicional y el nombre que se propone actualmente. Fuente: Zlatanova et al. (2009), Tabla 1.

2.3. Propiedades autoasociativas de la NCP

Estudios de fluorescencia demostraron la capacidad de autoensamblaje del nucleosoma y estudiaron la cinética y mecanismo del proceso de formación de la partícula núcleo (Daban y Cantor, 1982a,b). Además, ya en los primeros estudios sobre la estructura de la partícula núcleo del nucleosoma, se observó la capacidad de autoasociación de éstas partículas para generar estructuras de orden superior (Finch et al., 1977; Dubochet y Noll, 1978; Tatchell y van Holde, 1978). Estas primeras

observaciones pusieron de manifiesto la importancia de las interacciones entre caras laterales de nucleosomas en el ensamblamiento de estas partículas para formar estructuras complejas, como las asociaciones hexagonales, los arcos y las hélices descritas por Dubochet y Noll (1978). En las estructuras observadas existe una fuerte interacción cara-cara entre nucleosomas, que da lugar a columnas de discos apilados, que a su vez interactúan entre ellas de forma más débil. Estudios cristalográficos (Uberbacher y Bunick, 1985) describieron también columnas asociadas formando agrupaciones hexagonales.

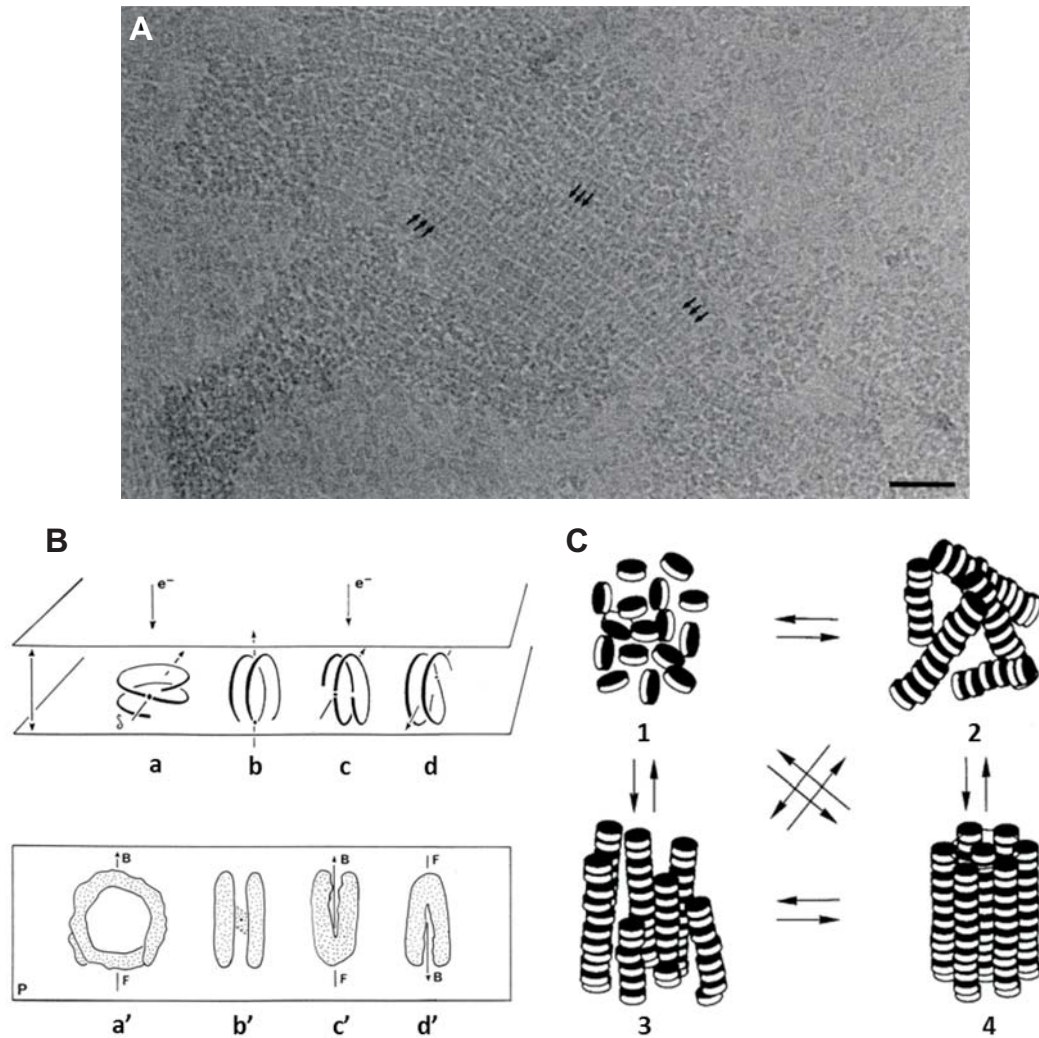


Figura 2.2: Interacción entre partículas núcleo. **A** Criomicroscopía electrónica de agregados de NCP en presencia de espermidina (catión trivalente). Se observan columnas de NCP altamente ordenadas, alineadas de forma paralela que presentan estriaciones internas (indicadas mediante flechas negras). **B** Representación esquemática de partículas NCP vistas mediante criomicroscopía electrónica. Se consideran algunas orientaciones posibles y sus correspondientes proyecciones en el plano de observación (P). **C** Tipos de agregados de partículas núcleo en presencia de espermidina. Fuente: Leforestier et al. (1999), figuras 4, 5 y 6.

Para poder atribuir una función concreta a las asociaciones observadas, era necesario mimetizar las condiciones del interior nuclear; esto es, emplear elevadas concentraciones de cromatina y condiciones iónicas adecuadas. En estas condiciones y empleando técnicas de microscopía de polarización y crio-microscopía electrónica (crio-EM), algunos autores han observado que bajo concentraciones variables de iones mono y trivalentes, las partículas núcleo son capaces de autoensamblarse formando fases de cristal líquido (Leforestier y Livolant, 1997; Leforestier et al., 1999). En estas fases se detecta la presencia de dos tipos de texturas amorfas isotrópicas (Figura 2.2 C: 1 y 2) y dos tipos de texturas cristalinas (Figura 2.2 C: 3 y 4) formadas por columnas que pueden disponerse de forma paralela entre sí o bien asociarse entre ellas en agrupaciones hexagonales como las mostradas años antes por Dubochet y Noll (1978). Los nucleosomas en este tipo de columnas también se apilan a través del contacto entre sus caras (Figura 2.2 A). Bajo el microscopio, las NCP pueden verse como partículas con forma anular, si se disponen paralelas al plano de observación (Figura 2.2 B: a y a'), o bien como un par de líneas más o menos paralelas, en forma de V o V invertida, según se oriente el eje de simetría (Figura 2.2 B: b-b', c-c' y d-d'). Estas columnas de NCP también pueden interactuar entre ellas bajo condiciones iónicas intermedias formando bicapas y, aunque en general las partículas se apilan de forma paralela exponiendo su proyección lateral, también se han observado proyecciones circulares, lo que indica cierta libertad de movimiento (Leforestier et al., 2001). Las NCP presentan una clara sensibilidad a las condiciones iónicas del medio, por lo que las variaciones en la fuerza iónica dentro de la célula podrían determinar cambios funcionales y estructurales debidos a la formación de diversas estructuras de cromatina de orden superior (Mangenot et al., 2003).

Estudios de cristalografía de rayos X han mostrado que la interacción entre caras laterales implica regiones ácidas de las histonas H2A y H2B, así como también algunos residuos del extremo N-terminal de H4 (Luger et al., 1997; Harp et al., 2000; White et al., 2001). Los autores proponen que esta interacción es fundamental para la formación de estructuras de orden superior. De hecho, algunos modelos propuestos para la fibra de cromatina de 30 nm se basan en la interacción lateral entre caras laterales de nucleosomas. Es el caso del modelo de DNA *linker* cruzado (Schalch et al., 2005), según el cual los nucleosomas se apilan formando una hélice de doble origen, o de los modelos basados en la interdigitación de nucleosomas (Daban y Bermúdez, 1998; Robinson et al., 2006).

Es posible que cambios en el medio determinen cambios en la estructura y la función de la cromatina. Las estructuras descritas previamente, puede que no existan como tal en el interior del núcleo, pero si que pueden estar mostrando indicios sobre sus propiedades dinámicas. La gran cantidad de publicaciones acerca de la importancia de las interacciones cara-cara entre nucleosomas sugiere que este tipo de interacción es crucial para la formación de estructuras de orden superior (Daban, 2003).

Capítulo 3

La fibra de cromatina

Los nucleosomas constituyen el primer nivel de plegamiento de la cromatina. La fibra de 30 nm fue considerada durante mucho tiempo el segundo nivel de compactación de la cromatina, ya que permitía solucionar en parte el problema del empaquetamiento del DNA en el interior de la célula. La evolución de las técnicas experimentales ha llevado a la aparición de numerosos modelos que intentan explicar el plegamiento del filamento de nucleosomas. Como se verá en el presente capítulo, algunos de los modelos propuestos son contradictorios, lo que pone de manifiesto el poco conocimiento real que tenemos acerca de los procesos de plegamiento de la cromatina. De hecho, actualmente muchos autores cuestionan la existencia de la fibra de 30 nm en la célula.

3.1. Introducción a la fibra de cromatina

Se han propuesto diversos modelos para la estructura de la fibra de cromatina (Boulé et al., 2015). Las primeras micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de fibras de cromatina obtenidas mediante tinción negativa (Finch y Klug, 1976; Rattner y Hamkalo, 1979) mostraban largos filamentos de ~ 30 nm de diámetro donde, aparentemente, eran visibles los nucleosomas (Figura 3.1 A y E). Algunas de estas fibras mostraban estriaciones transversales que llevaron a los autores a proponer el modelo del solenoide para la fibra de cromatina, según el cual los nucleosomas siguen una trayectoria helicoidal con un paso de rosca de ~ 11 nm y ~ 6 nucleosomas por vuelta (Widom y Klug, 1985; Widom, 1986). En esta estructura, el filamento de cromatina se enrolla manteniendo un contacto parcial entre nucleosomas adyacentes, y el DNA *linker* se distribuye por el interior de la fibra siguiendo también una trayectoria helicoidal.

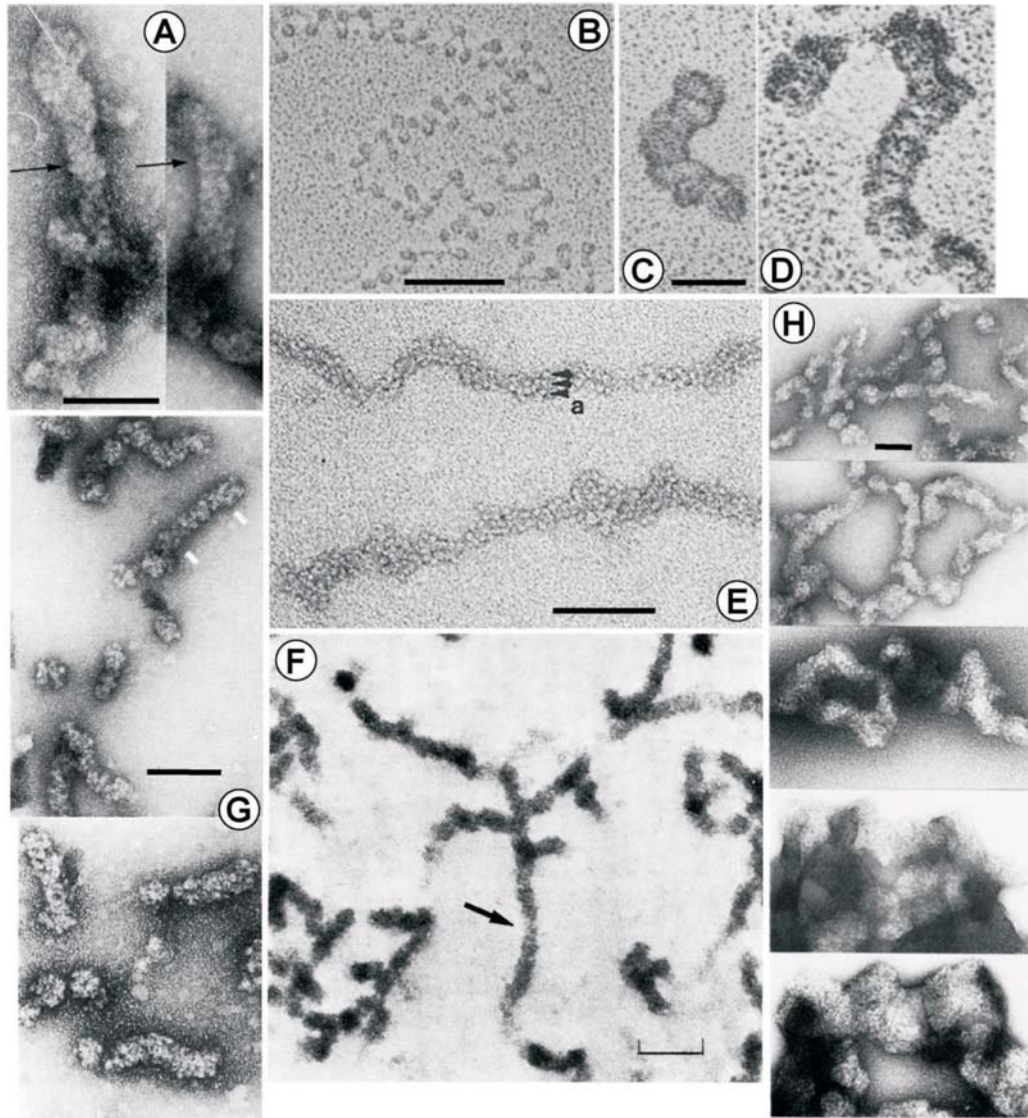


Figura 3.1: Micrografías de TEM de fibras de cromatina. Fibras observadas a partir de cromatina de diversas procedencias en: **A** Finch y Klug (1976), **B-D** Thoma et al. (1979), **E** Rattner y Hamkalo (1979), **F** Subirana et al. (1985), **G** Williams et al. (1986), **H** Widom (1986). Barras: 50 nm, **C** y **D**; 100 nm **A-B** y **E-H**. Fuente: Daban (2011), Figura 1.

Estos primeros estudios pusieron de manifiesto la importancia de las condiciones iónicas (presencia de iones di/trivalentes) en el medio, así como la presencia de la histona H1 para el ensamblamiento de estructuras de orden superior (Thoma et al., 1979). Otros estudios estructurales mediante AFM han mostrado también que la ausencia de iones en el medio compromete la formación de estructuras de orden superior, ya que bajo estas condiciones los nucleosomas siguen siendo visibles como entidades individuales, mientras que ligeros cambios en la fuerza iónica del medio son capaces de provocar la compactación del material (Zlatanova et al., 1994; Leuba et al., 1994).

Los modelos presentados en la Figura 3.2 son los más representativos. El modelo del solenoide está esquematizado en la Figura 3.2 A. Posteriormente, otros autores demostraron que la longitud del DNA *linker* determinaba el diámetro de las fibras observadas (Williams et al., 1986, ver Figura 3.1 G), lo que llevó a proponer el modelo de plegamiento con DNA *linker* cruzado (Figura 3.2 B). Según este modelo, los nucleosomas describen una trayectoria helicoidal donde el DNA *linker* atraviesa diametralmente la parte interna de la hélice. Bednar et al. (1998) emplearon la técnica de la crio-microscopía para obtener imágenes de fibras de cromatina en un estado lo más próximo posible a su estado nativo. El uso de concentraciones iónicas bajas permitió la observación de fibras de nucleosomas que seguían una trayectoria en zig-zag. Sus micrografías mostraban nucleosomas individuales conectados por medio del DNA *linker*, que atravesaba el interior de la fibra (Figura 3.2 C). Más recientemente, aparece el modelo de hélice de doble origen (Dorigo et al., 2004). La estructura cristalográfica de un tetranucleosoma con un corto fragmento de DNA *linker* y en ausencia de la histona H1 apoya también este modelo (ver Figura 3.2 D; Schalch et al., 2005). Los modelos solenoidales con interdigitación de nucleosomas (Figura 3.2 E y F) son compatibles con la elevada compactación de la cromatina observada en presencia de Mg^{2+} (Daban y Bermúdez, 1998; Robinson et al., 2006).

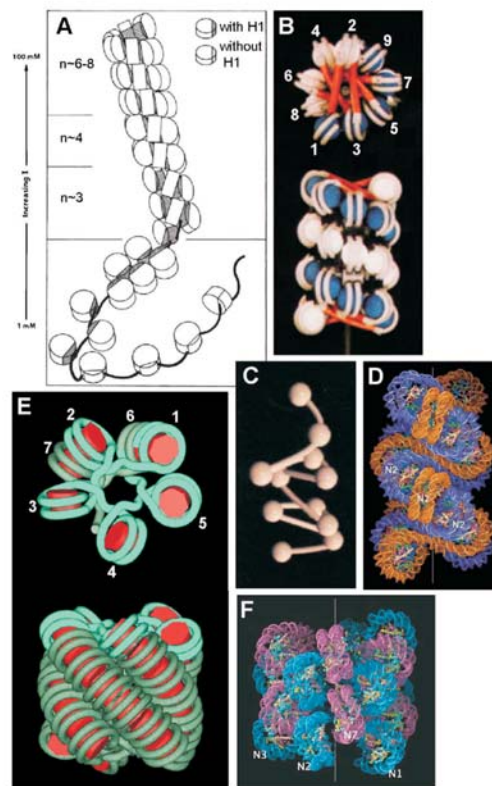


Figura 3.2: Modelos estructurales para la fibra de cromatina de 30 nm. **A** Modelo del solenoide (Thoma et al., 1979). Modelos con DNA de unión cruzado: **B** Williams et al. (1986), **C** Bednar et al. (1998) y **D** Schalch et al. (2005). Modelos de solenoide interdigitado compacto: **E** Daban y Bermúdez (1998) y **F** Robinson et al. (2006). Fuente: Daban (2011), Figura 4.

3.2. El modelo del solenoide

El modelo del solenoide fue el primer modelo que surgió para dar explicación al problema de la compactación de la cromatina en estructuras de orden superior (Finch y Klug, 1976). Tal como se ha indicado en el apartado 3.1, las primeras micrografías de TEM de cromatina en presencia de diversas concentraciones de cationes mostraban fibras de ~ 30 nm que presentaban a su vez pequeñas estriaciones en su interior. Estas estriaciones tenían una dirección transversal al eje longitudinal de la fibra, lo que sugería un plegamiento helicoidal de los nucleosomas en su interior.

El análisis del patrón de difracción de filamentos de cromatina parcialmente orientados permitió proponer una organización tridimensional de los nucleosomas en el interior de esta estructura (Widom y Klug, 1985). El patrón de difracción presentaba una banda ecuatorial de ~ 30 nm, debida probablemente al apilamiento lateral entre fibras de cromatina. En estas primeras observaciones, los autores sugerían que se trataba de estructuras de cristal líquido, más que de estructuras cristalográficas debido a la amplitud de los picos de difracción. Se observaba también una banda amplia de 11 nm, perpendicular a bandas de 2.7, 3.7 y 5.7 nm. Las señales de 2.7 y 3.7 nm eran visibles en todos los tipos de agregados de cromatina estudiados, por lo que debían corresponder a la difracción generada por la estructura interna del nucleosoma. Las señales de 5.7 y 11 nm debían estar relacionadas con las dimensiones de la partícula núcleo. La orientación relativa de las bandas permitía proponer un modelo según el cual los nucleosomas se disponen de forma radial siguiendo una trayectoria helicoidal con 6-7 nucleosomas por vuelta y un paso de rosca de ~ 11 nm. En este modelo, los nucleosomas están dispuestos tal como se muestra en la Figura 3.3, apilados y más o menos paralelos al eje longitudinal de la fibra.

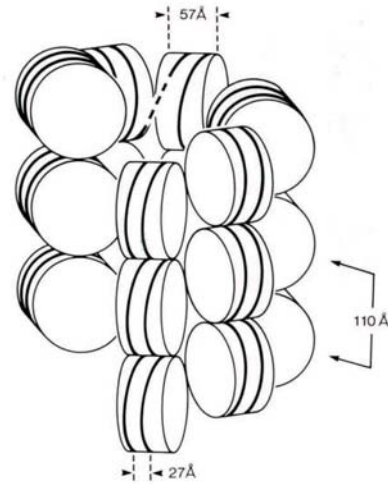


Figura 3.3: Representación esquemática del modelo de solenoide para la fibra de cromatina. Las líneas oblicuas pretenden simular la trayectoria seguida por el DNA en torno al núcleo proteico. Fuente: Widom y Klug (1985), Figura 7.

3.3. Modelos con DNA *linker* cruzado

Según los modelos con DNA *linker* cruzado, los nucleosomas sucesivos describen trayectorias en zig-zag, de manera que ocupan posiciones diametralmente opuestas en la fibra y el DNA *linker* se extiende totalmente ocupando el centro de la fibra.

Williams et al. (1986) propusieron el modelo de hélice de doble origen con DNA *linker* cruzado en base a patrones de difracción de fibras de cromatina y a las observaciones realizadas mediante TEM. Sus patrones de difracción mostraban bandas

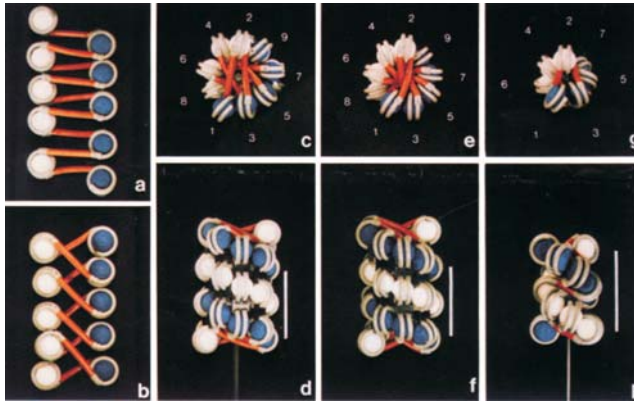


Figura 3.4: Representación esquemática del modelo de doble hélice con DNA *linker* cruzado para la fibra de cromatina. **a-b** Vistas laterales de la fibra extendida. **c-h** Vistas transversal y lateral de fibras de cromatina con DNA *linker* de longitud variable, según el modelo del *linker* cruzado. Fuente: Williams et al. (1986), Figura 2.

a 2.7, 3.8, 6 y 11 nm que se debían a la difracción de los nucleosomas. También observaron la presencia de una banda correspondiente a espaciados superiores que atribuyeron al diámetro de la fibra de cromatina. En este estudio también se observó que la longitud del DNA *linker* determinaba el diámetro de las fibras obtenidas; de manera que a mayor longitud, más grande debía ser la hélice para poder acomodar el DNA en la parte interior. Puede verse una representación de este modelo en la Figura 3.4. Bordas et al. (1986) también propusieron un modelo en zig-zag basado en el análisis de patrones de difracción de cromatina. Según este modelo los nucleosomas describen una trayectoria helicoidal con 3-4 nucleosomas por vuelta y 33 nm de paso de rosca, y el DNA se extiende por la parte central de la hélice. Woodcock et al. (1993) propusieron un modelo similar que permitía acomodar hasta 11.6 nucleosomas por cada 11 nm.

El análisis de la compactación mediante crio-tomografía electrónica de Bednar et al. (1998) mostraba fibras con nucleosomas visibles que seguían trayectorias en zigzag. Los autores determinaron que el ángulo entre la entrada y la salida del DNA en cada nucleosoma de la fibra era de $\sim 34^\circ$. Estas fibras se observaban en condiciones de baja fuerza iónica y adquirirían una mayor compactación a medida que se aumentaba la concentración iónica.

Más tarde, estudios cristalográficos con oligonucleosomas sin histona H1 han proporcionado más evidencias a favor de los modelos con DNA *linker* cruzado. La primera cristalización y análisis de la estructura de un oligómero formado por cuatro nucleosomas ha sido posible en presencia de una elevada concentración de Mg^{2+} (Schalch et al., 2005). El análisis de la estructura muestra que las partículas núcleo se asocian dos a dos, formando parejas unidas a través de sus caras laterales. Los autores proponen un modelo teórico generado mediante apilamiento de la estructura del tetranucleosoma, según el cual los nucleosomas siguen una trayectoria helicoidal de doble origen con el DNA *linker* cruzado entre las dos columnas de nucleosomas (ver Figura 3.5). La estructura permite acomodar 6.6 nucleosomas por cada 11 nm de longitud. Recientemente han sido reconstruidos fragmentos de 12 nucleosomas (sin histona H1) a una resolución de 11 Å utilizando técnicas de crio-microscopía electrónica. Las reconstrucciones muestran fibras helicoidales de doble origen con un diámetro aproximado de ~ 30 nm (Song et al., 2014). Estas fibras presentan una unidad repetitiva formada por cuatro nucleosomas (tetranucleosoma) agrupados en

columnas de a dos y conectados a través del DNA *linker* que se extiende por el centro de la fibra.

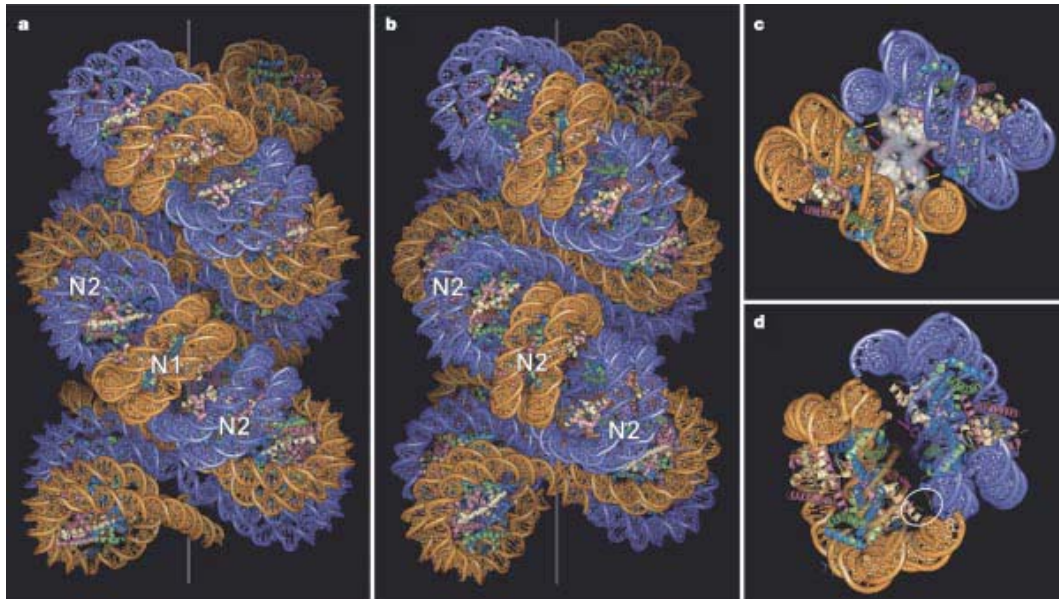


Figura 3.5: Modelo teórico de hélice de doble origen con DNA *linker* cruzado para la fibra de cromatina. a Modelo generado a partir de la rotación/traslación de los nucleosomas N1 y N2 para generar la interfase N1-N2 en el tetranucleosoma. **b** Modelo generado a partir de N2 orientado con su eje de simetría perpendicular al eje longitudinal de la fibra. **c** Interfase entre N1 y N2 según el modelo **a**. **d** Interfase entre nucleosomas equivalentes según el modelo **b** vistos desde el interior de la fibra. Fuente: Schalch et al. (2005), Figura 3.

3.4. El solenoide interdigitado compacto

Los modelos propuestos eran capaces de acomodar cada vez más nucleosomas por vuelta, pero eran insuficientes para dar explicación a la elevada compactación de las estructuras de orden superior. El modelo del solenoide interdigitado compacto fue propuesto en nuestro laboratorio y permitía explicar la presencia de un mayor número de nucleosomas por vuelta por medio de la interdigitación entre nucleosomas de vueltas sucesivas.

Micrografías de TEM de fragmentos de cromatina en presencia de 1.7 mM de Mg^{2+} mostraban, sobre la superficie de las rejillas de microscopía, unas estructuras circulares cuyo diámetro permanecía constante independientemente de la longitud de los fragmentos (Bartolomé et al., 1994; Bermúdez et al., 1998). El sombreado unidireccional de las muestras permitió determinar la altura de estas estructuras, observándose un aumento de la misma a medida que aumentaba la longitud de los fragmentos. Las estructuras observadas presentaban unos rasgos comunes: un contorno intensificado debido a una mayor deposición de platino, una región anular entre el centro y la periferia y un agujero central. En la región anular aparecían estrías que podían corresponder a vistas laterales de nucleosomas. El agujero central presentaba cierta heterogeneidad, probablemente debida a la ocupación variable por parte del DNA *linker*. Estas estructuras llevaron a proponer el modelo del solenoide

interdigitado compacto para la fibra de cromatina (Daban y Bermúdez, 1998) según el cual los nucleosomas se disponen de forma helicoidal orientando su eje de simetría en dirección perpendicular al eje longitudinal de la fibra. La interdigitación entre vueltas de hélice sucesivas permite el contacto entre caras de nucleosomas y hace que esta estructura sea altamente compacta, pudiendo ensamblar hasta 14 nucleosomas por cada 11 nm de longitud. Según el número de nucleosomas por vuelta, la hélice primaria puede estar formada, a su vez, por hasta 6 hélices secundarias, que crean un agujero central que permite acomodar DNA *linker* de longitud variable (ver Figura 3.6). Experimentos de AFM de fragmentos de cromatina en solución llevados a cabo empleando condiciones iónicas interfásicas mostraban el mismo tipo de agregados de cromatina observados en las micrografías de TEM (Caño et al., 2006).

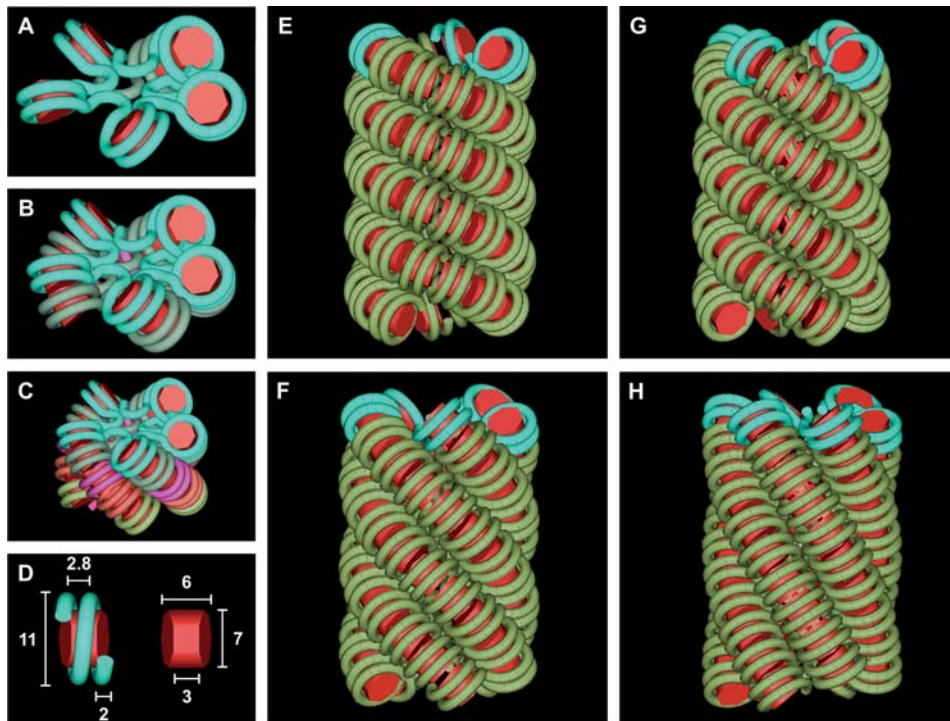


Figura 3.6: Modelo de solenoide interdigitado compacto para la fibra de cromatina. **A-C** Se muestra el DNA perteneciente a cada vuelta de hélice primaria en diferente color. Los nucleosomas están inclinados permitiendo la interdigitación entre vueltas sucesivas. **E-H** Familia de hélices de nucleosomas interdigitados. Hélices primarias con 2.80, 3.76, 4.74 y 5.77 nucleosomas por vuelta y con 3, 4, 5 y 6 hélices secundarias respectivamente. **D** Dimensión del nucleosoma (en nm). Fuente: Daban y Bermúdez (1998), Figura 1.

Más recientemente, micrografías de TEM y crio-TEM de *arrays* de nucleosomas reconstituidos en presencia de 1.6 mM de Mg^{2+} empleando longitudes variables de DNA *linker* mostraron también fibras helicoidales con un elevado grado de compactación como las que se muestran en las Figuras 3.2 F y 3.7. Esta elevada compactación es explicable únicamente a partir de la interdigitación entre nucleosomas de vueltas sucesivas (Robinson et al., 2006). Según la longitud del DNA *linker*, los autores diferenciaban dos tipos de fibras. Un DNA *linker* con una longitud menor que 40 pb producía fibras de ~ 33 nm de diámetro, mientras que una longitud de

50-70 pb producía fibras de hasta 44 nm de diámetro. La estructura era capaz de acomodar de 11 a 15 nucleosomas por cada 11 nm de longitud. La vista superior de estas fibras de cromatina en micrografías de crio-TEM (Figura 3.7 B) presentaba la misma estructura que los agregados de cromatina que dieron pie al modelo del solenoide interdigitado compacto.

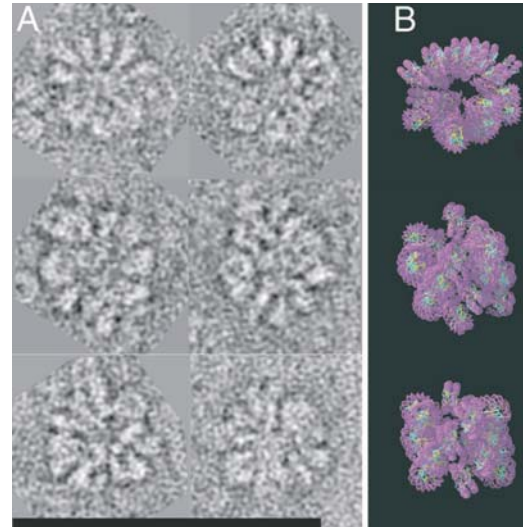


Figura 3.7: Modelo helicoidal interdigitado compacto para la fibra de cromatina. Comparación de la imagen real con el modelo creado. **A** Imágenes de crio-microscopía electrónica de *arrays* de cromatina de 22 nucleosomas. Barra: 100 nm. **B** Diferentes vistas del modelo creado. Fuente: Robinson et al. (2006), Figura 4.

3.5. Modelaje dinámico

La cantidad de documentación que se puede encontrar actualmente acerca de la forma en que los nucleosomas interaccionan lateralmente entre sí para formar densas estructuras de ~ 30 nm pone de manifiesto que este tema sigue siendo gran interés. Son muchos los modelos teóricos surgidos a raíz de los avances en estudios de modelaje. Estos modelos son cada vez más refinados e intentan definir con exactitud la orientación de los nucleosomas en la fibra y el efecto de la unión de la histona H1 teniendo en cuenta energías de interacción y efectos estéricos, para tratar de buscar conformaciones estables. Modelos como el de Depken y Schiessel (2009) tratan de integrar las observaciones experimentales que se tienen hasta la fecha, procurando minimizar la distorsión en la estructura del nucleosoma individual y del DNA *linker*. El método de simulación de Monte Carlo ha permitido modelar fibras altamente estables que permiten determinar la orientación preferente de los nucleosomas, el paso de rosca y la longitud del DNA *linker*. Según estos estudios, de entre todos los modelos propuestos en base a evidencias experimentales, el modelo del solenoide interdigitado compacto es el que presenta una mayor estabilidad dinámica (Kepper et al., 2008; Stehr et al., 2010; Collepardo-Guevara y Schlick, 2014).

Capítulo 4

Estructura de la cromatina a lo largo del ciclo celular

La célula, durante el tiempo que dura su vida, está sometida a transformaciones continuas que le permiten crecer, madurar, especializarse y dividirse. Estas variaciones temporales se conocen por el nombre de ciclo celular. La cromatina, por su parte, debe ser una estructura dinámica, que permita la expresión de genes cuando sean requeridos, pero también su protección cuando la célula va a dividirse. En este capítulo se detalla el escaso conocimiento existente acerca de la estructura de la cromatina interfásica, así como también la estructura de los cromosomas metafásicos.

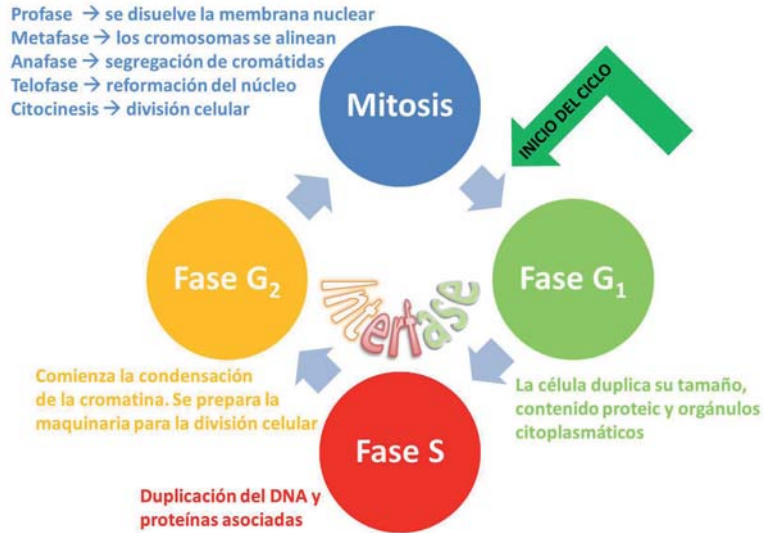
4.1. El ciclo celular

El ciclo celular se encarga de duplicar el material genético de la célula y proporcionar a cada célula hija una copia exacta del mismo. Este proceso se subdivide en 4 fases: G_1 , S, G_2 y M (ver Figura 4.1). Las fases G_1 , S y G_2 comprenden la interfase y la fase M corresponde a la mitosis (Alberts et al., 2008). El ciclo comienza en fase G_1 , durante la cual la célula crece y se encarga de duplicar su contenido proteico y orgánulos citoplasmáticos. Durante esta fase también comprueba que las condiciones externas sean favorables para la división. Si la célula recibe señales desfavorables del entorno, puede producirse lo que se conoce como arresto en G_0 , un estado de reposo que se extenderá hasta que pueda producirse la división celular. Si las señales son favorables, cerca del final de la fase G_1 se pone en marcha la maquinaria de replicación del DNA. La duplicación del DNA ocurre durante la fase de síntesis o fase S. Cuando todo el material genético ha sido duplicado se entra en la fase G_2 ; la célula comprueba que no se hayan producido errores y prepara la maquinaria para la división celular. Se inicia entonces la mitosis, y la cromatina se contrae hasta alcanzar el punto de máxima compactación con la formación del cromosoma condensado. La membrana nuclear desaparece y los cromosomas (cada uno formado por dos cromátidas hermanas) son guiados por los microtúbulos del huso mitótico hacia el centro de la célula. Durante la metafase los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial del huso mitótico. Da comienzo entonces la anafase, con el inicio de la segregación de las cromátidas hermanas hacia los polos de la célula. Cada copia de cromosoma

se coloca en un extremo opuesto para descondensarse y reformar el núcleo celular (telofase). En este punto se produce la citocinesis, proceso por el cual la célula es dividida en dos células hijas, cada una con una copia del genoma de la célula madre.

Figura 4.1: Fases del ciclo celular.

La célula crece y se prepara para la replicación del DNA en la fase G₁. La replicación del DNA tiene lugar durante la fase S. Durante la fase G₂ se reparan posibles errores en el DNA y la célula se prepara para la división. Durante la mitosis cada copia de cromosomas se dirige a un extremo de la célula y finalmente el núcleo y el citoplasma se dividen en la citocinesis.



4.2. Condiciones iónicas a lo largo del ciclo celular

Las condiciones iónicas del medio han demostrado tener un papel importante en el grado de compactación de la cromatina y son muchos los estudios que han mostrado que los iones mono y divalentes son esenciales para el mantenimiento de estructuras de orden superior, ya que su carga positiva neutraliza las cargas negativas de los grupos fosfato presentes en el DNA. Las poliaminas esperimina y espedina parecen tener también cierta implicación en el mantenimiento de la estructura de la cromatina. Algunos estudios como el de Watanabe et al. (1991) detectan su presencia junto al DNA. Sin embargo, según Laitinen et al. (1998) las poliaminas afectan a la organización de la cromatina *in vitro* pero no tienen un papel regulador en la compactación de la cromatina a lo largo del ciclo celular, sino que parecen tener implicación en la progresión a través de la fase S. Experimentos realizados mediante microscopía iónica de barrido han permitido cuantificar las concentraciones de Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ y K⁺ a lo largo del ciclo celular (Strick et al., 2001). Los iones monovalentes parecen jugar un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura de la cromatina ya que su concentración se mantiene más o menos constante. Los iones de Ca²⁺ y Mg²⁺ sufren una redistribución a lo largo del ciclo celular afectando enormemente a la compactación del material. Concretamente, la concentración de Mg²⁺ en el núcleo interfásico es de 2-4 mM, mientras que en la cromatina mitótica es de 5-17 mM y alcanza su máximo de 12-22 mM en el cromosoma metafásico (ver Tabla 4.1).

	Ca			Mg		
	Interfase	Mitosis	I:M	Interfase	Mitosis	I:M
Núcleo	4-6 (5.0)	12-24 (18.0)	0.28:1	2-4 (3.0)	5-17 (11.0)	0.27:1
Citosol	5-8 (6.5)	4-6 (5.0)	1.3:1	2-3 (2.5)	2-3 (2.5)	1:1
Cromosoma	-	20-32 (26.0)	-	-	12-22 (17.0)	-
Célula	7-9 (8.0)	4-8 (6.0)	1.3:1	1-3 (2.0)	1-3 (2.0)	1:1

Tabla 4.1: Concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} a lo largo del ciclo celular. Rango (y promedio) de la concentración de cationes en mM. La primera línea se refiere a medidas realizadas en zonas de alta intensidad en núcleos y cromatina. La segunda línea indica la concentración media en el citosol celular. La tercera línea muestra valores promediados a lo largo del cromosoma metafásico. La cuarta línea representa la concentración total de Ca^{2+} y Mg^{2+} promediadas para la totalidad de la célula. **I:M** corresponde a la relación de concentración de cada ión entre la interfase y la mitosis. Fuente: Strick et al. (2001), Tabla 1.

4.3. Organización de la cromatina en el interior del núcleo interfásico

La mayoría del conocimiento que se tiene acerca de la organización de la cromatina se ha obtenido *in vitro* a partir de cromatina purificada o *arrays* de nucleosomas reconstituidos. Estos experimentos han dado pie a la aparición de muchos modelos, pero ninguno de ellos es capaz de explicar la organización funcional de la cromatina en el núcleo celular (Horowitz-Scherer y Woodcock, 2006). Algunos trabajos de microscopía han intentado obtener una imagen más cercana a la realidad biológica, estudiando la cromatina en el interior de núcleos interfásicos mediante TEM de energía filtrada (EFTEM) (Dehghani et al., 2005). Los autores proponen un modelo de entramado de fibras de $\sim 10\text{-}30$ nm de diámetros dispuestas de forma más o menos desordenada. Otros estudios realizados mediante crio-microscopía electrónica de secciones vítreas (CEMOVIS), muestran que la cromatina de núcleos interfásicos presenta una textura densa y muy homogénea (Bouchet-Marquis et al., 2006). Las regiones más compactas de cromatina tienen una textura granular (debida a nucleosomas) que no es compatible con la agrupación de fibras de 30 nm. Lo cierto es que la presencia de la fibra de 30 nm en el núcleo interfásico está siendo ampliamente cuestionada (Tremethick, 2007; van Holde y Zlatanova, 2007). Otros estudios estructurales que han empleado también la técnica de CEMOVIS proponen que tanto la cromatina interfásica como los cromosomas metafásicos presentan una estructura en la cual el filamento de cromatina está desordenado e interdigitado y forma una estructura dinámica similar a la de un polímero fundido (ver Figura 4.2; Maeshima et al., 2010).

La aparición de los nuevos métodos de inmunoprecipitación de la cromatina, ChIP, y de captura de la conformación cromosómica, 3C y sus variantes, así como los avances en tecnología de secuenciación de alto rendimiento, han proporcionado una gran información acerca de las interacciones entre secuencias específicas de DNA en la cromatina que pueden estar muy alejadas entre sí a nivel de secuencia. Este tipo de experimentos pueden ayudar a comprender la formación de estructuras de orden

superior. Los resultados de Dekker (2008) combinando la técnica 3C y el modelaje de polímeros no son compatibles con la presencia de fibras de 30 nm en regiones transcripcionalmente activas.

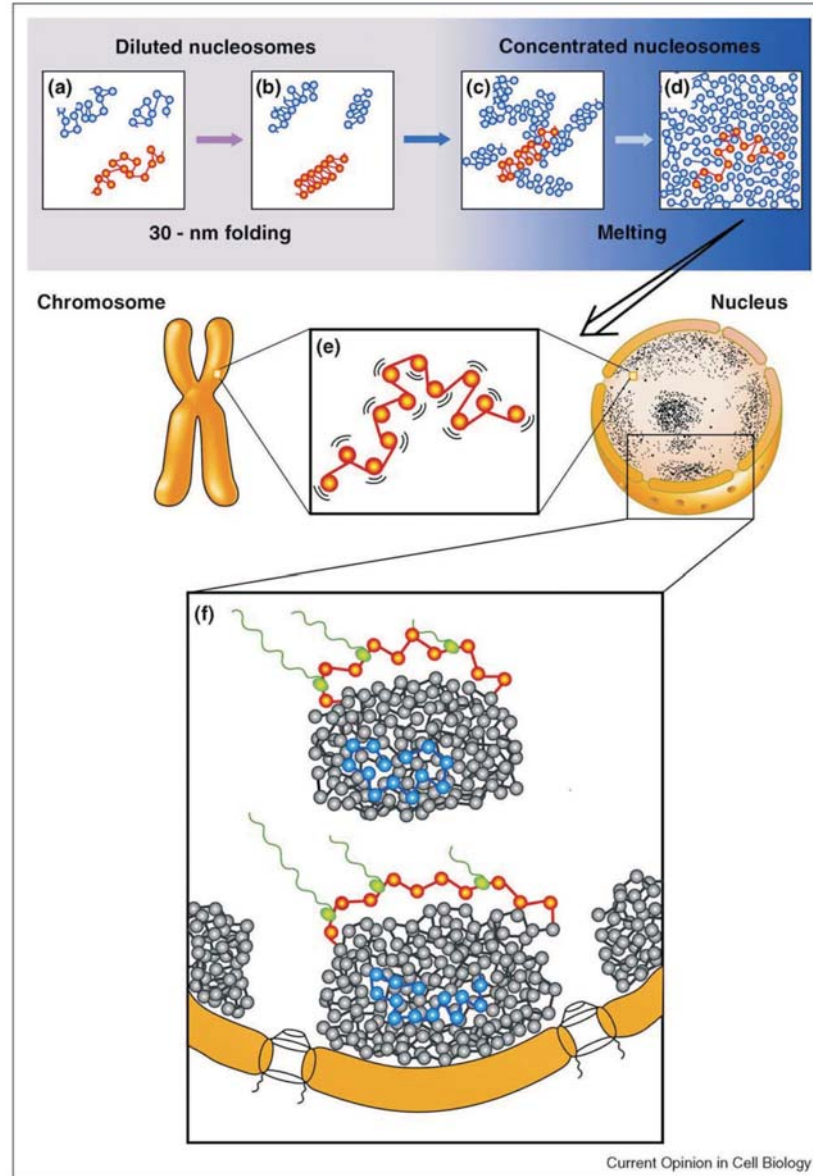


Figura 4.2: Modelo de polímero fundido para la cromatina. a,b Bajo condiciones diluidas, las fibras de nucleosomas son flexibles y se compactan a través de asociaciones entre nucleosomas próximos, formando fibras de 30 nm. Un aumento en la concentración de nucleosomas provoca la interacción entre fibras, que interfiere a su vez con las interacciones intrafibra. c Nucleosomas de fibras adyacentes se interdigitan, lo que provoca irregularidades en la fibra y genera un estado de polímero fundido (d). e El estado de polímero fundido implica fibras altamente dinámicas. f El silenciado de genes durante la transcripción puede establecerse a través del bloqueo en regiones de cromatina más compacta; las regiones activas transcripcionalmente se dispondrían en la superficie de las regiones de cromatina compacta. Fuente: Maeshima et al. (2010), Figura 3.

Por otra parte, las técnicas de microscopía de fluorescencia de alta resolución combinadas con la simulación por ordenador permiten obtener una imagen de la distribución de nucleosomas en núcleos y células íntegras. Ricci et al. (2015) proponen que los nucleosomas forman agrupaciones de tamaño variable a lo largo de la fibra de cromatina, que están separadas entre ellas por regiones carentes de nucleosomas. Los autores señalan que existe una correlación entre el tamaño, la distribución o la compactación de estos agregados y la accesibilidad de la cromatina. Los agregados grandes y compactos están asociados a la heterocromatina (cromatina inaccesible o cerrada), mientras que los agregados pequeños corresponden a regiones de eucromatina, caracterizados a su vez por la presencia de RNA polimerasa II. Los autores no descartan la posibilidad de que la organización interna de estos agregados de nucleosomas pueda ser explicada mediante alguno de los modelos propuestos para la fibra de 30 nm.

4.4. Modelos estructurales para el cromosoma metafásico

La formación de estructuras altamente compactas como los cromosomas es un requisito fundamental para la transmisión de la información genética durante la división celular, sin embargo, todavía no se tiene una idea clara acerca de los cambios estructurales que llevan a la formación de dichas estructuras. Las primeras micrografías de TEM de suspensiones acuosas de cromosomas no fijados, depositados directamente sobre rejillas de microscopía, mostraban cromosomas altamente desestructurados de los que emanaban largos filamentos (DuPraw, 1966). Más tarde, Paulson y Laemmli (1977) depositaron cromosomas previamente desprovistos de la histona H1 sobre rejillas para TEM. Sus micrografías mostraban gran cantidad de lazos de DNA de ~ 30 -90 kpb unidos a un bastidor de proteínas no histonas. Estas observaciones llevaron a los autores a proponer el modelo de cromosoma metafásico basado en lazos anclados a un esqueleto proteico (Figura 4.3 A). La eliminación de los iones divalentes mediante la incubación con el agente quelante EDTA, provocaba la misma descompactación de los cromosomas que provocaban los medios con baja fuerza iónica. En estas condiciones, los cromosomas se observaban en forma de largas fibras de cromatina ancladas a un esqueleto proteico denso (Marsden y Laemmli, 1979; Earnshaw y Laemmli, 1983). El tamaño de las fibras observadas era compatible con la fibra de ~ 30 nm. Otros estudios pusieron de manifiesto la capacidad de las fibras observadas de adoptar un plegamiento helicoidal (Rattner y Lin, 1985). Estos autores sugirieron además que los lazos que emanaban del esqueleto proteico podían, a su vez, plegarse de forma helicoidal para formar fibras de ~ 200 -300 nm, como se muestra en la Figura 4.3 B.

Más recientemente, Kireeva et al. (2004) combinaron técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión para estudiar núcleos sincronizados en profase, con el fin de observar el proceso de plegamiento del cromosoma. Su estudio revelaba tres grandes cambios estructurales durante la profase. Las primeras evidencias de la compactación de la cromatina en el núcleo marcaban el inicio de la profase. Mientras que el núcleo en fase G₂ presentaba una distribución homogénea

y fibrilar de la cromatina, durante la profase temprana se observaban pequeñas regiones más densas, aunque la textura fibrilar se mantenía. La transición a la profase intermedia podía identificarse por el aumento de la compactación de la cromatina y la aparición de cromosomas con un diámetro de $\sim 0.4-0.5 \mu\text{m}$. Comenzaban a reconocerse las cromátidas hermanas, pero las fibras aún eran visibles. La tercera transición era visible por el aumento considerable del tamaño de los cromosomas, que aumentaban su diámetro hasta $\sim 0.8-1.0 \mu\text{m}$; su longitud oscilaba entre 1 y 3 μm . Los autores mostraron también una correlación entre estas tres transiciones estructurales y la distribución de la topoisomerasa I y la condensina SMC2. Ambas proteínas presentaban una distribución homogénea a lo largo de la cromátida al inicio de la profase. Con el aumento del diámetro de las cromátidas, podía observarse como estas proteínas se redistribuían a lo largo del eje central longitudinal de las cromátidas y mantenían esa distribución hasta el final de la profase. Las evidencias descritas llevaron a los autores a proponer el modelo de plegamiento jerárquico para el cromosoma metafásico (ver Figura 4.3 C), según el cual la formación del cromosoma es un proceso cooperativo que implica tres estadios: 1) la condensación de las largas fibras de cromatina dando lugar al cromosoma prometafásico temprano, todavía con textura fibrilar; 2) el aumento de la compactación de la cromatina, que hace visibles las cromátidas hermanas y 3) la formación del cromosoma metafásico.

Poonperm et al. (2015) han empleado la técnica 3D-SIM¹ combinada con FIB-SEM². La primera permite visualizar la localización de proteínas individuales, y la segunda ofrece una visión de conjunto. La combinación de estas técnicas permite obtener reconstrucciones tridimensionales que muestran la distribución de las proteínas analizadas. Los resultados de este estudio muestran la presencia de un esqueleto proteico helicoidal que se extiende a lo largo de las cromátidas (Figura 4.3 D).

Poirier y Marko (2002) llevaron a cabo un estudio de micromecánica con el objetivo de determinar la elasticidad del cromosoma y evaluar cambios estructurales debidos a la pérdida de conectividad cuando estos eran tratados con nucleasa micrococcal u otras enzimas de restricción. Los cromosomas eran extendidos desde sus extremos mediante dos micropipetas. Inicialmente, sometían los cromosomas a una fuerza de $\sim 0.1 \text{ nN}$ y a continuación añadían nucleasa micrococcal o enzimas de restricción y monitorizaban la fuerza soportada por las micropipetas. Los autores observaron que tras la adición de nucleasa micrococcal sobre el cromosoma, la fuerza disminuía prácticamente a cero después de 60 s de digestión. Sin embargo, la morfología del cromosoma permanecía invariable durante $\sim 500 \text{ s}$. La digestión con enzimas de restricción provocaba resultados similares. Si la frecuencia de corte de la enzima seleccionada era elevada, podían provocar la completa desintegración

¹Esta técnica permite adquirir imágenes de fluorescencia de alta resolución de diferentes secciones de una muestra para obtener mapas tridimensionales de moléculas marcadas fluorescentemente.

²Esta técnica consiste en la implementación de un cañón de iones (FIB) en un microscopio SEM que se emplea para la adquisición de proyecciones. En el FIB, iones de Ga^+ son acelerados y el haz iónico generado se focaliza sobre la muestra para “pulirla” y obtener secciones sucesivas. Cada vez que se genera una nueva sección se realizan adquisiciones a diferentes inclinaciones de la muestra. Finalmente, las proyecciones son analizadas para obtener las reconstrucciones tridimensionales. Es una técnica semejante a la empleada por Strick et al. (2001) para el análisis de la composición iónica de los cromosomas (ver sección 4.2).

del DNA en pocos segundos. De los resultados se desprende que el DNA debe ser el encargado de mantener la cohesión en los cromosomas, ya que su degradación provoca la desintegración del cromosoma. En base a estas evidencias, los autores proponen un modelo de entramado o red de cromatina donde el DNA es la base de la integridad mecánica del cromosoma (Figura 4.3 F). Estos resultados descartan la presencia de un bastidor proteico que mantenga la estructura del cromosoma.

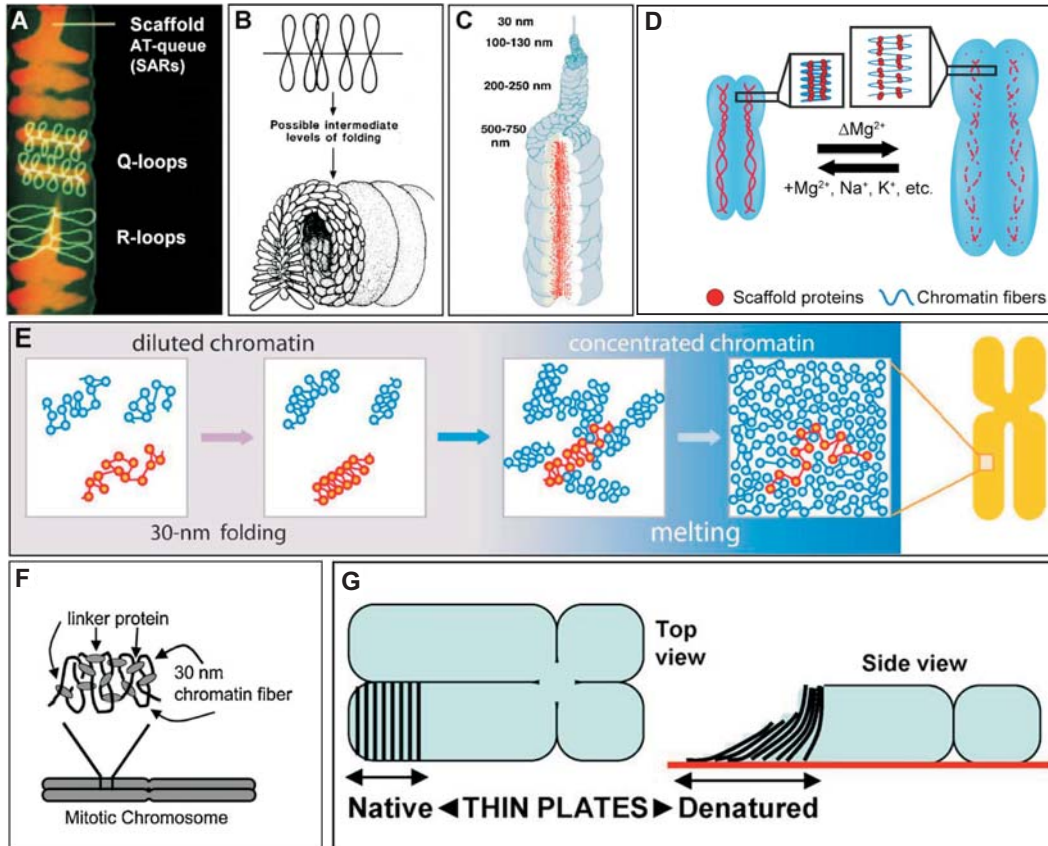


Figura 4.3: Modelos estructurales para el cromosoma metafásico. **A** Modelo de lazos anclados a esqueleto proteico de Saitoh y Laemmli (1994), **B** Modelo de lazos radiales y plegamiento helicoidal de Rattner y Lin (1985), **C** Modelo de plegamiento jerárquico de Kireeva et al. (2004), **D** Modelo de esqueleto proteico de Poonperm et al. (2015), **E** Modelo de polímero fundido de Eltsov et al. (2008), **F** Modelo reticular de Poirier y Marko (2002) y **G** Modelo de placas de cromatina de Gállego et al. (2009).

Los modelos estructurales para el cromosoma metafásico comentados hasta el momento han sido propuestos a partir de evidencias obtenidas del estudio de cromosomas preparados en medios acuosos con muy baja fuerza iónica o en medios orgánicos. En el apartado 4.2 ya se ha puesto de manifiesto la importancia de los iones divalentes y trivalentes para el mantenimiento de estructuras de orden superior. Teniendo este hecho en cuenta, algunos autores han intentado mantener en sus experimentos unas condiciones cercanas al estado fisiológico. Experimentos de criomicroscopía electrónica CEMOVIS muestran que los cromosomas en la célula presentan una textura homogénea granular, debida a la presencia de nucleosomas

muy próximos entre sí. Esta observación es incompatible con la presencia de fibras de 30 nm (Eltsov et al., 2008). En base a sus resultados, los autores proponen una estructura desordenada pero altamente compacta (ver Figura 4.3 E) similar a un polímero fundido para el cromosoma metafásico. Este modelo permite explicar fácilmente la difusión que presentan muchos factores solubles que interactúan con la cromatina, ya que se trata de una estructura dinámica en constante movimiento, y cualquier región es accesible a otras proteínas en todo momento. El segundo problema es la elevada compactación de la cromatina en el interior nuclear. El modelo de polímero fundido es una estructura densa altamente compacta que permite explicar también la elevada concentración de cromatina en el cromosoma metafásico. Los experimentos de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de cromosomas metafásicos tampoco son compatibles con fibras de 30 nm (Nishino et al., 2012).

4.4.1. Modelo de láminas delgadas para el cromosoma metafásico

Este modelo (Figura 4.3 G) fue descrito en nuestro grupo de investigación a raíz del descubrimiento de estructuras laminares alrededor de cromosomas parcialmente desnaturalizados observados mediante TEM. Se incubaron suspensiones de cromosomas procedentes de células HeLa a 37 °C empleando concentraciones iónicas variables. Las micrografías obtenidas mostraban estructuras multilaminares que parecían emanar de los cromosomas (Caravaca et al., 2005). Las técnicas de microscopía electrónica convencional, crio-microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica y tomografía electrónica de muestras deshidratadas han permitido caracterizar estas estructuras en condiciones fisiológicas (Castro-Hartmann et al., 2010; Gállego et al., 2010). Las láminas o placas de cromatina son visibles en torno a cromosomas metafásicos tras la aplicación de tratamientos desnaturalizantes suaves, que permiten el deslizamiento de las láminas y su deposición sobre la superficie de las rejillas de microscopía (Figura 4.4).

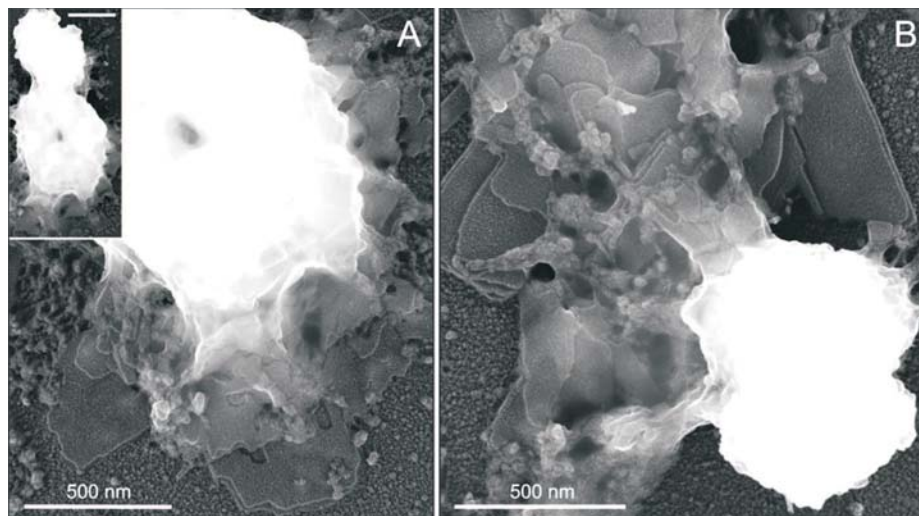


Figura 4.4: Placas de cromatina observadas en torno a cromosomas metafásicos parcialmente desnaturalizados observados mediante TEM. Fuente: Castro-Hartmann et al. (2010), Figura 7.

Cada lámina tiene un grosor de ~ 6 nm y presenta una superficie muy lisa donde no se aprecian estructuras repetitivas; los nucleosomas parecen orientarse de forma irregular (Castro-Hartmann et al., 2010). Según este modelo, las cromátidas del cromosoma están formadas por placas apiladas dispuestas de forma perpendicular al eje longitudinal de las mismas y la aplicación de tratamientos desnaturalizantes suaves hace posible su observación. Para poder justificar el grosor de las placas es necesaria la interdigitación entre capas adyacentes (Figura 4.5).

El estudio de las placas de cromatina en solución ha sido posible gracias a la microscopía de fuerza atómica. Estos experimentos muestran que las placas son estables en solución y en presencia de magnesio (Gállego, 2010; Gállego et al., 2010). La determinación de fuerzas de fricción a escala nanoscópica (nanotribología) de las placas ha permitido establecer que el DNA es el responsable de la estabilidad mecánica de las placas y que estas forman una red bidimensional compacta y elástica. Las placas presentan tamaños muy diversos, debido probablemente a roturas sufridas por la manipulación de la muestra, pero hay placas de gran tamaño visibles en estas preparaciones. Hay placas que tienen una superficie mayor que la sección de la cromátida, lo que sugiere que las placas podrían formar una estructura continua a lo largo del cromosoma (Castro-Hartmann et al., 2010; Daban, 2011).

Experimentos más recientes han mostrado que fragmentos de cromatina procedente de cromosomas metafásicos digeridos con nucleasa micrococcal se asocian espontáneamente en condiciones metafásicas dando lugar a grandes estructuras multilaminares como las observadas en las proximidades de los cromosomas parcialmente desnaturalizados (ver Figura 4.6; Milla y Daban, 2012). Algunas de estas multilaminas formadas por autoasociación presentan capas superficiales ligeramente desestructuradas que se caracterizan por una textura granular, debida posiblemente a nucleosomas parcialmente desorganizados en las placas en formación. Las micrografías muestran también pequeñas estructuras circulares de ~ 30 nm de diámetro, que habían sido previamente descritas como cortas fibras de 30 nm plegadas en forma de solenoide interdigitado compacto (Daban y Bermúdez, 1998, ver apartado 3.4). Estas fibras cortas pueden verse en las proximidades de las placas pero también asociadas, e incluso parcialmente absorbidas por placas en formación. Estos experimentos refuerzan el modelo de láminas delgadas y sugieren que el cromosoma es una estructura auto-organizada. Daban (2014) ha empleado una gran cantidad de datos existentes acerca de las dimensiones de los cromosomas de diversas especies,

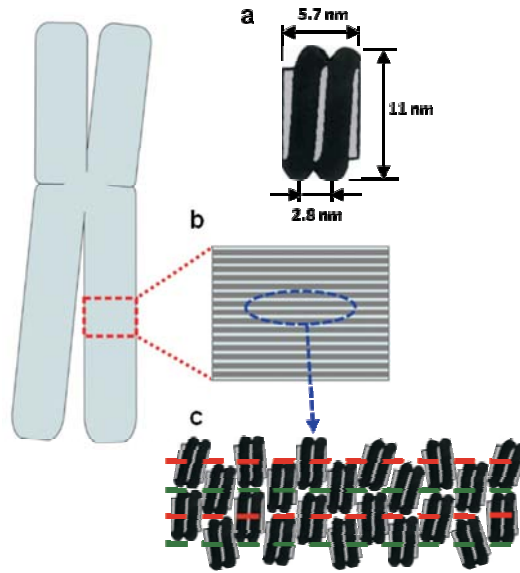


Figura 4.5: Modelo de láminas finas de cromatina para el cromosoma metafásico. a Dimensiones de la partícula núcleo del nucleosoma. b-c Representaciones esquemáticas de la organización multilaminar de la cromatina en el interior del cromosoma.

y sobre estudios de micro- y nano-mecánica de cromosomas y fibras de cromatina, para evaluar en términos energéticos la capacidad de las láminas de cromatina de autoorganizarse para formar una estructura como el cromosoma metafásico. Los resultados del estudio permiten justificar la morfología cilíndrica del cromosoma, su diámetro y longitud e incluso sus propiedades mecánicas .



Figura 4.6: Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina procedente de cromosomas metafásicos. Pueden observarse regiones con textura granular (indicadas mediante asteriscos), posiblemente debidas a nucleosomas desorganizados en proceso de incorporación a las placas. Barra: 500 nm. Fuente: Milla y Daban (2012), Figura S2.

Capítulo 5

Técnicas empleadas

La presente tesis doctoral ha consistido en obtener nuevos datos para ahondar en el conocimiento de la estructura de la cromatina a lo largo del ciclo celular y en el interior de los cromosomas metafásicos. Para ello, se han empleado técnicas novedosas cuyos fundamentos se presentan en este capítulo.

5.1. Citometría de flujo

5.1.1. Fundamentos de la citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite detectar características diferenciadoras de las células gracias a fenómenos de dispersión de la luz y fluorescencia. La fluorescencia es debida a fluorocromos o anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes, que se asocian a componentes específicos de las células. De esta manera, la citometría de flujo permite seleccionar y aislar poblaciones de células con características comunes. La técnica *fluorescence activated cell sorting* (FACS) fue desarrollada para separar células del sistema inmunitario con el fin de determinar su función. La técnica FACS emplea láseres de diversas longitudes de onda para excitar moléculas fluorescentes. Cuando una célula atraviesa el haz láser, se produce la excitación del fluorocromo y la consiguiente emisión fluorescente en todas las direcciones espaciales. Por otra parte, la luz dispersada a ángulos bajos ($0.5-10^\circ$) es proporcional al tamaño de la célula. Además las células pueden marcarse mediante fluorocromos diferentes según sus características, lo que permite discriminar entre poblaciones. Una de las ventajas de los citómetros de flujo es que son herramientas que permiten la monitorización de gran variedad de parámetros al mismo tiempo, haciendo posible la detección de subpoblaciones de células.

Los componentes fundamentales de un citómetro de flujo son: uno o más láseres, un sistema de detección, un sistema hidráulico que controle el flujo de células a través del sistema y un sistema informático que registre las medidas y las procese. La cámara de flujo es la parte instrumental que se encarga de mantener un flujo constante de células a través del circuito y de dirigir las hasta la zona de intersección con el láser. Es necesaria una alineación precisa de los circuitos y un ajuste de la presión que impulsa el flujo, con el fin de que las células lleguen al punto de detección de una en una. El sistema óptico y eléctrico se encarga de determinar la emisión

de fluorescencia a una determinada longitud de onda, transformar los fotones en impulso eléctrico y finalmente generar un valor numérico, que será procesado por el ordenador. El ordenador, mediante software especializado, representa gráficamente la distribución de las células analizadas en una, dos o tres dimensiones, donde cada punto representa una célula. Al final del conteo, todas las partículas analizadas son representadas de manera global mediante un histograma. La representación gráfica más básica es un histograma bidimensional que muestre la fluorescencia en el eje X y el número de eventos en el eje Y.

5.1.2. Separación celular mediante citometría de flujo

Una de las ventajas de los citómetros de flujo actuales es que permiten separar subpoblaciones de células y moléculas según sus características específicas. Para ello, deben poderse marcar de manera selectiva mediante fluorocromos. Una vez se ha marcado la muestra, se hace pasar a través de la cámara de flujo del citómetro. La separación celular es posible debido a que se provoca la vibración de la cámara a frecuencias ultrasónicas mediante un cristal piezoeléctrico, lo que provoca que el flujo se rompa formando pequeñas gotas, cada una con una célula. Las células individuales son dirigidas al punto de iluminación láser, y los detectores se encargan de determinar la intensidad de fluorescencia de cada una. El ordenador recibe los datos, y asigna a cada valor de fluorescencia un canal, de manera que las células que emitan fluorescencia de la misma longitud de onda serán clasificadas en el mismo canal. Cuando las células han superado el punto de iluminación láser son sometidas a un pulso eléctrico que les otorga una carga positiva, negativa o neutra, según el canal al que pertenecen. Finalmente, las placas deflectoras aplican una diferencia de potencial, de forma que cuando cada célula pasa a través de ellas es desviada hacia un tubo colector según la carga que posea. En la Figura 5.1 de la página siguiente puede verse un esquema del proceso de separación. Mediante la técnica de citometría de flujo es posible separar células, pero también otros orgánulos celulares como núcleos o cromosomas. En la presente tesis se ha utilizado para separar núcleos correspondientes a las fases G₁, S y G₂ del ciclo celular.

5.1.3. Separación de células de diversas fases del ciclo celular

Una de las principales aplicaciones de la citometría de flujo es el análisis de células marcadas mediante fluorocromos de unión específica a DNA, que permite determinar de forma rápida la ploidía de las células y por tanto la fase del ciclo celular en la que se encuentran, según el contenido de DNA que presentan.

El análisis del ciclo celular requiere analizar la intensidad de fluorescencia de cada célula, que está relacionada con la cantidad de DNA en su interior (Ormerod, 2000). Cuando una partícula atraviesa el haz láser, la señal de fluorescencia provoca en el detector un pulso de voltaje. Tres parámetros definen cada pulso: su altura (máxima intensidad de fluorescencia), su anchura (tiempo de tránsito a través del láser) y su área, que corresponde a la fluorescencia total de cada partícula. En el caso del análisis del ciclo celular, todas las células se marcan mediante el mismo fluorocromo, por lo que todas pertenecen al mismo canal de fluorescencia. La representación más útil

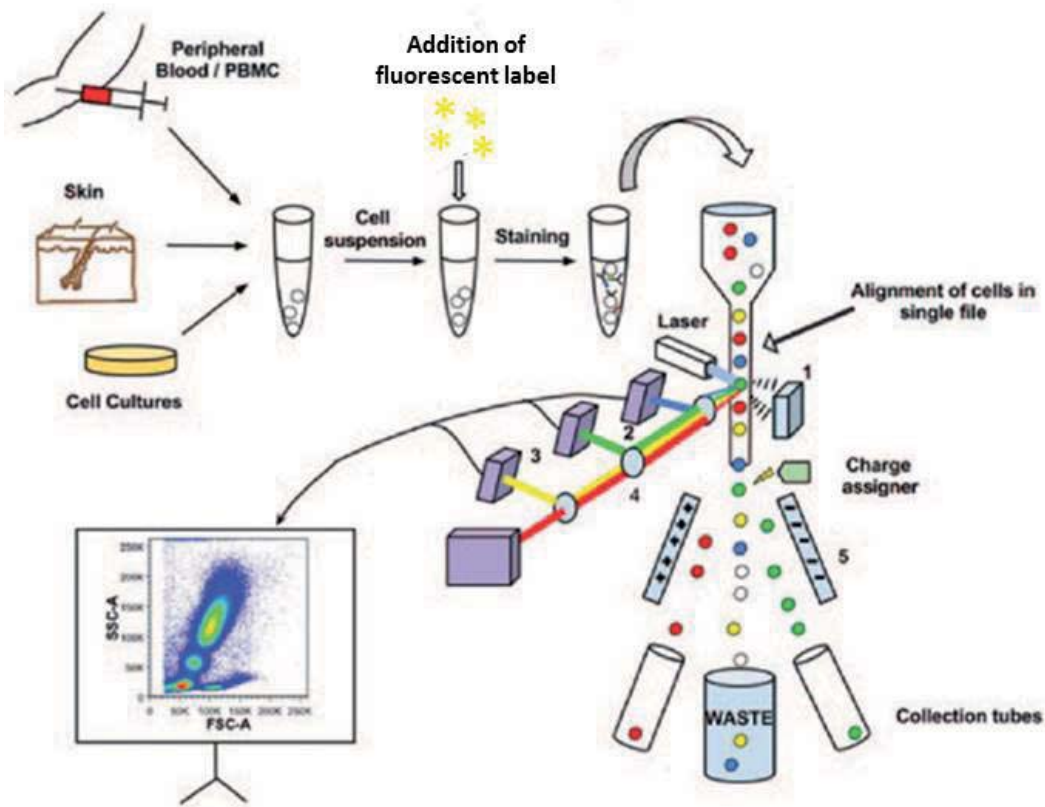


Figura 5.1: Representación esquemática del proceso de separación celular mediante citometría de flujo. Inicialmente, las células son marcadas fluorescentemente. Una vez realizado el marcaje, la suspensión de muestra se hace pasar a través del circuito del citómetro. En un primer momento, se generan las gotas que contienen partículas individuales, y se iluminan mediante un láser. Según la fluorescencia emitida, cada señal es asignada a un canal, que contendrá cada una de las subpoblaciones. La separación se consigue aplicando un diferencia de potencial sobre cada una de las células para proporcionarles carga, y según el canal al que corresponden, las placas deflectoras las desvían hacia un receptáculo u otro. **1** Detector de dispersión frontal, **2** detector de dispersión lateral, **3** detectores de fluorescencia, **4** espejos y monocromadores y **5** placas deflectoras. Fuente: Jahan-Tigh et al. (2012), Figura 1.

para el análisis del ciclo celular es un histograma que muestra la cantidad de células que presentan el mismo área de pulso, esto es, el mismo valor de fluorescencia (ver Figura 5.2). El ciclo celular es un proceso continuo en constante cambio. El DNA requiere un tiempo para duplicarse, la unión al fluorocromo no es exactamente igual en todas las células y la variabilidad existente produce un ensanchamiento de los picos del histograma que provoca el solapamiento entre fases. Sobre el histograma se seleccionan los valores concretos de fluorescencia que corresponden a una subpoblación para que las células sean enviadas al tubo colector correspondiente. Para evitar problemas de contaminación entre subpoblaciones, las zonas seleccionadas deben estar claramente separadas. En esta tesis esta técnica se ha utilizado para separar núcleos correspondientes a las fases G_1 , S y G_2 del ciclo celular.

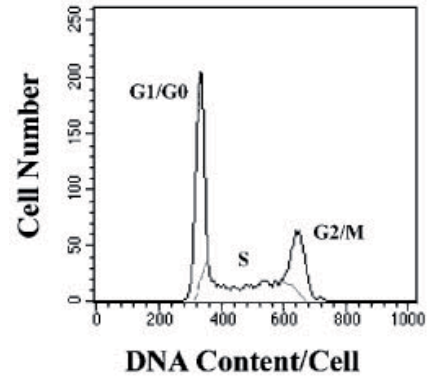


Figura 5.2: Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. El histograma muestra la distribución de las células en función del contenido de DNA. Se indican las regiones correspondientes a cada fase del ciclo celular: G_1 , S y G_2/M . Fuente: Hang y Fox (2004), Figura 1.

5.2. Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Mientras que la microscopía nos permite obtener información detallada de una muestra concreta, las técnicas de dispersión de rayos X proporcionan información genérica de una muestra. Es decir, un perfil de SAXS muestra parámetros estructurales de la muestra promediados en todas las direcciones del espacio. Por esta razón sólo obtendremos información de un tipo de estructura si esta es suficientemente abundante en la muestra. Aún así, estas dos técnicas están íntimamente relacionadas (Schnablegger y Singh, 2013). Ambas requieren que exista un contraste entre la estructura analizada y el medio que la rodea, esto es, debe haber un cambio de densidad electrónica para poder apreciar un objeto. Por otro lado, el objeto en estudio debe ser reconstruido a partir de la información que ofrece la radiación. La microscopía cuenta con un sistema óptico que permite la obtención de una imagen del objeto a partir de los electrones, pero no existe un sistema equivalente para los rayos X. En SAXS la reconstrucción del objeto se realiza matemáticamente. En definitiva, la microscopía y la dispersión de rayos X son dos técnicas íntimamente ligadas que ofrecen información complementaria en cuanto a los rasgos estructurales de las moléculas biológicas.

5.2.1. Fundamentos de la técnica de SAXS

La técnica de SAXS permite el estudio de estructuras biológicas y otras partículas a una resolución de 1-2 nm. Básicamente, consiste en irradiar la muestra mediante un haz de rayos X y registrar el patrón de dispersión de la estructura objeto de estudio mediante un detector. Cuando los rayos X inciden sobre los átomos que forman la estructura, son dispersados en todas las direcciones. La técnica se centra en la

detección de la dispersión a ángulos bajos y resulta altamente resolutive al emplear haces de rayos X de gran intensidad generados mediante radiación de sincrotrón. Las fuentes de luz de sincrotrón generan rayos X mediante la aceleración de partículas cargadas (electrones o positrones).

La dispersión de luz puede ocurrir con o sin pérdida de energía. La técnica de SAXS emplea la dispersión elástica, sin pérdida de energía, conocida también como dispersión de Thomson, para obtener información estructural de una muestra (Schnablegger y Singh, 2013). La dispersión de Thomson ocurre cuando los rayos X chocan contra electrones sin que se produzca una transferencia de energía, y estos comienzan a oscilar emitiendo radiación en la misma frecuencia que la radiación incidente. Cuando las ondas llegan al detector, se producen interferencias que pueden ser constructivas, destructivas o intermedias. Si la interferencia es constructiva se produce un punto brillante en el detector, mientras que una interferencia destructiva produce un punto negro. Entre el blanco y el negro existe todo un abanico de intensidades según el grado de interferencia entre las ondas. El resultado es un patrón de interferencia bidimensional que es característico de la estructura interna de cada muestra. Cualquiera que sea el detector empleado, únicamente obtendremos información acerca de la intensidad de las interferencias, por lo que la interpretación de los datos de SAXS es, generalmente, una tarea complicada que requiere de un conocimiento previo mínimo acerca de la estructura de la muestra.

Los patrones de dispersión o *scattering* suelen representarse en función de q :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \times \sin \phi \quad (5.1)$$

donde λ corresponde a la longitud de onda (en nm) y 2ϕ es el ángulo de *scattering*. También se suele emplear el vector de *scattering* $S = q/2\pi$ en vez de q , ya que su valor inverso proporciona directamente los valores de distancia en nm. Así pues, un perfil de SAXS consiste en la representación de los valores de intensidad (eje Y) en función de q o S (eje X). Cuando las partículas en estudio se alinean de alguna manera formando estructuras muy ordenadas repetitivas, producen picos de gran intensidad, llamados picos de Bragg, muy estrechos y definidos, cuyo máximo indica la distancia entre dichas partículas. Los picos correspondientes a estructuras parcialmente ordenadas no-cristalinas son muy anchos y de poca intensidad.

5.2.2. Instrumentación en SAXS

Los componentes básicos del instrumental para análisis de SAXS son: una fuente de rayos X, un sistema colimador, una plataforma portamuestras, un dispositivo de freno del haz o *beam stop* y un sistema de detección. A grandes rasgos, la fuente ilumina la muestra, el sistema colimador genera un haz muy concentrado y brillante, el *beam stop* evita que el haz incidente alcance el detector y oculte el resto de señales y finalmente el detector se encarga de determinar la radiación dispersada por la muestra (Schnablegger y Singh, 2013).

Los sincrotrones emplean un dispositivo inyector de electrones acoplado a un acelerador lineal (LINAC), donde los electrones son acelerados linealmente mediante la aplicación de un campo eléctrico. A continuación, pasan a un acelerador circular

o anillo de propulsión para finalmente, cuando alcanzan una energía del orden de varios GeV, pasar al anillo de almacenamiento. Los electrones giran en torno al anillo de almacenamiento y emiten rayos X de alta energía y radiación de mayor longitud de onda que se envían hacia las líneas de luz, cada una diseñada para un tipo de experimentación.

El sistema colimador es muy importante en SAXS, ya que la intensidad debida a la dispersión a ángulos más bajos puede quedar oculta por la elevada intensidad del haz incidente. Este sistema consiste en onduladores que fuerzan a los electrones a seguir trayectorias ondulatorias, lo que genera un haz muy intenso y concentrado.

Debido a la variabilidad de muestras que pueden ser analizadas mediante SAXS, la plataforma portamuestras es la parte más variable. En términos generales, para obtener una buena señal de SAXS es necesario iluminar una zona considerable de la muestra, sin embargo, no puede ser excesivamente gruesa ya que absorbería parte de la radiación. Por esta razón, se debe buscar un equilibrio entre el tamaño del haz y el grosor de la muestra (~ 1 mm). Normalmente, en el caso de muestras líquidas se emplean volúmenes de $50 \mu\text{l}$ y una superficie de colimación del haz de $1 \times 1 \text{ mm}^2$. En el caso de muestras sólidas se emplea una superficie de colimación de $1 \times 20 \text{ mm}^2$, aunque existen variaciones según se trate de muestras en forma de pasta, polvo o depositadas sobre sustratos. Según el experimento que se quiera llevar a cabo, puede ser necesario poder fijar condiciones de temperatura y humedad o permitir el movimiento de la muestra, entre otras muchas posibilidades. Las estaciones experimentales de los sincrotrones permiten adaptar el diseño de la plataforma portamuestras al experimento que se quiera llevar a cabo.

El *beam stop* es necesario para evitar que el haz incidente impacte directamente contra el detector, no solo porque pueda ser dañado, sino también porque la elevada intensidad del haz puede ocultar las señales debidas a la muestra. Dispositivos fabricados con materiales densos como el plomo permiten bloquear el haz incidente por completo, aunque también existen materiales que son capaces de atenuar la intensidad del haz.

En SAXS se utilizan básicamente cuatro tipos de detectores: los detectores de gas, detectores CCD, placas de imagen y detectores de estado sólido (CMOS). La elección del detector dependerá de los requerimientos experimentales de resolución, precisión, sensibilidad o velocidad de adquisición que se requiera.

5.3. Microscopía electrónica de transmisión y crio-tomografía electrónica

La microscopía electrónica de transmisión empezó siendo una técnica complementaria para biología estructural. Los nuevos métodos de preparación de muestras y la aparición de nuevos microscopios y sistemas de detección han hecho que estas técnicas sean actualmente una herramienta fundamental y poderosa para la biología molecular estructural.

Las técnicas de preparación de muestras han evolucionado enormemente (Harris, 2015). Por ejemplo, la obtención de finas secciones de especímenes incluidos en resinas es cada vez más fácil con los nuevos ultramicrotomos que incorporan cuchillas

mucho más precisas. El sombreado metálico de muestras como método de generación de contraste se ha beneficiado también de los avances tecnológicos. Hoy en día es una técnica ampliamente usada, sobre todo en el caso de la criofractura, y se realiza en equipos diseñados para ello con cámaras de elevado vacío que facilitan la evaporación de finas partículas metálicas. Los protocolos para tinción negativa de muestras o las técnicas de localización de proteínas mediante anticuerpos conjugados también son muy utilizados.

Cada vez se considera más en el ámbito científico que los procesos biológicos raramente implican una sola molécula. En este sentido ha surgido con fuerza el concepto de *crowding* macromolecular, según el cual el entorno biológico es un entorno enormemente poblado y los procesos celulares suelen implicar continuas asociaciones y disociaciones entre los muchos complejos proteicos (Lučić et al., 2013). A pesar de que también han podido ser aislados y estudiados algunos complejos proteicos, lo cierto es que hay muchas estructuras moleculares que existen sólo durante un breve periodo de tiempo o bien no son estables para poderlas aislar y estudiarlas individualmente.

La determinación estructural *in situ* requiere del desarrollo de técnicas que permitan el estudio de células vivas en un entorno biológico. Solo de esta manera será posible entender los procesos biológicos tal y como ocurren en el interior de la célula. La evolución de la microscopía electrónica está permitiendo ahondar en el conocimiento de los procesos celulares por medio de la obtención de tomogramas (Vanhecke et al., 2011). La combinación de la microscopía electrónica y las criotécnicas para la preparación de muestras ha generado la crio-microscopía electrónica (crio-EM), que permite la observación de muestras biológicas hidratadas que no requieren de ninguna preparación más que la vitrificación de la muestra (Milne et al., 2013). La aparición de las cámaras de detección directa de electrones ha marcado la diferencia en este campo, permitiendo la obtención de estructuras tridimensionales de elevada resolución. El contraste de las imágenes de crio-microscopía (que suele ser bajo debido a la baja dosis electrónica empleada) ha sido también mejorado gracias a los filtros de energía (Schröder, 2015).

5.3.1. Crio-tomografía electrónica

La crio-tomografía electrónica (crio-ET) permite obtener estructuras tridimensionales de alta resolución a partir de muestras únicas. Esta técnica consiste en la adquisición de series de imágenes, cada una con diferente inclinación de la muestra; la combinación de dichas imágenes permite obtener la reconstrucción tridimensional (Bárcena y Koster, 2009). La técnica de crio-ET requiere muestras muy finas para que los electrones puedan ser transmitidos a través de las mismas. Las muestras que son suficientemente finas para su observación directa ($<20 \mu\text{m}$), son vitrificadas por inmersión rápida en un agente criogénico (*plunge freezing*; Bárcena y Koster, 2009; Vanhecke et al., 2011). En el caso de muestras con un grosor de hasta $\sim 200 \mu\text{m}$, la vitrificación a alta presión (*high pressure freezing*) permite la criofijación rápida de la muestra. Las muestras con grosores superiores a 500 nm requieren disminuir previamente su grosor. Los crioultramicrotomos permiten obtener secciones de $50\text{-}500 \text{ nm}$. Otra alternativa es el uso de un haz de iones focalizado (FIB, *Focused Ion Beam mi-*

ling) para disminuir el grosor de la muestra (Vanhecke et al., 2011) (ver Figura 5.3). La muestra se mantiene bajo temperaturas criogénicas durante todo el proceso de adquisición de imágenes, que se realiza en el interior del microscopio, con la muestra montada sobre un dispositivo móvil que gira en torno a un eje perpendicular al haz de electrones. Las series de proyecciones se van adquiriendo gradualmente cada 1-2° cubriendo un rango de $\pm 60-70^\circ$. Posteriormente, las series han de alinearse para, finalmente, reconstruir la estructura tridimensional de la muestra en estudio. El alineamiento se consigue incorporando partículas electrodenensas que sean visibles aun empleando muy bajas dosis electrónicas, generalmente se utilizan nanopartículas metálicas (Bárcena y Koster, 2009; Vanhecke et al., 2011). El proceso de alineamiento consiste en marcar cada una de las partículas y trazar sus trayectorias a lo largo de todas las proyecciones. Los programas disponibles actualmente permiten alinear las proyecciones a partir de las posiciones de las partículas marcadoras, y obtener la reconstrucción tridimensional final de la estructura. Teóricamente, si fuese posible obtener imágenes a lo largo de 360° , se podría conseguir una reconstrucción completa de la estructura. En la práctica existen restricciones físicas que limitan el rango de inclinación a $\sim 60-70^\circ$, lo que genera una región en forma de doble cuña de la que no es posible extraer información (*missing wedge*; Vanhecke et al., 2011). Este efecto puede ser reducido realizando adquisiciones en dos direcciones perpendiculares entre sí, lo que se conoce como tomografía de doble eje (*dual-axis tomography*).

Las muestras vítreas hidratadas son sensibles a los electrones; elevadas dosis electrónicas pueden dañar la muestra. Por esta razón, en crio-EM las imágenes se adquieren empleando una dosis muy baja de electrones, lo que también limita drásticamente la relación entre señal y ruido. Además, se aplica un enfoque negativo para que aumente el contraste (Bárcena y Koster, 2009). Actualmente, las imágenes son adquiridas generalmente empleando filtros de energía, que permiten mejorar considerablemente el contraste gracias a la eliminación de los electrones dispersados de forma inelástica (Schröder, 2015). Cuando la muestra presenta una distribución homogénea y abundante a lo largo de la rejilla, es posible mejorar considerablemente la señal sumando las imágenes (Vanhecke et al., 2011). En estos casos se extraen sub-volúmenes que contienen una única molécula de la estructura

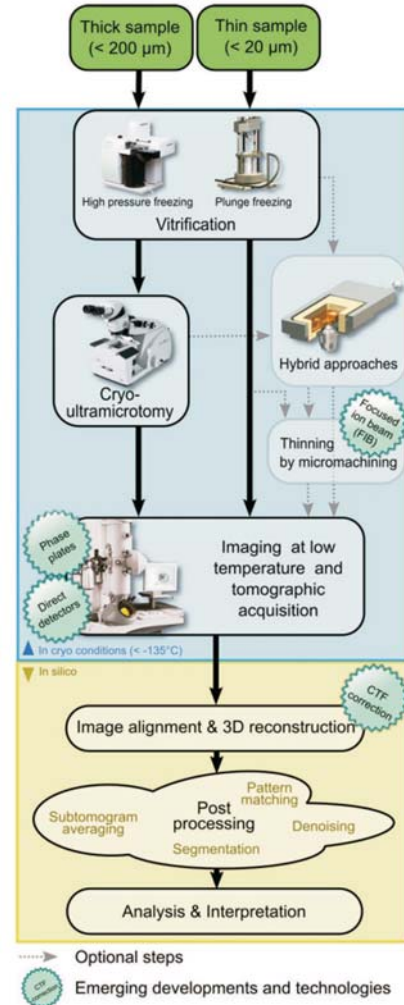


Figura 5.3: Esquema del proceso de observación de muestras mediante crio-EM y obtención de tomogramas. Fuente: Vanhecke et al. (2011), Figura 1.

objeto de estudio, que posteriormente son alineados, clasificados y sumados para obtener una imagen tridimensional con una resolución mayor (*sub-tomogram averaging*). El procesamiento de imagen digital es indispensable para obtener imágenes de alta resolución; existen programas como Dynamo (Castaño-Díez et al., 2012) o Py-Tom (Hrabe et al., 2012) dedicados al alineamiento de proyecciones, reconstrucción y post-procesamiento de los subtomogramas.

5.3.2. Nuevos avances en crio-tomografía electrónica

Numerosos avances tecnológicos han permitido que la crio-tomografía electrónica se posicione como una de las más prometedoras técnicas para la biología estructural (Schröder, 2015). A nivel técnico, el alineamiento del haz de electrones y el sistema óptico de los microscopios son cada vez más estables. La posición de la muestra y su inclinación requieren de una elevada precisión, que se consigue empleando sistemas mecanizados. Existen programas dedicados a la adquisición de datos, que permiten automatizar el proceso (por ejemplo SerialEM; Mastronarde, 2005).

También el proceso de preparación de muestras ha sido enormemente optimizado gracias a los sistemas robotizados. Actualmente, los pasos críticos durante la vitrificación pueden ser automatizados; es posible fijar las condiciones de temperatura, humedad y tiempo de secado que mejor se adapten a cada muestra.

Las nuevas cámaras de detección directa de electrones (*direct electron detectors*) han supuesto también un enorme avance (Schröder, 2015). Estos dispositivos eliminan la necesidad de convertir la señal electrónica en fotones, reduciendo así el ruido de las imágenes (McMullan et al., 2014). Las placas de fase son otro dispositivo, actualmente en desarrollo, que permite aumentar considerablemente el contraste y elimina la necesidad de adquirir imágenes desenfocadas. Con este sistema se pueden adquirir imágenes muy cerca del plano de foco (Schröder, 2015).

Capítulo 6

Objetivos

El filamento de nucleosomas es el primer nivel de plegamiento de la cromatina (ver introducción, sección 2.1). Tras décadas de investigación, la forma en que este filamento alcanza diversos estadios de compactación y acaba formando el cromosoma metafásico al final del ciclo celular sigue siendo uno de los problemas más difíciles de resolver en el campo de la biología estructural. La fibra de 30 nm ha sido considerada durante mucho tiempo el segundo nivel de plegamiento de la cromatina, y se han propuesto numerosos modelos para explicar el empaquetamiento de los nucleosomas en el interior de estas fibras (ver introducción, capítulo 3). La mayoría de los estudios que han llevado a considerar que la fibra de 30 nm es una estructura fundamental, se han realizado bajo condiciones de muy baja fuerza iónica, que poco tienen que ver con las condiciones del núcleo celular *in vivo*. El conocimiento acerca de la dinámica de la cromatina a lo largo del ciclo celular es escaso y, actualmente, algunos estudios han puesto en duda la existencia de la fibra de cromatina de 30 nm como elemento estructural básico (ver introducción, sección 4.3; Bouchet-Marquis et al., 2006; Tremethick, 2007; van Holde y Zlatanova, 2007; Maeshima et al., 2010; Dekker, 2008). Por otro lado, los modelos más aceptados para explicar la organización de la cromatina en el interior del cromosoma metafásico (ver introducción, sección 4.4), no son capaces de justificar la elevada concentración local de DNA en su interior (Daban, 2000).

Nuestro grupo de investigación ha realizado diversos estudios sobre la estructura interna del cromosoma metafásico. La aplicación de tratamientos desestructurantes suaves permitió observar por primera vez estructuras laminares en torno a los cromosomas (Caravaca et al., 2005). Desde entonces, se han empleado diversas técnicas para caracterizar estas estructuras (Gállego et al., 2009, 2010; Castro-Hartmann et al., 2010; Daban, 2011) que han llevado a proponer el modelo de plegamiento en láminas delgadas para el cromosoma metafásico que se ha descrito en el apartado 4.4.1. Además, se ha demostrado la capacidad de autoorganización de la cromatina metafásica para formar placas (Milla, 2011; Milla y Daban, 2012; Daban, 2014).

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones sobre el estado actual de nuestro conocimiento de la estructura de la cromatina, el objetivo general de esta tesis doctoral es doble. Por una parte, se pretende investigar la estructura de la cromatina durante la interfase en condiciones iónicas fisiológicas y, por otra parte, se pretende obtener información estructural de alta resolución sobre las placas de cromatina

descubiertas por nuestro grupo de investigación en los cromosomas metafásicos.

Los objetivos concretos del trabajo experimental presentado en esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Realizar un estudio de la estructura de la cromatina procedente de núcleos bajo condiciones iónicas correspondientes a la interfase. Este estudio se extenderá a núcleos en diferentes fases del ciclo celular. También se investigará la capacidad autoasociativa de fragmentos de cromatina procedente de núcleos interfásicos. El estudio estructural se realizará mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).
2. Realizar un estudio de la estructura interna del cromosoma metafásico mediante la técnica de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS). La gran intensidad de la radiación de sincrotrón es imprescindible para el análisis de estructuras biológicas no-cristalinas. Para este estudio se ha utilizado la estación de difracción de rayos X para muestras no-cristalinas del sincrotrón ALBA.
3. Realizar un estudio ultraestructural de la cromatina metafásica en medio acuoso vitrificado mediante la técnica de crio-tomografía electrónica (crio-ET). Para alcanzar la máxima resolución y contraste es necesario utilizar microscopios de alto voltaje equipados con detectores directos de electrones y con la tecnología de *phase plate*. En este estudio se han utilizado crio-microscopios de la plataforma INSTRUMENT del Max Planck Institut für Biochemie en Martinsried (München).

Parte II

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 7

Procedimientos generales

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se han utilizado métodos que han sido aplicados en muchos experimentos. Este capítulo recopila dichos procedimientos básicos.

7.1. Diálisis e incubación de muestras

La diálisis en saco nos ha permitido variar lentamente las condiciones iónicas de la muestra. La incubación en cámara nos ha permitido cambiar las condiciones iónicas de la muestra previamente depositada sobre rejillas para TEM.

7.1.1. Diálisis en saco

7.1.1.1. Preparación de los sacos de diálisis

Se cortaban aproximadamente 5 m de sacos de diálisis de membrana de celulosa deshidratados de 10 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) y un tamaño de poro de 14 kDa. A continuación, se sumergían en un matraz de Erlenmeyer con 2 l de una disolución de EDTA 1 mM (pH 8.0). La disolución se llevaba a ebullición, y tras dejarla enfriar durante un corto periodo de tiempo, se descartaba el líquido y se añadían 2 l más de la misma solución. De nuevo se llevaba a ebullición y, tras eliminar el líquido, se realizaban 5 lavados con agua destilada. Una vez limpios, los sacos se transferían a una botella con 1 l de agua destilada y unas 10 gotas de cloroformo para evitar el crecimiento de microorganismos. Los sacos se conservaban a 4 °C durante no más de dos meses.

7.1.1.2. Diálisis de la muestra

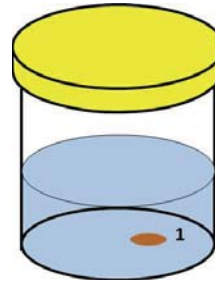
Para llevar a cabo la diálisis de una muestra determinada, se cortaban unos 15 cm de saco para diálisis hidratado y se sellaba el extremo inferior con un cierre plástico (Sigma-Aldrich). Se introducían, como máximo, 2 ml de muestra en el interior del saco con la ayuda de una micropipeta y se sellaba el extremo superior, procurando

dejar el mínimo volumen de aire en el interior. Un extremo del saco se fijaba a la pared de un vaso de precipitados de 1 l de capacidad mediante una pinza. El interior del vaso de precipitados se llenaba con 1 l de la solución requerida en cada experimento, y la diálisis se llevaba a cabo sobre una plataforma agitadora en el interior de una cámara a 4 °C, o bien en un baño de agua con termostato en caso de requerirse otra temperatura.

7.1.2. Incubación en cámara

Este tipo de incubación se realizaba con la muestra no fijada, depositada previamente sobre rejilla de cobre para microscopía (ver apartado 7.3.5). Para ello, se empleaba una cámara de polipropileno con tapón roscado (Plastiques Gosselin), en la que se introducían 5 ml del tampón de elección en cada experimento. La rejilla, que contenía la muestra, se introducía en la solución con una inclinación de unos 45° respecto a la superficie del líquido y se depositaba sobre el fondo de la cámara de polipropileno, dejando hacia arriba el film de carbono con la muestra. Estos frascos de polipropileno se colocaban sobre un soporte flotante en un baño de agua con termostato, procurando un contacto directo entre el frasco y el agua. Como en el caso de la diálisis en saco, el tampón, el tiempo y la temperatura de diálisis eran condiciones a evaluar en cada experimento.

Figura 7.1: Cámara para la diálisis de muestra sobre rejilla. Se muestra la cámara empleada para la diálisis e incubación de muestras sobre rejillas para TEM. **1** Rejilla de cobre que contiene la muestra depositada previamente por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2).



7.2. Microscopía óptica

Tanto para experimentos con núcleos o cromosomas, la microscopía óptica nos ha permitido evaluar de forma rápida el estado y cantidad de material de partida. Para esta valoración rápida se empleaba el microscopio óptico DMRB (Leica Microsystems), que permitía la observación de la muestra tanto por contraste de fases como por fluorescencia. La adquisición de imágenes se ha realizado con la cámara CCD DFC 500 (Leica Microsystems).

La preparación de la muestra para microscopía de contraste de fases se realizaba de la siguiente manera: se colocaban 10 μ l de muestra sobre un portaobjetos y, a continuación, un cubreobjetos sobre la muestra. Para evitar que el film de muestra fuera demasiado grueso, lo que provocaría su movimiento durante la observación, se ejercía una suave presión sobre el cubreobjetos con un papel absorbente para eliminar el exceso de muestra.

En el caso de la microscopía de fluorescencia se usaba el fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), específico para el marcaje de DNA. El máximo de

absorción del DAPI es a 358 nm; el máximo de emisión fluorescente se produce a 461 nm.

Se preparaba una disolución stock de DAPI en agua MilliQ a una concentración de 1 mg/ml. Esta disolución se guardaba a 4 °C un máximo de un mes. El día en que se realizaban experimentos, se preparaba una dilución de la solución stock de DAPI a una concentración de 1 μ g/ml, empleando el mismo tampón en el que se encontraba la muestra. Se mezclaban 10 μ l de ésta solución con 10 μ l de muestra, y se depositaban 10 μ l de la mezcla sobre un portaobjetos que se tapaba con un cubreobjetos. El exceso de líquido se retiraba con ayuda de un papel absorbente. Por razones prácticas, las muestras eran teñidas siempre con el fluorocromo DAPI y se visualizaban en el microscopio alternando el contraste de fases y la observación de fluorescencia.

7.3. Microscopía electrónica de transmisión

7.3.1. Condiciones de trabajo en microscopía electrónica

La aparición de artefactos puede resultar un problema durante la observación de las muestras en el microscopio. Por esta razón era aconsejable el uso de mascarilla quirúrgica durante todo el proceso preparativo de las mismas. Además, todo el material fungible usado en los experimentos era estéril y los tampones utilizados se filtraban mediante sistemas de filtrado desechables con un diámetro de poro de 0.22 μ m. Se empleaban diversos dispositivos de filtración en función del volumen que se quería filtrar (ver Tabla 7.1).

La preparación de las muestras para microscopía electrónica se realizaba sobre una superficie limpia, plana y libre de corrientes de aire. Para la manipulación de las rejillas se empleaban pinzas de precisión del número #5 y #7 (Sigma-Aldrich) de punta curva o recta, desmagnetizadas y recubiertas de teflón. Las pinzas se limpiaban antes de cada experimento en el baño de ultrasonidos Bransonic 1510 (Branson) durante 10 minutos. Este equipo tenía un receptáculo donde se colocaba un cesto con las pinzas y se llenaba con una solución de SDS al 2% (p/v) en agua destilada. A continuación, se realizaban varios lavados con agua destilada. Mientras se estaban usando las pinzas, se limpiaban ocasionalmente con etanol al 70% (v/v).

Tabla 7.1: Sistemas de filtración de tampones

Volumen filtrado	Sistema de filtración
0–10 ml ^a	Millex, membrana Millipore Express
10–50 ml ^b	Steriflip, membrana Millipore Express PLUS
50–1000 ml ^c	Steritop, 250 ml, membrana Millipore Express PLUS Stericup, 500 ml, membrana Millipore Express PLUS

^a Sistema de filtración acoplado a jeringuilla.

^b Sistema de filtración acoplado a tubos de 50 ml.

^c Sistemas de filtración acoplados a botellas.

7.3.2. Evaporación de carbono y carbono-platino

Las rejillas para microscopía electrónica de transmisión consisten en una malla metálica, con un entramado de tamaño variable. Para poder depositar la muestra sobre estas rejillas es necesario crear un soporte, que consiste en una fina película de un material transparente a los electrones. Durante la realización de los experimentos que aquí se detallan, el soporte empleado era una fina película de carbono generada por evaporación de partículas desde una varilla del mismo material.

Debido a que el material biológico es transparente a los electrones, es necesario emplear métodos que permitan aumentar el contraste de la muestra. Una opción para aumentar el contraste es depositar una fina película de algún elemento pesado sobre la muestra, previamente depositada sobre la rejilla para TEM. Durante el desarrollo experimental de esta tesis doctoral, el contraste se ha generado por evaporación de una fina película de una mezcla de carbono-platino sobre la muestra.

Para llevar a cabo las evaporaciones, tanto de carbono como de carbono-platino, se ha usado un sistema de módulos (Bal-Tec) formado por los componentes: QSG 060, EVM 30, MED 020 y EK 030. El instrumento funciona generando un elevado vacío en el interior de una cámara, donde se encuentran dos cañones de electrones (uno de ellos equipado con una varilla de carbono y el otro con una de carbono-platino) que provocan la evaporación de partículas finas de las varillas por aplicación de una diferencia de potencial. En el interior de cada cañón, la varilla de carbono o carbono-platino actúa como ánodo. Alrededor del ánodo se colocaba una espiral metálica (cátodo), a través de la cual se generaba un potencial negativo que provocaba un aumento de la temperatura y la consiguiente liberación de electrones hacia el ánodo. Los electrones así generados adquieren una velocidad muy elevada, y al impactar contra la varilla, provocan la evaporación del material. En el caso de la evaporación de carbono, parte de las partículas se dirigen hacia mica recién exfoliada. En el caso del carbono-platino las partículas se dirigían a un soporte giratorio que contenía las rejillas con la muestra. El equipo estaba provisto de un sensor que permite monitorizar el aumento de grosor de la película de carbono o carbono-platino que se iba generando.

Una variable importante a tener en cuenta durante las evaporaciones es el ángulo de incidencia de las partículas evaporadas con respecto a la mica o a las rejillas. El ángulo con el que las partículas evaporadas llegan a la muestra (α_{ap}) era el resultante de la suma de dos ángulos: el ángulo de inclinación del cañón respecto a la vertical (β), cuyo valor es constante e igual a $8.9 \pm 2.6^\circ$ (Caravaca, 2004), y el ángulo de inclinación del soporte respecto al eje vertical (α_{inc}), que era variable en función del tipo de evaporación que se realizara. Concretamente, la evaporación de carbono se realiza a 90° y la evaporación de platino a 5° (Tabla 7.2), y en ambos casos se sometía a rotación el soporte que contenía la mica o las rejillas para que las partículas se distribuyeran homogéneamente por la superficie de la muestra.

Para realizar la evaporación de carbono-platino sobre las rejillas que contenían la muestra, era necesario generar un vacío de 2×10^{-6} mbar en el interior de la cámara. La generación de tan elevado vacío requería ~ 3 h. Alcanzado dicho valor, se seleccionaba el cañón de electrones de carbono-platino, se inclinaba el soporte giratorio, se fijaba un voltaje de 1.6 kV, y se iba aumentando la intensidad de

Tabla 7.2: Evaporación de carbono y carbono-platino

Tipo de evaporación	Ángulo β^a	Ángulo α_{inc}^b	Voltaje	Intensidad
Carbono	8.9°	90°	1.8 kV	80 mA
Carbono-Platino	8.9°	5°	1.6 kV	60 mA

^a Ángulo entre los cañones de electrones y el eje vertical.

^b Ángulo entre el soporte giratorio y el eje vertical.

corriente hasta alcanzar un valor de 60 mA (ver Tabla 7.2). Bajo estas condiciones, la velocidad de evaporación era ≤ 0.01 nm/s. Cuando el sensor de grosor indicaba que se había alcanzado el grosor deseado (1 nm), se llevaban a 0 los valores de voltaje e intensidad y se eliminaba el vacío de la cámara para extraer las rejillas. Normalmente, se introducía un fragmento de papel junto a la muestra para obtener un control visual de la evaporación.

En el caso de la evaporación de carbono, se generaba un vacío de 2×10^{-5} mbar, que se conseguía al cabo de ~ 30 min. Previamente se debía fijar un cuadrado de mica recién exfoliada de 2.5×2.5 cm de superficie sobre el soporte. Alcanzadas las condiciones de vacío óptimas, se inclinaba el soporte, se fijaba un voltaje de 1.8 kV y se iba aumentando la intensidad hasta un valor de 80 mA (Ver Tabla 7.2). Bajo estas condiciones, la velocidad de evaporación era ≤ 0.1 nm/s. Cuando el sensor marcaba que se había evaporado el grosor deseado (1.5-2.5 nm), se detenía el sistema. La película de carbono se dejaba reposar durante un mínimo de 24 h antes de depositarla sobre rejillas para microscopía electrónica (apartado 7.3.3). Igual que en el caso de la evaporación de platino, se incluía un fragmento de papel en la cámara de evaporación para realizar un control visual de cada evaporación.

7.3.3. Generación del soporte de carbono

Las muestras a observar mediante microscopía electrónica se extendían sobre rejillas de cobre de 3.05 mm de diámetro con una malla formada por 400 campos de $62 \mu\text{m}$ de lado (Sigma-Aldrich). Para ello, era necesario depositar primero un film de carbono generado por evaporación (apartado 7.3.2) sobre la cara mate de las rejillas para TEM.

Las rejillas se limpiaban antes de su uso sumergiéndolas en acetona analítica (Merck) en el interior de una cápsula de Petri durante 2-3 minutos. Hecho esto, se secaban sobre papel Whatman y una vez secas, se procedía a aplicar un adhesivo especial para fijar el carbono a la rejilla (Sigma-Aldrich). A continuación, las rejillas se dejaban secar durante 2 minutos y se colocaban sobre un soporte anular de PVC de 4 cm con un diámetro interno de 3 cm, en el interior de un embudo Büchner lleno de agua MilliQ con una llave de paso en la parte inferior. La región central de este soporte estaba formada por una malla de nailon que permitía el paso de agua a la vez que servía de soporte para las rejillas. Una vez estaban colocadas sobre el soporte, se introducía el fragmento de mica que contenía la película de carbono y se procedía a la deposición del carbono tal como se describe en la Figura 7.2. Antes de utilizar las rejillas preparadas de esta manera, se dejaban secar sobre el soporte en

el interior de un desecador con trompa de vacío, al menos 24 h.

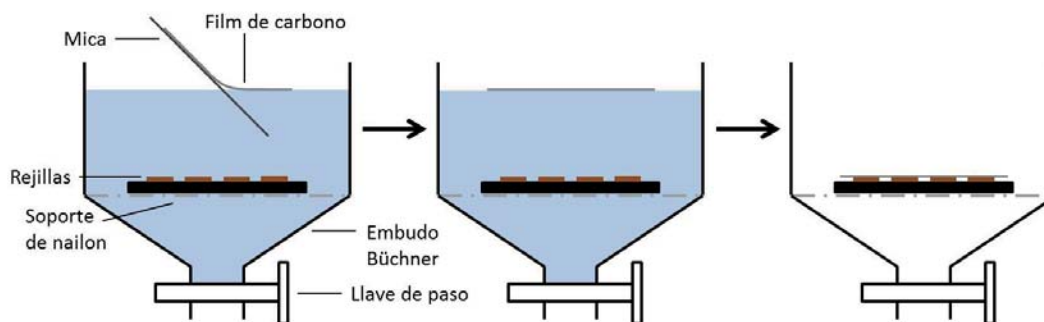


Figura 7.2: Esquema del proceso de deposición de carbono sobre rejillas para microscopía. Inicialmente, la mica que contenía la película de carbono generada por evaporación se introducía en el agua con una inclinación de $\sim 45^\circ$. Con suavidad se iba introduciendo todo el fragmento de mica en el líquido, de manera que la película de carbono se desadhería de la mica y quedaba flotando en la superficie. A continuación, se abría la llave de paso que permitía la eliminación del agua del interior del embudo. El nivel de agua iba disminuyendo hasta que, finalmente, el carbono quedaba depositado sobre las rejillas.

7.3.4. Activación del film de carbono

La adhesión de la muestra al soporte de carbono se realiza a través de fuerzas electrostáticas. La superficie de carbono tiene un carácter hidrofóbico, por lo que para poder depositar la muestra es necesario hacerlo hidrofílico. Esto se consigue mediante la generación de cargas que favorezcan la adherencia tanto del DNA como de las proteínas. En el desarrollo de esta tesis doctoral se han empleado dos métodos de activación de carbono. Para la preparación de la mayoría de muestras para TEM convencional, así como durante los experimentos preparatorios de crio-TEM la activación se realizaba empleando el compuesto químico Alcian Blue. Durante la realización de experimentos de crio-ET, la activación se realizó de forma más rápida mediante *glow discharge*.

7.3.4.1. Activación con Alcian Blue

Se empleaba una disolución del colorante Alcian Blue (Feinbiochemica) a una concentración de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Coggins, 1987). Para ello, justo antes de proceder a depositar la muestra sobre rejillas para microscopía, se preparaba una disolución de Alcian Blue en ácido acético al 3% (v/v), a una concentración de $2 \text{ mg}/\text{ml}$. A continuación, se tomaban $50 \mu\text{l}$ de dicha disolución y se diluían 1000 veces con agua MilliQ. Esta mezcla debía ser utilizada en un tiempo máximo de 30 minutos (Sogo et al., 1986).

La activación del soporte de carbono de las rejillas se realizaba sobre una superficie lisa, donde se colocaba una tira de parafilm y sobre ella una serie de cubreobjetos. Se añadía 1 ml de la disolución diluida de Alcian Blue sobre varios cubreobjetos, y con cuidado se colocaban las rejillas con el carbono en contacto con la solución. El proceso de activación se realizaba durante 5 minutos. A continuación, las rejillas eran lavadas con 1 ml de agua MilliQ para retirar el exceso de Alcian Blue. Puede verse

el proceso esquematizado en la Figura 7.3. Finalmente, se colocaban con el carbono hacia arriba sobre papel Whatman hasta el momento de depositar la muestra.

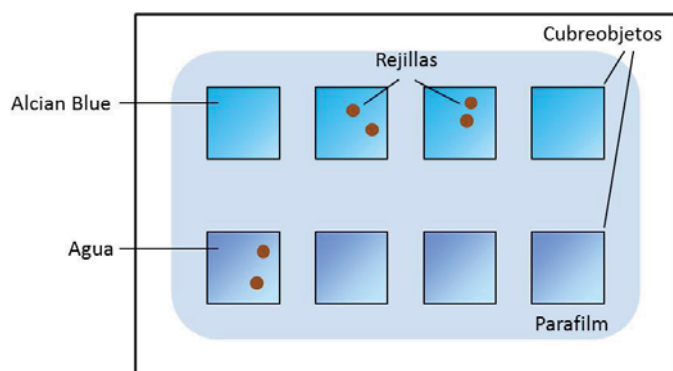


Figura 7.3: Esquema del proceso de activación del carbono empleando Alcian Blue. La rejilla, sobre la que previamente se había depositado una fina película de carbono, se colocaba flotando sobre 1 ml de Alcian Blue en un cubreobjetos. La activación se realizaba durante 5 min. Pasado este tiempo, se realizaba un lavado de la rejilla en 1 ml de agua MilliQ durante 5 min más.

7.3.4.2. Activación mediante *glow discharge*

El proceso de activación del film de carbono mediante *glow discharge* se realizaba empleando un equipo de tratamiento por plasma. El plasma se generaba en el interior de una cámara cilíndrica de 120 mm de diámetro y 100 mm de alto, a una presión de 0.1-2.2 Torr. Se colocaban las rejillas que se quisieran activar sobre un portaobjetos de cristal, y se introducía en la plataforma del interior de la cámara. A continuación, se evacuaba la cámara, se inyectaba aire y se aplicaba una diferencia de potencial entre dos electrodos colocados en el interior, lo que provocaba la ionización de las moléculas presentes en el aire, produciéndose el plasma. Las moléculas de aire ionizado provocaban, a su vez, la ionización del film de carbono, generando cargas negativas y convirtiéndolo así en una superficie hidrofílica.

7.3.5. Extensión de material sobre rejilla

Es importante depositar la muestra sobre el soporte de carbono, en cantidades suficientes que permitan obtener imágenes de calidad en el microscopio electrónico. Para ello se han seguido dos procedimientos. La extensión directa consiste en depositar una gota de muestra concentrada sobre una rejilla durante un tiempo suficiente para permitir la adsorción de material al carbono. La centrifugación de muestra contra rejillas previamente activadas permite enriquecer enormemente la cantidad de material en la superficie.

7.3.5.1. Extensión directa

Se colocaba un trozo de parafilm en el interior de una placa de Petri, y sobre él las rejillas con el carbono activado orientado hacia arriba. A continuación, se añadían 5-10 μl de muestra sobre cada rejilla y se permitía la adsorción por tiempos variables. Cuando se trataba de deposiciones de fragmentos de cromatina, el tiempo

¹El volumen empleado dependía del tipo de muestra. Si se trataba de deposiciones de fragmentos de cromatina se empleaban 5 μl , para muestras con placas de cromatina se empleaban 10 μl .

de adsorción era de 10 minutos. Si se trataba de deposiciones de placas de cromatina, se probaron diversos tiempos: 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 horas. Normalmente, la extensión se realizó a temperatura ambiente, pero para tiempos largos de adsorción se requirió mantener la placa de Petri con las rejillas a 4 °C.

7.3.5.2. Extensión por centrifugación

La deposición de la muestra sobre las rejillas para experimentos de TEM convencional, crio-TEM o crio-ET se ha realizado mayoritariamente empleando esta técnica. Para la deposición de muestra por centrifugación se usaban tubos de plástico de 1.5 ml con tapón roscado y junta tórica (Sarstedt). Una vez el carbono había sido activado, se colocaba una hoja de parafilm sobre hielo, y sobre ella los tapones de los tubos. Se dispensaban 100 μl (200 μl en caso de deposición de placas para crio-TEM y crio-ET) de muestra en cada tapón. A continuación, se introducía la rejilla cuidadosamente en el líquido y se procuraba que quedara depositada en el fondo del tapón. Se cerraban los tubos, manteniéndolos siempre en posición invertida, y se colocaban de tres en tres en adaptadores de nailon 344497 de Beckman (Figura 7.4). Los adaptadores se colocaban en el interior de los recipientes portamuestras del rotor vasculante JS 13.1 (Beckman). El rotor se colocaba en el interior de la centrifuga Beckman J2-HS y se centrifugaba durante 10 minutos a 4 °C y a una velocidad de $1500\times g$ calculadas a la altura de la rejilla (Caño, 2003; Caravaca, 2004). Acabada la centrifugación, se desenroscaban los tapones y se extraían las rejillas con ayuda de unas pinzas de precisión.

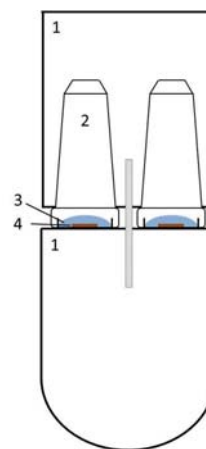


Figura 7.4: Esquema del sistema empleado para la extensión de muestras sobre rejillas mediante centrifugación.
 1 Adaptador de nailon, 2 tubo de 1.5 ml con tapón roscado y junta tórica, 3 muestra y 4 rejilla de cobre para TEM.

7.3.6. Fijación del material

En microscopía electrónica de transmisión convencional, las muestras deben ser fijadas y deshidratadas con el fin de conservar su estructura. Para la fijación de las muestras se empleaba glutaraldehído, un agente entrecruzador. El mecanismo de fijación consiste en la reacción de los dos grupos aldehído del glutaraldehído con grupos amino primarios adyacentes en la muestra. El glutaraldehído pierde su capacidad reactiva en pocos minutos, por lo que se debía preparar durante la realización de cada experimento, justo después de la deposición de la muestra sobre rejillas. En

cada experimento, se empleaba un nuevo vial de 1 ml de glutaraldehído 25 % (v/v) (Sigma-Aldrich). Debido a la toxicidad de este compuesto químico, todo el proceso de fijación se realizaba bajo una campana extractora de gases.

La fijación de la muestra para su observación mediante crio-EM se realizaba por congelación rápida, sin necesidad de aplicar tratamientos químicos.

7.3.6.1. Fijación de fragmentos de cromatina interfásica

Los fragmentos de cromatina interfásica se fijaban justo después de la diálisis desestructurante y antes de su deposición sobre rejillas para microscopía electrónica. El vial de glutaraldehído se diluía 10 veces empleando el mismo tampón en el que se encontraba la muestra. La fijación se realizaba añadiendo glutaraldehído a una concentración final de 0.2 % (v/v) al tubo que contenía la muestra, y se incubaba a temperatura ambiente durante 3.5 horas. Pasado este tiempo, la muestra se depositaba sobre la rejilla siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.3.5.1 y, a continuación, se realizaban 2 lavados con agua MilliQ. Para ello, se colocaban dos cubreobjetos sobre una hoja de parafilm, y se añadía 1 ml de agua sobre cada uno. Las rejillas se colocaban sobre la gota de líquido con el material orientado hacia abajo. Cada lavado se realizaba por un tiempo de 5 minutos. Finalmente, la muestra se deshidratava sumergiéndola en etanol absoluto (Merck) durante 2-3 segundos y se dejaba secar sobre papel de filtro antes de guardarla en un portarejillas.

7.3.6.2. Fijación sobre rejilla

La mayoría de procesos de fijación se realizaban una vez la muestra había sido depositada sobre rejillas para microscopía electrónica. El vial de glutaraldehído se diluía 10 veces con el mismo tampón que contenía la muestra. En una superficie lisa se fijaban varios cubreobjetos² sobre una hoja de parafilm. Se añadía 1 ml de glutaraldehído al 2.5 % (v/v) sobre cada cubreobjetos y se colocaban las rejillas con la cara que contenía la muestra en contacto con el glutaraldehído. Pasados 10 minutos, se retiraban los restos de glutaraldehído realizando dos lavados de 5 minutos con 1 ml de agua MilliQ, también sobre cubreobjetos. Finalmente, se deshidratava la muestra sumergiéndola en etanol absoluto (Merck) durante 2-3 segundos.

7.3.6.3. Criofijación por inmersión

La vitrificación de la muestra se realizaba por inmersión rápida en etano líquido (agente criogénico secundario). Para ello, se empleaba el sistema EM CPC (Leica Microsystems). El proceso consistía en sumergir rápidamente la rejilla que portaba la muestra en un receptáculo metálico que contenía el agente criogénico, que se mantenía a muy baja temperatura gracias al nitrógeno líquido (agente criogénico primario) que fluía alrededor del receptáculo.

La muestra, previamente depositada sobre la rejilla por centrifugación (apartado 7.3.5.2), se extraía del fondo del tapón roscado con ayuda de unas pinzas de precisión. Seguidamente, las pinzas se fijaban a la guillotina del sistema EM CPC (Figura 7.5).

²Se empleaba un cubreobjetos para cada condición de muestra que se tuviera.

A continuación, se retiraba el exceso de muestra de la parte posterior de la rejilla con ayuda de un fragmento de papel Whatman y rápidamente se accionaba la guillotina, que disparaba las pinzas con la rejilla hacia el receptáculo que contenía el agente criogénico. Finalmente, la rejilla se transfería al sistema portamuestras del microscopio para ser observada, o a una caja para el almacenamiento de rejillas sumergida en nitrógeno líquido, donde se conservaban hasta su observación.

7.3.7. Generación de contraste en muestras deshidratadas

Debido a que las muestras biológicas están constituidas por elementos químicos de bajo peso atómico, resultan muy transparentes a los electrones. Se deben añadir agentes de contraste que contengan metales pesados, que aumenten las posibilidades de dispersión de los electrones que forman la imagen. En nuestros experimentos se ha empleado una mezcla de carbono y platino, que se depositaba por evaporación sobre las rejillas que contenían la muestra fijada y deshidratada previamente (ver apartado 7.3.2). El grosor de esta capa era de 1 nm.

7.3.8. Observación de muestras en el microscopio electrónico de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión convencional se ha empleado para la caracterización de la estructura de la cromatina interfásica. También se ha utilizado durante la optimización de métodos para la obtención de cromosomas, ya que ha permitido valorar la calidad y cantidad de material en las muestras antes de su estudio mediante SAXS. Además, durante la evaluación de los métodos de preparación de placas de cromatina metafásica en gran cantidad para su estudio mediante crio-ET se ha empleado también para evaluar el estado de la muestra. La observación mediante TEM de las diversas muestras se ha realizado empleando el microscopio JEM 1400 (Jeol) que operaba con un voltaje máximo de 120 kV. La adquisición de micrografías se ha realizado empleando dos cámaras instaladas en este microscopio: ES1000W Erlangshen (Gatan) y 794 Multi-Scan 600HP (Gatan).

Por otro lado, la observación de placas mediante crio-EM se ha realizado empleando el microscopio JEM 2011 (JEOL) con un voltaje de aceleración de 80-200 kV y equipado con una cámara CCD 896 USC 4000 (Gatan). En todos los casos, las micrografías obtenidas eran invertidas, calibradas y procesadas mediante el programa Digital Micrograph (Gatan). El montaje final de las figuras se ha realizado con el programa CorelDRAW X3.



Figura 7.5: Sistema de criofijación de muestras Leica EM CPC. Fuente: <http://www.sct.uab.cat/microscopia/es>.

Capítulo 8

Cultivos celulares

Durante el desarrollo del presente trabajo se han empleado células HeLa (adenocarcinoma de cérvix humano), inmortalizadas con el virus del Papiloma (HPV-18) como material de partida. A partir de esta línea celular se han obtenido tanto núcleos interfásicos como cromosomas metafásicos.

8.1. Cultivo de células HeLa

Las características de la línea celular HeLa hacen necesaria la protección del experimentador, por lo que debe trabajarse bajo cabinas de seguridad biológica de nivel 2. En nuestro caso se ha empleado la cabina Bio-II-A de Telstar, que protege de posibles contaminaciones tanto al experimentador como al cultivo. El trabajo con cultivos celulares requiere tomar precauciones para evitar contaminaciones. Para ello, todo el material que fuera a entrar en contacto con el cultivo era previamente esterilizado en autoclave. Por otro lado, la temperatura óptima de crecimiento de esta línea celular es de 37 °C, por lo que todos los componentes líquidos eran equilibrados a esta temperatura antes de ser utilizados, para evitar desestabilizar el crecimiento del cultivo celular.

8.2. Establecimiento del cultivo celular

Para establecer un cultivo celular, se partía de células HeLa conservadas en el interior de viales criogénicos en tanques de nitrógeno líquido (-196 °C). Cada vial contenía 10^6 células en presencia de suero fetal bovino (FBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. El vial se descongelaba parcialmente en un baño de agua a 37 °C y las células se transferían a un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie (Sarstedt). Era importante utilizar un baño de hielo al realizar la transferencia porque a 37 °C el DMSO resulta tóxico para las células. A continuación, se añadían lentamente 7 ml de medio de cultivo [Eagle's Minimum Essential Medium (MEM- α) a pH 7.3 complementado con FBS al 10% (v/v) y 2 mM de Glutamax-1 (Invitrogen)]. Al realizar esta dilución, la concentración de DMSO deja de comprometer el crecimiento

de las células. En este momento, el frasco se introducía en un incubador con camisa de agua (Forma Scientific) a 37 °C, 90 % de humedad y 5 % de CO₂; las células crecían adheridas a la pared del frasco de cultivo. Al día siguiente se aspiraba el medio de cultivo con una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío, y se sustituía por 5 ml de medio de cultivo fresco, equilibrado previamente a 37 °C. El crecimiento de las células se controlaba en el microscopio óptico. Cuando las células alcanzaban el 80 % de confluencia se escalaba el cultivo a un frasco de 75 cm² (Sarstedt) según el protocolo que se describe en el apartado 8.4. El cultivo se mantenía en frascos de 75 cm² (ver apartado 8.3) durante ~3 meses. Para la realización de un experimento, el cultivo se expandía a frascos más grandes (ver apartado 8.4).

8.3. Mantenimiento del cultivo celular

La disponibilidad de nutrientes se comprobaba visualmente por el color que presentaba el medio de cultivo, ya que el viraje del color rosa a tonalidades naranjas indica un cambio en el pH por agotamiento de nutrientes. Normalmente, se debía cambiar el medio 2-3 veces a la semana. Por otro lado, las células HeLa se duplican cada 24 horas, por lo que era necesario ir controlando el crecimiento para mantenerlas hasta llegar a un 70-80 % de confluencia. Se observaba el estado de las células en el microscopio óptico, y al alcanzar el 80 % de confluencia se aspiraba el medio de cultivo y se realizaba un lavado de las células con 5 ml de PBS. Se aspiraba el PBS y, a continuación, se disgregaban las células añadiendo 3 ml de tripsina (la solución empleada contenía 5 g/l de tripsina porcina y 2 g/l de EDTA, y se diluía 10 veces con PBS antes de su uso). El frasco se incubaba a 37 °C durante no más de 1 minuto y se desadherían las células golpeando suavemente el lateral. Se comprobaba el estado de las células en el microscopio óptico. Cuando estaban desadheridas, se adicionaban dos volúmenes de medio de cultivo. La adición del medio se realizaba con pipeta serológica de 10 ml, dejando caer el medio por las paredes, para asegurar que se recuperaban la gran mayoría de células. Entonces, el medio de cultivo que contenía las células se transfería a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaba a 400×g en la centrífuga Eppendorf 5702 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Acabada la centrifugación, se aspiraba el medio y el sedimento celular se resuspendía en un volumen adecuado de medio de cultivo. Teniendo en cuenta la densidad celular en el tubo que contenía las células y el número de células que se querían resembrar, se calculaba el volumen que debía añadirse de nuevo al frasco de cultivo. Con ayuda de una pipeta serológica se transfería la fracción de células al frasco de cultivo y se añadía medio fresco hasta 15 ml (ver tabla 8.1). Los frascos se dejaban en el incubador hasta que las células alcanzaran de nuevo la confluencia límite.

8.4. Expansión del cultivo celular

Puesto que para la realización de todos los experimentos descritos en este trabajo era necesaria una gran cantidad de células de partida, el cultivo se expandía finalmente a frascos de 225 cm² (Cultek) con una capacidad de 45 ml. Cuando el cultivo, independientemente de la superficie que ocupara, se encontraba a un 80 % de

confluencia, las células se disgregaban con tripsina (ver sección 8.3) y el sedimento celular se resuspendía en el volumen adecuado, según el número de frascos que se tenían que preparar y el día en que quisiera realizarse el experimento. Se utilizaban 2-8 frascos de cultivo con una superficie de 225 cm². Se transfería una fracción de células a cada uno de los frascos y se añadía medio fresco hasta completar los 45 ml. La Tabla 8.1 muestra la relación de frascos de cultivo empleados, su capacidad máxima y el uso que se les daba.

Tabla 8.1: Tipos de frascos de cultivo empleados

Superficie	Marca comercial	Volumen medio	Uso
25 cm ²	Sarstedt	7 ml	Establecimiento del cultivo
75 cm ²	Sarstedt	15 ml	Mantenimiento del cultivo
225 cm ²	Cultek	45 ml	Expansión del cultivo

8.5. Metodología del cultivo celular en interfase

Para llevar a cabo un experimento para el estudio de la estructura de la cromatina interfásica, se preparaban cultivos celulares al 80 % de confluencia en frascos de 225 cm² de superficie, tal como se explica en el apartado 8.4. Justo antes de empezar se comprobaba el estado de crecimiento y se valoraba la relación entre células interfásicas y metafásicas mediante un microscopio óptico. Las células metafásicas pueden diferenciarse porque tienen un aspecto redondeado y están flotando en el medio de cultivo, adheridas a la superficie únicamente a través de un pedúnculo. Las células interfásicas, por el contrario, están completamente adheridas a la superficie y presentan un aspecto estrellado. Generalmente, las células interfásicas suponían el 80-90 % del total de células en el cultivo.

8.5.1. Aislamiento de células interfásicas

Para poder estudiar la estructura de la cromatina interfásica, era necesario eliminar todas las células metafásicas presentes en el cultivo. Las células metafásicas pueden desengancharse fácilmente de la superficie del frasco de cultivo ya que, como se ha indicado, están adheridas tan sólo a través de un pedúnculo. Para ello, se empleaba la técnica de *shake-off* (Narayanswamy y Hamkalo, 1987; Caravaca, 2004), que consiste en golpear lateralmente el frasco, unas 10 veces por cada lado. A continuación, se eliminaba el medio de cultivo que contenía la gran mayoría de las células metafásicas. Se añadían 10 ml de PBS a cada frasco y se repetía la operación de *shake-off*. Se comprobaba que el frasco no contuviera células metafásicas, y cuando era necesario se repetía de nuevo la operación. Una vez se habían eliminado todas las células metafásicas, se añadían 10 ml de PBS y se procedía a desadherir las células interfásicas con ayuda de un *scraper* (Sarstedt)¹ de 25 cm de longitud, con el que se

¹Espátula de plástico de tamaño reducido para desadherir células crecidas en cultivos adherentes.

iba barriendo la superficie del frasco. Con ayuda de una pipeta serológica se dejaba caer el PBS por las paredes para arrastrar las células. El PBS con las células en suspensión se transfería a un tubo plástico estéril de 15 ml de capacidad y se centrifugaba a $200\times g$ durante 5 minutos en la centrífuga Beckman Allegra 6R, empleando el rotor GH-3.8 (Beckman Coulter). A continuación, se aspiraba el sobrenadante de cada tubo y se resuspendían todos los sedimentos con 10 ml de PBS frescos. En este punto se realizaba un recuento celular, tal como se indica en el apartado 8.7. Al final, se hacía un último lavado, y se volvían a centrifugar las células a $200\times g$ durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se retiraba el PBS y se conservaba el sedimento de células interfásicas. A partir de aquí, la muestra se mantenía a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en todo momento.

8.5.2. Purificación de núcleos interfásicos

El protocolo de aislamiento de núcleos ha sido diseñado a partir del protocolo descrito por Rill et al. (1978). La composición de todos los tampones que se mencionan puede consultarse en la Tabla 9.1. El sedimento celular obtenido según el protocolo detallado en el apartado 8.5.1 se resuspendía en tampón A (2.7 ml por cada frasco de partida). Este tampón se complementaba, justo antes de su uso, con fluoruro de fenilmetanosulfonil (PMSF)², un inhibidor de serina-proteasas. La suspensión de células era transferida a un homogeneizador de vidrio tipo Dounce provisto de un pistón de teflón. La muestra se pasaba por el pistón 15 veces para conseguir la rotura de la membrana celular. El volumen de células recuperado se transfería a un tubo plástico cónico estéril de 50 ml que contenía 2 volúmenes de tampón B y se mezclaba por inversión.

El tampón de base en todas las soluciones empleadas en el aislamiento de núcleos era PM1X (Pipes 5 mM, NaCl 5 mM y MgCl_2 5 mM). La separación de los núcleos del resto de material citoplasmático se llevaba a cabo por sedimentación en un solo paso mediante un gradiente bifásico de sacarosa (Figura 8.1). La solución superior tenía una concentración de sacarosa de 1.62 M y un detergente iónico³ que eliminaba la membrana nuclear externa y el material citoplasmático asociado. La solución inferior contenía 2.3 M de sacarosa y era donde sedimentaban los núcleos. El gradiente se preparaba en tubos Ultra-Clear (Beckman Coulter) para ultracentrífuga con una capacidad de 5 ml. En el fondo se depositaban 1.25 ml de tampón C y sobre éste se añadían 3.75 ml de la suspensión de núcleos

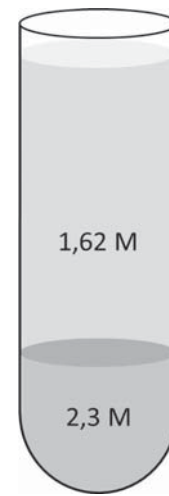


Figura 8.1: Esquema del gradiente bifásico empleado para la purificación de núcleos. La fase inferior se preparaba con tampón C (2.3 M sacarosa) y la superior contenía la suspensión celular en presencia de 1.62 M de sacarosa.

²Se preparaba una disolución stock de PMSF en isopropanol a una concentración de 0.1 M. En cada experimento se añadía el volumen necesario de dicha solución al tampón correspondiente.

³Este tampón es el resultante de mezclar un volumen de células en tampón A con 2 volúmenes de tampón B.

en tampón A+B preparado tal como se ha indicado en el párrafo anterior. Se introducían los tubos en los recipientes portamuestras del rotor, y se equilibraba el peso dos a dos. A continuación, se colocaban los portamuestras con los tubos dentro en el rotor vasculante SW 55 Ti (Beckman Coulter) de la ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter). Se centrifugaba a una velocidad de $100.000\times g$ durante 2 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminaba el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y los núcleos se resuspendían en el tampón correspondiente, en función del tipo de experimento realizado (ver apartado 9.1).

8.6. Metodología del cultivo celular en metafase

Se preparaban los frascos de cultivo necesarios para cada experimento (ver apartados 8.1-8.4). Para obtener cromosomas, el cultivo celular debía estar al 70% de confluencia justo antes de sincronizar su crecimiento⁴.

8.6.1. Sincronización de células en metafase

El crecimiento del cultivo celular se sincronizaba con el fin de obtener un cultivo altamente enriquecido en células metafásicas. Para ello se empleaba colcemida, un compuesto químico que actúa provocando la despolimerización de los microtúbulos, con lo que se conseguía que el ciclo celular de las células en cultivo quedase detenido en la metafase. Para una sincronización efectiva, las células se incubaban en presencia de $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de colcemida durante 16 horas (Craig, 1999).

8.6.2. Obtención de células en metafase

En este tipo de experimentos se partía de entre 2 y 8 frascos de cultivo con una superficie de 225 cm^2 . En un cultivo metafásico muchas de las células estaban únicamente unidas por un pedúnculo a la superficie del frasco de cultivo y se aplicaba la técnica de *shake-off* (ver apartado 8.5.1) para desadherirlas. Mediante una pipeta serológica, se transfería la suspensión de células a tubos plásticos estériles con fondo cónico con capacidad para 50 ml. La suspensión celular se centrifugaba a $400\times g$ durante 10 minutos y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ empleando la centrífuga Beckman Allegra 6R con el rotor GH-3.8 (Beckman Coulter). Mientras duraba la centrifugación, se añadían 10 ml de PBS a cada frasco, y a continuación, se transfería el PBS de todos los frascos, que contenía el resto de las células metafásicas, a un tubo de plástico de 50 ml de capacidad y se repetía la centrifugación. Se aspiraba el sobrenadante de los tubos y finalmente, se resuspendían todos los sedimentos en 10 ml de PBS. En este punto se realizaba un recuento de células tal como se indica en el apartado 8.7 y se centrifugaba de nuevo la muestra en las mismas condiciones, para obtener un sedimento de células que era utilizado para obtener cromosomas metafásicos.

⁴La sincronización requiere un tiempo de incubación de 16 horas, y durante este tiempo todavía puede aumentar ligeramente la densidad celular.

8.7. Recuento celular

El recuento celular se realizaba empleando el contador automático TC10 *Automated Cell Counter* (Bio-Rad), que dispone de portaobjetos de plástico con dos pequeñas celdas de 10 μl de capacidad, donde se insertaba la muestra. Se introducía el portaobjetos con 10 μl de suspensión de células en la abertura frontal del contador y, al cabo de unos pocos segundos, se obtenía el resultado del recuento en la pantalla digital, en células/ml.

Capítulo 9

Métodos para el estudio de la estructura de la cromatina de núcleos interfásicos

Durante los últimos años, los trabajos experimentales llevados a cabo en el laboratorio de Cromatina, donde se ha realizado el presente trabajo, se han centrado en el estudio de la estructura de los cromosomas metafásicos. En esta tesis, estos estudios estructurales se han extendido a la cromatina durante la interfase. En este capítulo se describen los métodos utilizados en esta parte de la tesis.

9.1. Medios empleados en el estudio de la cromatina interfásica

En el presente apartado se detallan los tampones empleados durante la realización de experimentos en los que se estudiaba la cromatina interfásica. Todos ellos se preparaban el día anterior a su utilización y se filtraban empleando los filtros descritos en la Tabla 7.1 del apartado 7.3.1.

La Tabla 9.1 muestra los tampones utilizados para purificar núcleos a través de gradientes de sacarosa. La composición de los tampones A, B y C es similar a la de los tampones A-PA, B-PA y C-PA, respectivamente, solo que los primeros contienen $MgCl_2$ como elemento compactante de la cromatina y los segundos contienen poliaminas. Se sabe que ambos componentes juegan un papel crucial en la compactación de la cromatina y el consiguiente avance a través del ciclo celular (Wolf y Cittadini, 1999; Laitinen et al., 1998, ver apartado 4.2). Se preparaban soluciones madre de sacarosa 2.5 M en tampón PM (ver Tabla 9.2) o agua MilliQ, que se podían mantener a 4 °C durante un mes aproximadamente. Para preparar estas disoluciones concentradas se añadía a la sacarosa la mitad del volumen de tampón o agua que se requería para tener la concentración deseada. Se calentaba en una placa calefactora a unos 50 °C, agitando en todo momento, hasta que al final se añadían los otros componentes y se ajustaba el volumen.

La Tabla 9.2 muestra los tampones empleados para provocar diversos grados de compactación de la cromatina de núcleos interfásicos.

Tabla 9.1: Tampones empleados en la purificación de núcleos interfásicos

Tampón A	Tampón B	Tampón C
Sacarosa 0.25 M	Sacarosa 2.3 M	Sacarosa 2.3 M
PMSF 1 mM	Tritón X-100 0.75 % (v/v)	PMSF 0.1 mM
Pipes 5 mM pH 7.2	PMSF 0.1 mM	Pipes 5 mM pH 7.2
NaCl 5 mM	Pipes 5 mM pH 7.2	NaCl 5 mM
MgCl ₂ 5 mM	NaCl 5 mM	MgCl ₂ 5 mM
	MgCl ₂ 5 mM	
Tampón A-PA	Tampón B-PA	Tampón C-PA
Sacarosa 0.25 M	Sacarosa 2.3 M	Sacarosa 2.3 M
PMSF 1 mM	Tritón X-100 0.75 % (v/v)	PMSF 0.1mM
Espermina 0.2 mM	PMSF 0.1 mM	Espermina 0.2 mM
Espermidina 0.5 mM	Espermina 0.2 mM	Espermidina 0.5 mM
	Espermidina 0.5 mM	

Tabla 9.2: Tampones utilizados para el estudio de la cromatina interfásica

Tampón PE ^a	Tampón PM	Tampón PMKN	Tampón PAKN
Pipes 10 mM	Pipes 5 mM	Pipes 5 mM	Pipes 5 mM
EDTA 10 mM	NaCl 5 mM	NaCl 20 mM	NaCl 20 mM
	MgCl ₂ 1-5 mM	KCl 120 mM	KCl 120 mM
		MgCl ₂ 2.5-17 mM	Espermina 0.2 mM
			Espermidina 0.5 mM

^aEn ocasiones se sustituyó Pipes 10 mM por TEA-HCl 10 mM (TE).

9.2. Métodos de desestructuración de núcleos interfásicos

Según Strick et al. (2001), el núcleo interfásico contiene una concentración de Mg²⁺ de 2-4 mM. Por esta razón, se decidió incubar núcleos en presencia de concentraciones de Mg²⁺ de 1, 2, 3, 4, y 5 mM. Los núcleos purificados en tampón C se diluían 3 veces con tampón PM con concentraciones variables de Mg²⁺. Se incubaban en estas condiciones durante 90 minutos a temperatura ambiente. Al final, se realizaba una dilución 1:10 empleando el mismo tampón en el que se encontraba la muestra y la suspensión nuclear se incubaba en estas condiciones durante tiempos variables.

También se emplearon tampones de baja fuerza iónica compuestos básicamente por EDTA (ver Tabla 9.2). El tratamiento consistía en realizar la dilución 1:10 de la suspensión de núcleos con estos tampones. Finalmente, la suspensión se incubaba durante 90 minutos a temperatura ambiente. En algunos experimentos la incubación final se realizó con la muestra previamente depositada sobre rejilla.

En otros experimentos se realizó la incubación en presencia del detergente Tritón X-100 0.75 % (v/v). También se hizo pasar la muestra 7-20 veces a través de una aguja hipodérmica de 22G1 (Sigma-Aldrich) acoplada a una jeringuilla de 5 ml. Este paso se realizaba justo antes de la incubación de la muestra. La concentración de Mg^{2+} empleada en estos experimentos era de 2.5 mM o 5 mM.

El efecto de los ultrasonidos como método de desestructuración también ha sido ensayado. Para ello, se empleaba el sonicador Sonifier 450 (Branson) trabajando a una intensidad de 2 y una amplitud del 50 %. Antes de comenzar, se limpiaba la aguja del sonicador, primero con etanol al 70 % (v/v) y después con agua destilada. La suspensión de núcleos, contenida en un tubo plástico con fondo cónico, se colocaba en el interior de un vaso de precipitados con hielo. Era importante mantener la temperatura baja durante los ciclos de sonicación ya que el propio tratamiento podía calentar la muestra. La aguja del sonicador se sumergía en la muestra, con precaución de que no tocara las paredes del tubo. La sonicación se realizaba durante 3 ciclos de 5 pulsos cada uno, dejando reposar la muestra durante 3 minutos entre ciclo y ciclo.

También se evaluó el efecto de la agitación de los núcleos en presencia de bolas de vidrio como método de desestructuración. Este tratamiento se realizaba justo antes de la incubación. Se añadían 0.5 volúmenes de bolas de vidrio con un diámetro de $\sim 100 \mu m$ (Sigma-Aldrich) y se procedía a la agitación con vortex; se realizaron entre 2 y 6 ciclos de 5 segundos.

En todos los casos, una vez realizada la incubación de la muestra se procedía a activar el carbono de las rejillas para microscopía electrónica, tal como se indica en el apartado 7.3.4.1. Finalmente, la muestra se depositaba sobre las rejillas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.3.5.

9.3. Separación de núcleos en diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo

Para realizar experimentos de separación de núcleos en función de la fase del ciclo celular en la que se encontraban, fue necesario emplear una gran cantidad de material de partida. Los núcleos presentaban una elevada tendencia a la agregación, y la concentración de núcleos en la suspensión final solía ser muy baja en relación a la gran cantidad de núcleos iniciales que se obtenían.

Se empleaban entre 3 y 8 frascos de cultivo de 225 cm² como material de partida. Los núcleos se purificaban siguiendo el protocolo explicado en el apartado 8.5. El sedimento nuclear obtenido se resuspendía vigorosamente en el tampón PMKN 5mM Mg^{2+} a una concentración de 2×10^7 núcleos/ml (valor calculado asumiendo que el número de núcleos purificados era equivalente al número de células obtenidas). A continuación, se procedía a realizar el marcaje de los núcleos mediante un fluorocromo que, por un lado fuera capaz de introducirse en el núcleo, y por otro lado, fuese

detectable mediante los láseres disponibles en el separador celular FACSAria II (BD Biosciencias). El fluorocromo escogido fue el Hoechst 33342 (Life Technologies), por su capacidad para unirse a la doble hebra de ADN y por presentar la ventaja de que no requería la fijación previa de la muestra (Srouf y Jordan, 2002). Se preparaba una disolución stock de Hoechst 33342 a una concentración de 10 mg/ml en agua MilliQ. Esta disolución se guardaba en alícuotas de 100 μ l protegidas de la luz y a una temperatura de -20 °C; en estas condiciones era estable un tiempo máximo de 6 meses. La disolución stock se diluía 20 veces empleando PBS. Esta solución se mantenía protegida de la luz a 4 °C y se mantenía activa durante aproximadamente un mes. Según el volumen de núcleos del que se disponía, se calculaba el volumen de fluorocromo que se debía añadir a la suspensión. Las condiciones óptimas de marcaje se determinaron previamente, y correspondían a la adición de 0.5 μ moles de fluorocromo por cada 10^6 células. Los núcleos se incubaban en presencia del fluorocromo durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se resuspendían vigorosamente con ayuda de una punta de pipeta de 1 ml y se transferían a un homogeneizador de vidrio tipo Dounce provisto de un pistón. Los núcleos se disgregaban pasándola por el pistón 10 veces. A continuación, se empleaba una aguja hipodérmica de 22G1 (Sigma-Aldrich) acoplada a una jeringa con el fin de minimizar los agregados. Acto seguido, la suspensión de núcleos se filtraba mediante un filtro de 30 μ m de diámetro de poro, para eliminar los agregados que pudieran haber quedado. Hecho esto, se procedía a separar los núcleos, en fracciones de 1 ml, sin aplicar rotación a la muestra y a una temperatura de 4 °C. El citómetro se configuraba para obtener tres subpoblaciones: núcleos en fase G₁, S y G₂. Los núcleos se recogían en tubos de plástico de 1.5 ml que contenían 0.7 ml de tampón PMKN 5mM Mg²⁺. Se anotaba el número de núcleos que se habían recogido en cada tubo.

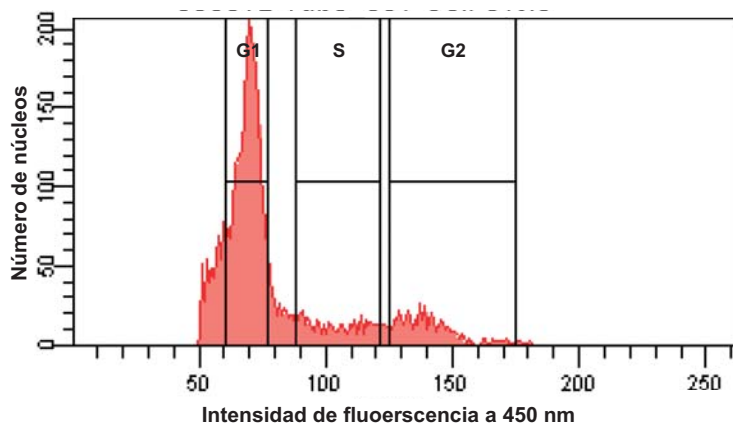


Figura 9.1: Análisis del ciclo celular de núcleos interfásicos mediante citometría de flujo. Se representa el número de núcleos (eje Y) respecto a la intensidad de fluorescencia a 450 nm (emisión del Hoechst 33342; eje X).

Para estudiar la estructura de la cromatina se aplicaban los tratamientos desestructurantes descritos en el apartado 9.2. Se seguía con el proceso de activación del carbono de las rejillas de microscopía (apartado 7.3.4.1) y la extensión de la muestra

se realizaba por centrifugación (apartado 7.3.5.2). Después, se realizaba la incubación en cámara de polipropileno (apartado 7.1.2) y finalmente la fijación (apartado 7.3.6).

9.4. Obtención de fragmentos de cromatina interfásica

9.4.1. Digestión con nucleasa micrococcal

Se utilizaba nucleasa micrococcal (Sigma-Aldrich) para fragmentar la cromatina procedente de los núcleos interfásicos purificados, siguiendo el protocolo descrito previamente para la cromatina procedente de cromosomas metafásicos (Milla, 2011). Se preparaba una solución stock de esta enzima en agua MilliQ a una concentración de 1 mg/ml (215 U/ml). A continuación, se diluía 100 veces, también con agua MilliQ, y se guardaba en alícuotas de 100 μ l. Estas soluciones podían mantenerse a -20 °C durante largos periodos de tiempo, o bien a 4 °C durante un mes. La actividad de la nucleasa micrococcal es dependiente de Ca^{2+} , que se añadía a partir de una disolución stock de CaCl_2 a una concentración de 500 mM.

Para llevar a cabo la digestión, se colocaba la suspensión de núcleos en un tubo plástico cónico de 50 ml y se sumergía en un baño de agua a 37 °C durante 5 minutos. Se añadía CaCl_2 para conseguir que la concentración final fuera de 1 mM. A continuación, se añadía el volumen necesario de nucleasa micrococcal para tener una actividad de 10^{-2} – 10^{-3} U/ml en cada tubo de reacción. La digestión se realizaba durante 1h a 37 °C con la muestra en agitación.

Para poner fin a la digestión se añadía EDTA pH 7.5 (concentración final 10 mM), para quelar iones de Ca^{2+} y el tubo se sumergía en un baño de agua-hielo durante 10 minutos.

9.4.2. Lavados en condiciones de baja fuerza iónica

Con la finalidad de obtener filamentos de cromatina, la muestra digerida se dializaba en saco (apartado 7.1.1) en presencia de tampón desestructurante (PE; ver Tabla 9.2) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, el digerido se transfería a tubos plásticos de 1.5 ml donde se centrifugaba empleando la centrífuga Eppendorf 5415D; en caso de que se obtuvieran volúmenes considerables de digerido se empleaban tubos de 15 ml que eran centrifugados con la centrífuga Beckman Allegra 6R (rotor Beckman GH-3.8). En ambos casos, la muestra se centrifugaba a $2500\times g$ durante 10 minutos y a 4 °C. El sobrenadante, que contenía los fragmentos de cromatina, se transfería a un tubo nuevo y se procedía a cuantificar la concentración empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo). Se limpiaba el lugar de colocación de la muestra del espectrofotómetro con agua MilliQ. A continuación, el aparato se calibraba con 2 μ l del mismo tampón en el que se encontraba la muestra. Finalmente, se depositaban 2 μ l de muestra y se determinaba la concentración de cromatina cuantificando su absorbancia a 260 nm.

Para poder observar filamentos de nucleosomas claramente visibles en el microscopio electrónico de transmisión, era necesario diluir la muestra hasta obtener una concentración baja (equivalente a una absorbancia de 0.0004 unidades). Se realizaba

una primera dilución 1:10 empleando agua MilliQ (las concentraciones del tampón quedaban: EDTA 1mM, Pipes 1 mM). Las sucesivas diluciones se realizaban con tampón PE diluido 10 veces. La extensión de fragmentos de cromatina sobre rejillas para TEM y la fijación se realizaban siguiendo los protocolos descritos en los apartados 7.3.5.1 y 7.3.6.1, respectivamente.

9.4.3. Análisis de fragmentos de digestión: electroforesis de DNA

El análisis del tamaño de los fragmentos obtenidos de la digestión de cromatina interfásica se realizaba mediante una electroforesis desnaturante de DNA en gel de agarosa al 0.7% (p/v) en presencia de SDS. El proceso electroforético se ha llevado a cabo mediante el sistema Mini Sub-Cell (Bio-Rad).

Se pesaba la cantidad de agarosa necesaria en un matraz de Erlenmeyer y se añadía el volumen adecuado de tampón de electroforesis TBEx1 (Tris 90 mM, Ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM). Esta mezcla se calentaba hasta llevarla a ebullición, agitando de vez en cuando. Cuando la solución era completamente transparente, se añadió SDS hasta una concentración final de 0.1% (p/v) y se dejó enfriar (se utilizó un stock de SDS al 10% p/v). Mientras tanto, se preparaba el molde para el gel; se sellaron las paredes con cinta adhesiva y se colocó (a 1-2 mm del fondo del molde) la pieza que daría forma a los pocillos que contendrían la muestra. Cuando el matraz con la agarosa disuelta se podía tocar con las manos sin quemarse, la temperatura era adecuada para verterla sobre el molde. La agarosa se dejó gelificar durante aproximadamente 1 hora. Pasado este tiempo, se retiró la pieza que genera los pocillos y la cinta adhesiva del molde. Finalmente, el gel se sumergía en la cubeta y se añadía tampón de electroforesis de forma que cubriera completamente el gel.

Paralelamente, se preparaban las muestras que se iban a analizar en el gel. El primer paso consistía en concentrar el material proveniente de la digestión. Para ello, se emplearon tubos Amicon Ultra-4 (poro de 10 kDa; Merck Millipore) que se centrifugaron a $4000\times g$ en la centrífuga Heraeus Megafuge 2.0R (rotor Heraeus #2704) o en la Beckman Allegra 6R (rotor Beckman GH-3.8) a una temperatura de 4 °C. Los filtros debían limpiarse previamente, centrifugando 1 ml de agua MilliQ a $4000\times g$ durante 20 minutos. A continuación, se retiraban los restos de agua del filtro, se añadía la muestra y se repetía el proceso de centrifugación. Puesto que el volumen de muestra obtenido era variable en cada experimento, se solía centrifugar en tandas de 20 minutos. Tras cada centrifugación, se observaba el volumen sobre el filtro y se decidía si se debía continuar con el proceso. Al final, se obtenían unos 100 μl de muestra, cuya concentración se determinaba empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo), tal como se indica en el apartado 9.4.2. La muestra concentrada se incubaba en presencia de SDS al 1% durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se diluía con tampón de muestras para electroforesis de DNA 5x [Ficoll 2.5% (p/v), azul de bromofenol 0.125% (p/v), xilencianol 0.125% (p/v), Tris 0.45 M y ácido bórico 0.45 M]¹ y se introducía en los pocillos del gel con una micropipeta.

Para poder determinar la longitud de los fragmentos, en uno de los carriles del

¹Una vez determinado el tiempo de electroforesis necesario para resolver los fragmentos de la digestión, se preparó un tampón de muestras que contenía ficoll, Tris, ácido bórico y muy poca cantidad de xilencianol. Se conseguían así geles más limpios sin interferencia de los colorantes.

gel se cargaba el marcador de peso molecular DRigest III (GE Healthcare). Este marcador contenía una mezcla de fragmentos de tamaños comprendidos entre 72 y 23130 pb obtenidos de la digestión del fago λ con la enzima de restricción *Hind* III y del fago ϕ X-174 digerido con la enzima *Hae* III. Se añadían 50 μ l de agua MilliQ al vial comercial del marcador y se agitaba vigorosamente. Se prepararon alícuotas de 20 μ l del marcador diluido 4 veces en agua MilliQ, que se conservaban a 4 °C. Justo antes de su utilización, se cogían 4 μ l de marcador por pocillo a cargar y se calentaban en un termobloque a 60 °C durante 1 minuto. Finalmente, se añadía 1 μ l de tampón de muestras por cada 4 μ l de marcador y se cargaban 5 μ l en cada carril del gel. La separación electroforética de fragmentos de cromatina se llevaba a cabo durante 1 hora aplicando un voltaje de 100 V.

Para poder observar la posición de los fragmentos de cromatina en el gel de agarosa, se empleaba el marcador fluorescente bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Debido a su elevada capacidad mutagénica se debía manipular con mucha precaución en una zona reservada del laboratorio. Todo el material empleado en la manipulación, así como los residuos generados, se desechaban en recipientes adecuados. El vial comercial de dicho fluorocromo se distribuye a una concentración de 10 mg/ml. Para la tinción se preparaba una solución de bromuro de etidio a 1 μ g/ml y se vertía en una cubeta de plástico donde previamente se había colocado el gel. El marcaje del DNA se realizaba agitando suavemente la cubeta durante 10 minutos. A continuación, se descartaba la solución que contenía el fluorocromo y se lavaba el gel con agua destilada, renovando el agua cada 5 minutos. Finalmente, se utilizaba el sistema Gel Doc 1000 (Bio-Rad) para iluminar el gel con luz ultravioleta y obtener una fotografía.

9.5. Tratamientos para la autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica

9.5.1. Diálisis en condiciones fisiológicas

Para estudiar la capacidad autoasociativa de la cromatina interfásica se ha empleado el tampón PMKN, con concentraciones de magnesio de 2.5, 5, 10 y 17 mM (ver Tabla 9.2). La elección de las concentraciones de Mg^{2+} a ensayar se realizó según los resultados de Strick et al. (2001), que mostraban un aumento de la concentración de Mg^{2+} a lo largo del ciclo celular.

Una vez finalizada la diálisis desestructurante (apartado 9.4.2) se procedía a dializar de nuevo la muestra, pero esta vez empleando condiciones iónicas que promovían la asociación. Los sacos de diálisis se transferían a un vaso de precipitados que contenía 1 l de tampón PMKN y se dializaban durante 4 horas empleando una temperatura de 4 °C.

Capítulo 10

Métodos para el estudio de la estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos

Desde el descubrimiento de las láminas de cromatina en torno a cromosomas metafásicos parcialmente desnaturalizados, los trabajos realizados en nuestro laboratorio han tenido por objetivo el estudio de estas estructuras en diversas condiciones. Gran parte de los resultados que se muestran en este trabajo dan continuación a esa línea de investigación. En este capítulo se detallan los métodos empleados en esta parte de la tesis.

10.1. Medios empleados en el estudio de la cromatina metafásica

En el presente apartado se detallan los tampones empleados durante la realización de experimentos de obtención de cromosomas y placas metafásicas en gran cantidad. Todos los tampones se preparaban el día anterior a la realización del experimento a partir de sales concentradas a 1-2 M y se filtraban empleando los filtros descritos en la Tabla 7.1 del apartado 7.3.1.

Los cromosomas se aislaban empleando el tampón de lisis PA [poliaminas: espermina (Sigma-Aldrich) y espermidina (Sigma-Aldrich); ver Tabla 10.1]. Los componentes líquidos se mezclaban a la concentración adecuada y una vez enrasado el volumen que se deseaba, se disolvían la espermina y la espermidina. Justo antes de emplear el tampón, debía complementarse con digitonina (Sigma-Aldrich), un detergente que facilitaba la rotura de la membrana plasmática. Se añadía digitonina a una concentración de 1 mg/ml y la solución se calentaba en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos. La disolución se agitaba con vortex cada 5 minutos para favorecer la disolución del detergente.

Durante el proceso de obtención de cromosomas para su análisis mediante SAXS, se ha empleado una variante de tampón de lisis en la que las poliaminas se han sustituido por magnesio y la digitonina por Tritón X-100 (ver Tabla 4.1). En estos experimentos también se empleaban dos tampones estructurantes (PCo y SA) (ver

Tabla 10.2). En el estudio de placas mediante crio-microscopía se empleaba básicamente el tampón PM como tampón estructurante.

Tabla 10.1: Tampones para provocar la lisis celular

Tampón PA	Tampón MT
TEA 15 mM pH 7.4	TEA 15 mM pH 7.4
EGTA 0.5 mM	KCl 80 mM
EDTA 2 mM	NaCl 20 mM
KCl 80 mM	MgCl ₂ 5 mM
NaCl 20 mM	Tritón X100 0.1-0.5 % (v/v)

Tabla 10.2: Tampones estructurantes

Tampón PM	Tampón PCo	Tampón PMKN
Pipes 5 mM pH 7.2	Pipes 10 mM pH 7.2	Pipes 5 mM pH 7.2
NaCl 5 mM	Co(NH ₃) ₆ ³⁺ 1 mM	NaCl 20 mM
MgCl ₂ 5 mM		KCl 120 mM
		MgCl ₂ 5-17 mM

10.2. Extracción de cromosomas. Purificación en gradiente de sacarosa

El sedimento celular obtenido siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.6.2 se resuspendía en medio hipotónico (KCl 75 mM) equilibrado a 37 °C, a una concentración celular de $2 \cdot 10^6$ células/ml. Este medio permite la entrada de agua al interior celular mediante ósmosis y provoca la desestabilización de la membrana celular. Las células se incubaban en estas condiciones en un baño de agua durante 10 minutos a 37 °C. Mientras se realizaba la incubación, se complementaba el tampón PA con digitonina (ver apartado 10.1) y se filtraba mediante una membrana de 0.22 μ m de diámetro de poro. Pasado el tiempo de incubación, las células se centrifugaban a $275 \times g$ (centrífuga Beckman Allegra 6R con el rotor GH-3.8) durante 5 minutos a 4 °C, y se desechaba el sobrenadante. Según el experimento, el sedimento celular se resuspendía en el tampón de lisis adecuado (ver Tabla 10.1) a una concentración de $8 \cdot 10^6$ células/ml y se transfería a un homogeneizador de vidrio tipo Dounce provisto de un pistón, que se pasaba a través de la muestra 15 veces. El homogeneizado se transfería a un tubo tipo Corex, donde se centrifugaba a $200 \times g$ (centrífuga Beckman Allegra 6R) durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante, que contenía los cromosomas, se reservaba en un tubo a parte y el sedimento se resuspendía de nuevo en 1 ml de tampón de lisis y se repetía la operación.

Los cromosomas se purificaban empleando un gradiente escalonado formado por 4 fases que contenían sacarosa al 60 %, 50 %, 40 % y 30 % (p/v) disuelta en tampón PM (ver Tabla 10.2). El gradiente se preparaba en tubos de 7 ml (Nalgene centrifuge) y sobre él se añadían 3 ml de la suspensión de cromosomas (si el volumen que se había obtenido era menor, se añadía tampón PM hasta completar los 3 ml). Los gradientes se centrifugaban a $4000\times g$ en el rotor JS 13.1 (Beckman Coulter) empleando la centrífuga J2-HS (Beckman Coulter) durante 15 minutos a 4 °C y sin freno. Los cromosomas se recuperaban de las interfases 60-50 % y 50-40 % (p/v) de sacarosa mediante una pipeta Pasteur de vidrio.

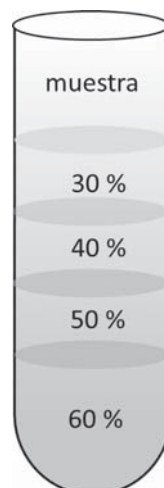


Figura 10.1: Esquema del gradiente escalonado empleado para la purificación de cromosomas. Los cromosomas se recuperaban de las interfases 60 %-50 % (p/v) y 50 %-40 % (p/v).

10.3. Experimentos de dispersión de rayos-X a bajo ángulo de cromosomas

10.3.1. Generación de un sedimento de cromosomas

Se realizaban centrifugaciones secuenciales de la suspensión de cromosomas en tubos de 1.5 ml con fondo cónico. La muestra se dividía en tantos tubos como sedimentos se quisieran generar y se iba centrifugando hasta generar un sedimento más o menos esférico. Las centrifugaciones se realizaban a una velocidad de $4000\times g$ durante 5 minutos y a 4 °C empleando el rotor vasculante JS 13.1 y la centrífuga J2-HS (Beckman Coulter). A continuación, el sedimento de cromosomas se lavaba con 1 ml de tampón PM, invirtiendo el tubo 2-3 veces. Finalmente, se incubaban en agitación y a 4 °C durante toda la noche con 1 ml del tampón de elección en cada experimento. El tampón final se preparaba con un 40 % (v/v) de glicerol UltraPure (Invitrogen), que se empleaba como criopreservante. La muestra se conservaba en el interior de capilares a -80 °C hasta la realización de los experimentos.

10.3.2. Introducción del sedimento de cromosomas en el capilar

Para la realización de los experimentos de SAXS de cromosomas, se han empleado capilares MicroRT (MiTeGen), diseñados para trabajar bajo rayos X a temperatura ambiente. El sedimento de cromosomas se introducía en el capilar con ayuda de una punta de pipeta para cargar geles de electroforesis. El capilar se llenaba con el mismo tampón en el que se encontraba la muestra. A continuación, se sellaba el extremo del capilar con cera dental W050 (TAAB). Se cortaban trozos pequeños de cera y se introducían en tubos plásticos de 1.5 ml, que se llenaban aproximadamente al 80 %

de su capacidad. Los tubos se calentaban en un termobloque a 70 °C hasta que la cera tuviese una textura líquida. Para sellar el extremo, se sumergía brevemente la punta del capilar en la cera y se dejaba enfriar. Se repetía el proceso varias veces hasta obtener un tapón de cera más o menos esférico. Finalmente, los capilares debían desinfectarse. Se preparaba una solución de lejía al 3 % (v/v) en agua destilada. En una cápsula de Petri, se añadían 25 ml de lejía y se introducía el capilar durante 2 minutos. Transcurrido el tiempo, se daba la vuelta al capilar y se repetía la operación. Los restos de lejía se eliminaban repitiendo el procedimiento con 25 ml de agua MilliQ. Finalmente, los capilares se secaban con papel absorbente y se conservaban en tubos plásticos rotulados a -80 °C hasta su procesamiento.

10.3.3. El soporte de la muestra dentro de la cabina experimental

Durante los experimentos de SAXS, los capilares que contenían los cromosomas debían fijarse a la plataforma portamuestras de la cabina experimental. Cada capilar se fijaba a un soporte magnetizado mediante una goma tubular, y el soporte podía fijarse a la plataforma metálica en la posición deseada. El capilar quedaba dispuesto en posición horizontal, y perpendicular al haz de rayos X, como se muestra en la Figura 10.2. La plataforma portamuestras tenía autonomía de movimiento. Una cámara de vídeo en el interior de la cabina experimental permitía observar la posición del capilar, pudiendo modificarla desde la estación de control.



Figura 10.2: Capilar con cromosomas fijado a la plataforma móvil en el interior de la cabina experimental de la línea NCD en ALBA. 1 Capilar que contiene el sedimento de cromosomas, 2 imanes acoplados a la plataforma y 3 plataforma móvil.

10.3.4. Adquisición de medidas

La adquisición de datos se realizó empleando un haz de rayos X con una longitud de onda de 1.29 Å. Gracias al sistema colimador, la superficie del haz al impactar contra la muestra era de $600 \times 138 \mu\text{m}$. La superficie de colimación del haz en la muestra depende de la posición en la que se encuentre. Para la realización de nuestros experimentos, la distancia entre la muestra y el detector se fijó a 2.61 m. Esta distancia es la mínima que permite la configuración de la línea NCD y fue elegida

porque nos permitía adquirir datos en un rango de distancias comprendidas entre 1.7 y 94 nm. La detección de los patrones de dispersión se realizó mediante el detector CCD SAXS Quantum 210r (ADSC). Este detector presenta un área de $210 \times 210 \text{ mm}^2$ y un tamaño de píxel de $102.4 \times 102.4 \mu\text{m}^2$. La velocidad máxima de adquisición mediante este detector era de 1 imagen cada 5 segundos.

La calibración del detector se realizó con un material estándar, el behenato de plata. Este material presenta un patrón de difracción muy bien definido a ángulos bajos, por lo que sirve de referencia para calibrar los ángulos de difracción pequeños.

El patrón de *scattering* de cada muestra de cromosomas se obtenía a partir de la suma de los patrones de *scattering* de diferentes regiones a lo largo de la longitud del capilar. Para obtener el patrón de *scattering* producido por los cromosomas, era necesario sustraer la contribución del medio en el que se encontraban. Así pues, cada adquisición implicaba determinar primero el patrón de dispersión debido únicamente al medio, y después, el correspondiente a los cromosomas junto con el medio.

El proceso de adquisición era controlado desde la estación de control por medio de software especializado. Desde allí era posible modificar muchos parámetros, pero la parte más importante de este software era la encargada del control de las adquisiciones *Time Frame Generator*. Uno de los parámetros más importantes del experimento era el tiempo de exposición. Éste tiempo era crítico ya que una exposición demasiado larga, aunque podía proporcionar mayor información, podía también dañar la muestra. Asimismo, resultaba crítico para el detector, cuyo tiempo de vida se ve reducido tras exposiciones largas al haz de rayos X. El análisis de la dispersión de cromosomas metafásicos se realizó a partir de imágenes adquiridas con un tiempo de exposición de 60 segundos.

10.3.5. Procesamiento de las medidas

Durante el procesado de los patrones de dispersión de cromosomas se han empleado los programas FIT2D (Hammersley, 1997, 1998) y ATSAS PRIMUS (Konarev et al., 2003).

Dado que los rayos X dispersados se recogían en 2 dimensiones en el plano de detección, se obtenía un patrón de dispersión bidimensional, $I_{exp}(m_y, m_z)$, siendo m_y y m_z el número de píxel horizontal y vertical, respectivamente. Los valores de píxel se convertían a valores de q teniendo en cuenta el valor de la longitud de onda (1.292 \AA), el tamaño de píxel ($102.4 \times 102.4 \mu\text{m}$) y la distancia entre los cromosomas y el detector (2.61 m). De ésta manera, se obtenían perfiles unidimensionales donde se representaba $I_{exp}(q)$. Esta primera transformación se realizaba con el programa FIT2D. A continuación, se introducían los parámetros descritos anteriormente en las casillas adecuadas de la interfaz gráfica de FIT2D. Al final, el programa generaba el gráfico de intensidades en función de q (nm^{-1}) para cada una de las adquisiciones realizadas.

Una vez obtenida la función $I(q)$ de cada adquisición, se empleaba el programa ATSAS PRIMUS para obtener tablas de valores de cada uno de los gráficos $I(q)$. Se procedía entonces a sumar los datos de las series de adquisiciones de la misma muestra o tampón y se sustraía la función del tampón correspondiente a cada una

de las adquisiciones de cromosomas (ver Figura 10.3).

$$\Delta I(q) = I_{muestra}(q) - I_{medio}(q) \quad (10.1)$$

Si la intensidad de la muestra es menor que la intensidad del medio en el que se encuentra, el resultado de la ecuación 10.1 será negativo. Para evitar valores negativos de intensidad puede aplicarse un factor de corrección. En nuestro caso, aplicábamos un factor de 0.98 a los valores de intensidad del medio (ecuación 10.2).

$$\Delta I(q) = I_{muestra}(q) - 0,98 \times I_{medio}(q) \quad (10.2)$$

Para interpretar estos datos y relacionarlos con la estructura interna de los cromosomas, se transformaban los valores de q en valores S . Para realizar esta transformación se empleaba la equivalencia de $S = q/2\pi$. Finalmente, se representaba $\log(I \cdot S^2)^1$ en función de S , en nm^{-1} . Para extraer los valores de las distancias repetitivas en la muestra, se determinaba el valor de S (eje X) que correspondía a cada máximo de intensidad (eje Y) y se calculaba la inversa.

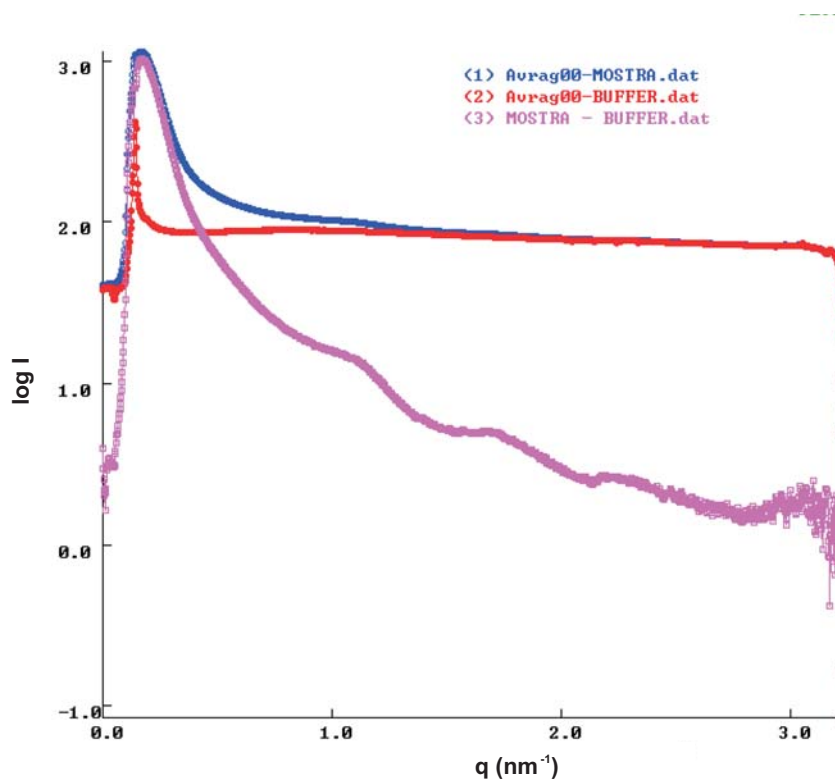


Figura 10.3: Ejemplo de la representación gráfica obtenida utilizando el programa ATLAS Primus. Se muestra la media (average) de 4 espectros de cromosomas, la media de 3 espectros de tampón y la diferencia entre la media de la muestra y la del tampón. En este caso se ha aplicado un factor de corrección de 0.98.

¹Siendo I la intensidad y S el vector de *scattering*.

10.4. Métodos para la reconstrucción tridimensional de placas metafásicas mediante crio-TE

Tanto la vitrificación de la muestra como la adquisición de proyecciones para su reconstrucción tomográfica se han realizado en el Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried, München). Las reconstrucciones tomográficas han sido posibles gracias al soporte técnico de la Unidad de Biocomputación del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC; Madrid).

10.4.1. Precauciones con el nitrógeno líquido

La manipulación de nitrógeno líquido presenta algunos riesgos que debían ser conocidos. Por un lado, se debía tener en cuenta que la temperatura a la que se encuentra el nitrógeno líquido a presión atmosférica es de -196 °C , por lo que el simple contacto con la piel puede producir quemaduras. Por otro lado, el nitrógeno líquido se evapora rápidamente, provocando un aumento de la concentración de nitrógeno en el aire, y el consiguiente desplazamiento del oxígeno. La disminución de la cantidad de oxígeno en el aire puede provocar la asfixia del usuario en un corto periodo de tiempo. Por todo esto, el nitrógeno líquido debía manipularse en espacios ventilados y empleando equipos de protección individual como guantes térmicos y máscaras o gafas.

10.4.2. Rejillas para criomicroscopía electrónica

El soporte de las rejillas para crio-TE estaba formado por una película de carbono perforado Quantifoil (Quantifoil Micro Tools) que presentaba unos agujeros de tamaño determinado. La función del carbono Quantifoil era dar soporte a la muestra en el proceso de vitrificación, permitiendo que buena parte quedase vitrificada en los agujeros. La adquisición de las micrografías se realizaba en estos agujeros, de manera que la presencia de carbono no interfería en el proceso de reconstrucción.

En nuestros experimentos se han usado rejillas de cobre y molibdeno de 200 campos recubiertas de Quantifoil circular $2/1^2$. Las rejillas de molibdeno presentaban la ventaja de que al tener una malla más ancha, permitían vitrificar una película de muestra ligeramente más gruesa que las de cobre.

10.4.3. Procedimiento para la obtención de placas en gran cantidad

Los cromosomas purificados según el apartado 10.2 se diluían 5 veces con el tampón PM. A continuación, la suspensión se pasaba 1 o 5 veces a través de una aguja hipodérmica de 22G1 (Sigma-Aldrich) acoplada a una jeringa. Finalmente, los cromosomas parcialmente desestructurados se dializaban en saco (ver apartado 7.1.1) en presencia de 1 l de tampón PM durante 2.5 horas a 37 °C . Acabada la diálisis, la suspensión de placas se transfería a un tubo plástico estéril de 15 ml, donde se conservaba a 4 °C .

²El primer número indica el diámetro del agujero y el segundo el espaciado mínimo entre agujeros, ambos en μm .

10.4.4. Deposición de la muestra sobre rejillas para criomicroscopía

Se han evaluado diversos protocolos de deposición, con el fin de favorecer la adhesión de una gran cantidad de placas sobre la superficie de las rejillas.

Por un lado, se han realizado curaciones de la suspensión de placas (ver apartado 10.4.3), sobre rejillas previamente activadas. Se añadían 200 μl de muestra en el interior de un tapón con junta tórica para tubos de polipropileno de 1.5 ml (Sarstedt). Los tapones se disponían sobre una hoja de Parafilm en hielo. A continuación, se colocaba la rejilla con el carbono hacia arriba en el fondo del tapón, y se cerraba el tubo manteniendo la posición invertida. Se permitía la adhesión de la muestra durante 1, 2, 3, 4 o 16 horas a 4 °C.

Por otro lado, también se ha aplicado el procedimiento convencional para la deposición de muestra sobre rejillas para TEM, esto es, centrifugar la muestra directamente sobre Quantifoil activado (ver procedimiento en el apartado 7.3.5.2).

10.4.5. Adición de nanopartículas de oro y vitrificación de la muestra

La vitrificación de la muestra se realizaba por inmersión rápida en agente criogénico de forma automatizada mediante el sistema Vitrobot Mark III (FEI). Se empleaba una mezcla de etano y propano como agente criogénico, contenido en un pequeño receptáculo que se mantenía a muy baja temperatura gracias al nitrógeno líquido que fluía alrededor.

Inicialmente, se colocaban unos filtros circulares de papel Whatman en los discos del equipo, que servían para retirar el exceso de muestra. A continuación, la rejilla que contenía la muestra previamente depositada por centrifugación (ver apartado 10.4.4), se fijaba al robot por medio de unas pinzas de precisión. Se accionaba un pedal para que la rejilla descendiera hasta la altura en la que se encontraba la ventana por la que se introducía una micropipeta con 2 μl de nanopartículas de BSA-oro de 10 μm de diámetro (Aurion). Las nanopartículas se depositaban sobre la muestra y se mezclaba suavemente. Acto seguido, se accionaba el pedal sucesivamente hasta que la rejilla quedaba sumergida en el contenedor con el agente criogénico. Para acabar, se transfería la rejilla de forma manual a una caja almacenadora sumergida en nitrógeno y, finalmente, las cajas correctamente rotuladas se guardaban en tanques de nitrógeno líquido. El proceso se realizaba a 22 °C, 95 % de humedad, empleando un tiempo de secado de la rejilla de 6 segundos y manteniéndola en una posición vertical de -3 mm (*blot*



Figura 10.4: Sistema de criofijación de muestras Vitrobot Mark III (FEI). Fuente: <http://www.nuance.northwestern.edu>

offset). Se obtuvieron mejores resultados en el proceso de vitrificación sustituyendo uno de los discos secantes por un disco de teflón.

Era muy importante que durante el proceso de vitrificación se conservara la atmósfera formada en torno al recipiente que contenía el agente criogénico, evitando corrientes de aire y movimientos bruscos. Todos los instrumentos que se utilizaban en la manipulación de las rejillas debían secarse previamente para retirar la humedad que se condensaba. Se debía minimizar al máximo la humedad de todos los recipientes y herramientas, para evitar la formación de hielo cristalino en las preparaciones.

10.4.6. Adquisición de series de proyecciones

La crio-tomografía electrónica se ha realizado empleando los microscopios electrónicos de transmisión Tecnai G2 Polara (FEI) y Titan Krios (FEI). Este último estaba equipado con una placa de fase Volta (FEI) (Danev et al., 2014), que permitía aumentar considerablemente el contraste y obtener, por consiguiente, reconstrucciones tridimensionales con mejor resolución. El aumento del contraste permite obtener cada proyección empleando una menor dosis electrónica, por lo que se puede obtener un mayor número de proyecciones para una misma dosis electrónica total³. Además, la incorporación de dicha placa de fase aumenta el contraste en el plano de foco, por lo que no es necesario aplicar un enfoque negativo para generar contraste, como ocurre cuando no tenemos placa de fase.

Las imágenes empleadas en la obtención de reconstrucciones tridimensionales obtenidas sin emplear la placa de fase, se han adquirido mayoritariamente en el microscopio Tecnai G2 Polara, con un voltaje de aceleración máximo de 300 kV, filtro de energía GIF 2002 (Gatan) y equipado con una cámara K2 Summit de detección directa de electrones (Gatan). Se han adquirido series de proyecciones cada 2° mediante el programa SerialEM (que permite la automatización del proceso; Mastronarde, 2005), aplicando un enfoque negativo de 5-6 μm y empleando una magnificación relativa de 27500 \times . El tamaño de píxel es 4.27 Å. Bajo estas condiciones, se han obtenido 7 series de adquisiciones.

Las imágenes empleadas en la obtención de reconstrucciones tridimensionales obtenidas empleando la placa de fase Volta, se han adquirido en el microscopio Titan Krios⁴, con un voltaje de aceleración de 300 kV y equipado también con una cámara Gatan K2 Summit. Se han adquirido series de proyecciones cada 2°⁵ mediante el programa SerialEM (Mastronarde, 2005), aplicando un enfoque negativo de 0.5 μm y empleando una magnificación relativa de 33000 \times . El tamaño de píxel es de 4.21 Å. En estas condiciones se han obtenido 26 series de adquisiciones.

³La dosis electrónica óptima era de 60 electrones/Å². Durante la adquisición de las series tomográficas se toleraban hasta 100 electrones/Å².

⁴5 de estos tomogramas se adquirieron en las mismas condiciones pero sin emplear la placa de fase, aplicando un enfoque negativo de 7 μm .

⁵5 de las series de proyecciones se adquirieron siguiendo el esquema de ángulos 1/coseno, que incrementa la dosis electrónica en los ángulos más grandes, obteniéndose así un mayor número de proyecciones a mayores ángulos.

10.4.7. Reconstrucción tridimensional a partir de las series de proyecciones

10.4.7.1. Alineamiento de las proyecciones

El proceso de alineamiento se ha realizado utilizando el programa IMOD (Kremer et al., 1996), que lleva implementados paquetes adicionales como *etomo*, dedicado al alineamiento de las proyecciones y obtención de la reconstrucción final; o *3dmod*, para la visualización gráfica de las proyecciones y reconstrucciones.

El primer paso en el proceso de reconstrucción es el alineamiento de las proyecciones. En el apartado *Coarse Alignment* de IMOD, se realizaba un primer alineamiento rápido y poco preciso, obteniéndose un nuevo archivo. Se pasaba entonces al apartado *Fiducial model generation* en modo *Make seed and track* y en el visualizador *3dmod* se marcaban las posiciones de las nanopartículas de oro presentes en la proyección central. Podían seleccionarse partículas en otras proyecciones para facilitar el trazado de las trayectorias de cada partícula. Se guardaba el modelo y se ejecutaba *Track beads*, obteniéndose un nuevo archivo con las trayectorias de los marcadores. Se comprobaba que todas las trayectorias fuesen correctas y se guardaba el modelo. La serie alineada se generaba en el apartado de *Fine Alignment*. En este apartado se trataba de refinar el modelo, revisando y afinando las posiciones de los marcadores. Al acabar, se guardaba el modelo y, finalmente, en el apartado *Final aligned stack*, se generaba la serie alineada definitiva. Se seleccionaba la opción de interpolación lineal y se empleaba un *binning* de $\times 4^6$.

10.4.7.2. Algoritmos de reconstrucción

Para reconstruir la mayoría de tomogramas que se muestran en el presente trabajo (ver Resultados, capítulo 15) se ha empleado el algoritmo *weighed back projection* implementado en *etomo* (IMOD), aplicando un *pixel binning* de $\times 4$. Una vez se obtenía la reconstrucción, se invertía el contraste empleando el programa *bimg* de Bsoft (Heymann, 2001). En algunos casos, la reconstrucción se ha realizado sin aplicar *pixel binning*. Una vez generada la serie de proyecciones alineada, se normalizaba. La normalización de la serie de imágenes consiste en igualar las intensidades de cada proyección, que debido a fluctuaciones del haz pueden variar. Para ello, se ha empleado primero el programa *xmipp transform normalize* con el método OldXmipp (XMIPP; Sorzano et al., 2004) y el parámetro *invert* para invertir el contraste del conjunto de imágenes. A continuación, se ha usado un script proporcionado por la Unidad de Biocomputación del CNB-CSIC para normalizar la serie de proyecciones alineadas. Este script está basado en el procedimiento de normalización del programa Priism. Una vez normalizada la serie, se reconstruía empleando el algoritmo iterativo de reconstrucción SIRT (20 iteraciones) del programa *tomo3D* (Agulleiro y Fernández, 2012). El contraste en estas reconstrucciones era muy bajo debido al reducido tamaño de píxel, de manera que para aumentar el contraste se ha aplicado el paquete de realce de bordes TOMOBFLOW (Fernández, 2009).

⁶El concepto de *pixel binning* consiste en combinar píxeles de manera que generen un sólo píxel de mayor tamaño. El *binning* reduce el tamaño de la serie alineada considerablemente, a expensas de reducir la resolución. Además, suaviza el ruido de fondo y resalta los márgenes de las estructuras.

10.4.7.3. Análisis de las reconstrucciones

En las reconstrucciones tridimensionales obtenidas, el plano XY corresponde al plano paralelo a la rejilla de microscopía, y el eje Z es perpendicular al plano XY y equivale al grosor del volumen reconstruido. El paquete *3dmod* (IMOD) permite analizar los tomogramas reconstruidos. El visualizador “XYZ” de *3dmod* muestra simultáneamente los planos XY, XZ e YZ en un punto concreto del volumen. Este mismo paquete también permite extraer capturas de secciones de los tomogramas que muestran estructuras de interés. Desde aquí también se han extraído subtomogramas de regiones concretas para proceder a su segmentación, empleando la herramienta *Extract File* desde en el menú *File*. El recorte de las micrografías, así como también el diseño de la barra de escala se hacía mediante el programa CorelDRAW X3.

La determinación de distancias a partir de imágenes se ha realizado mediante el programa Fiji (ImageJ) (Abràmoff et al., 2004), que permite obtener la representación gráfica de la intensidad de una zona en función de la distancia, teniendo en cuenta el tamaño de píxel. Las determinaciones de diversos distanciados que se presentan en esta tesis doctoral, se han realizado sobre secciones XY de las reconstrucciones. Para realizar la determinación del grosor de un contacto entre placas, se han inspeccionado las secciones en las que es visible, en busca de la sección en la que el contacto entre las dos placas es íntimo. La altura de solenoides interdigitados se ha determinado a partir del número de secciones en los que la estructura es visible. Para obtener la altura, en nm, se debe multiplicar el número de secciones en las que es visible la estructura por el tamaño de píxel (4 veces el tamaño del píxel original, si se aplicaba un *pixel binning* de 4×).

La segmentación de estructuras de interés encontradas en las reconstrucciones se ha realizado mediante el *plugin Segmentation Editor* implementado en el programa Fiji (ImageJ). Las segmentaciones se han filtrado empleando el filtro morfológico tridimensional *closing* del paquete *Fast Morphology* con un valor de 1 píxel. Con este filtro se conseguía suavizar ligeramente las estructuras. La visualización tridimensional de las reconstrucciones y sus segmentaciones se ha realizado mediante el *plugin 3D Viewer*. Desde aquí se han extraído las imágenes y películas de estructuras tridimensionales que se muestran en el capítulo III.

Parte III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 11

Estructura de la cromatina en el núcleo interfásico

Generalmente, se asume que la cromatina se compacta formando estructuras fibrilares. La fibra de 30 nm ha sido considerada durante mucho tiempo el segundo nivel de plegamiento de la cromatina. Pero lo cierto es que se tiene muy poco conocimiento acerca de la dinámica la cromatina y de como los nucleosomas son capaces de adoptar diversos niveles de plegamiento hasta formar el cromosoma metafásico, al final del ciclo celular. De hecho, la existencia de la fibra de 30 nm está siendo cuestionada (ver apartado 4.3). Teniendo en cuenta la importancia de las condiciones iónicas en la compactación de la cromatina a lo largo del ciclo celular (ver apartado 4.2), los experimentos se han realizado bajo condiciones similares a las que se pueden encontrar en el núcleo interfásico. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en esta parte de la tesis.

11.1. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la compactación de la cromatina

Se ha evaluado el efecto que la concentración de Mg^{2+} ejerce sobre la estructura de la cromatina en el interior del núcleo interfásico. Los núcleos purificados (ver sección 8.5) se incubaron en presencia de tampón PM (ver Tabla 9.2) con concentraciones de Mg^{2+} entre 1 y 5 mM. Se han tenido en cuenta los resultados de Strick et al. (2001) que indican que en el núcleo interfásico la concentración de Mg^{2+} es de 2-4 mM. Las Figuras 11.1 y 11.2 muestran los resultados obtenidos.

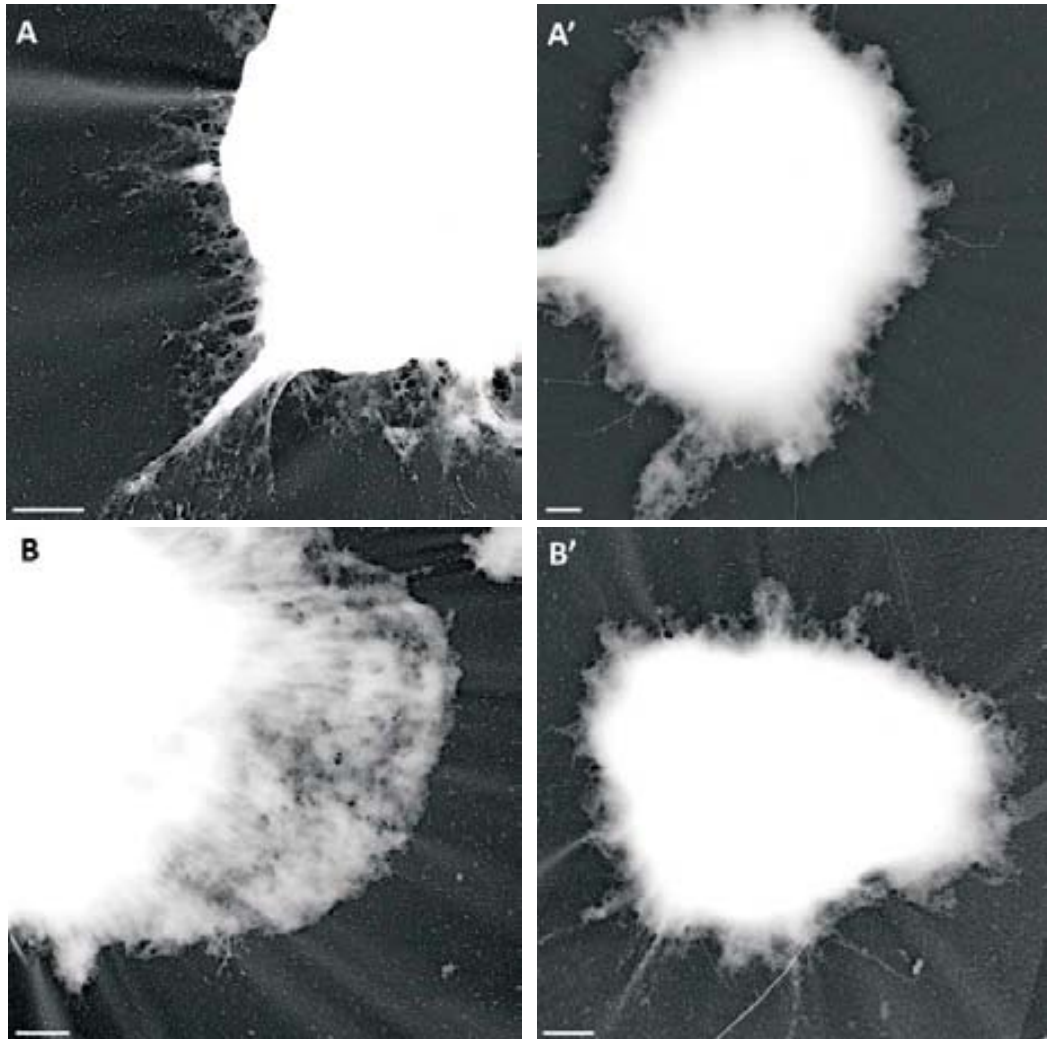
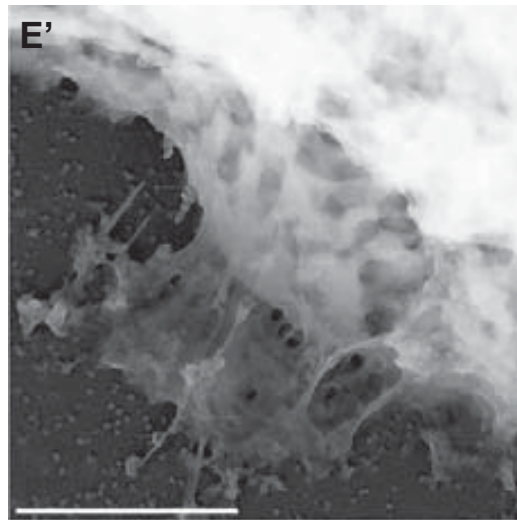
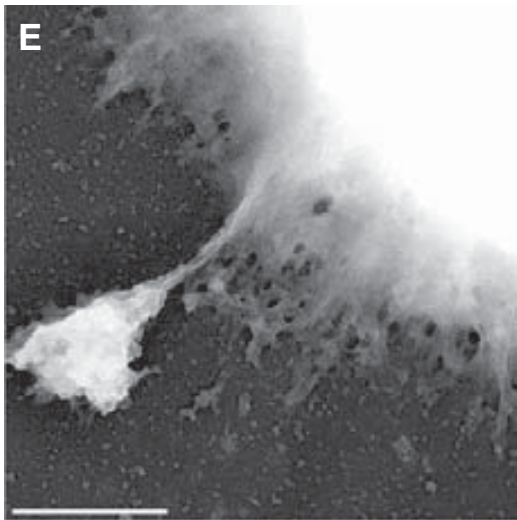
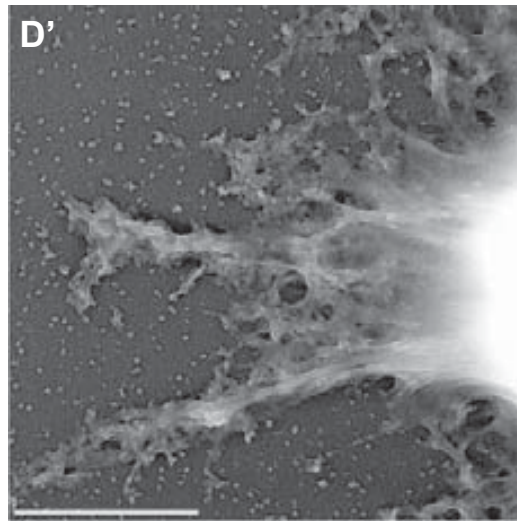
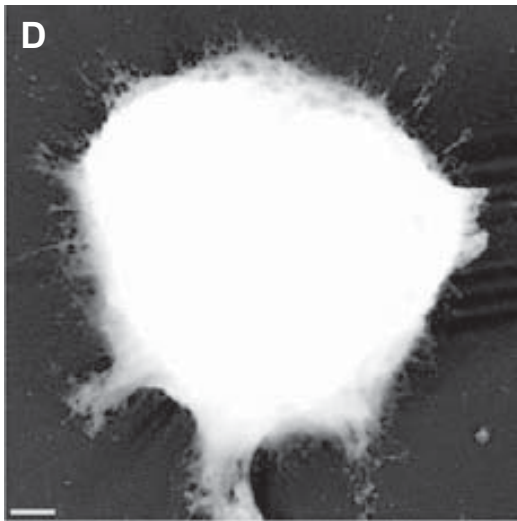
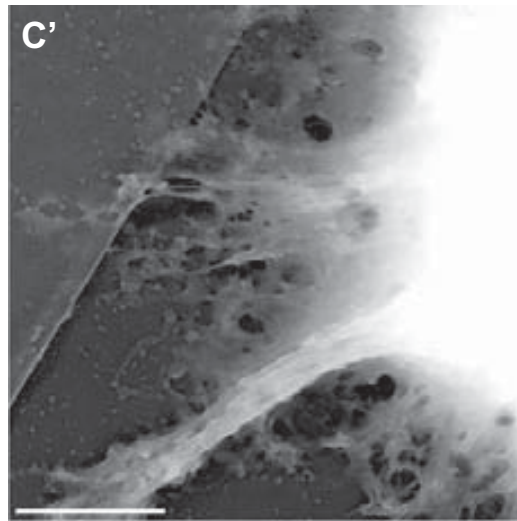
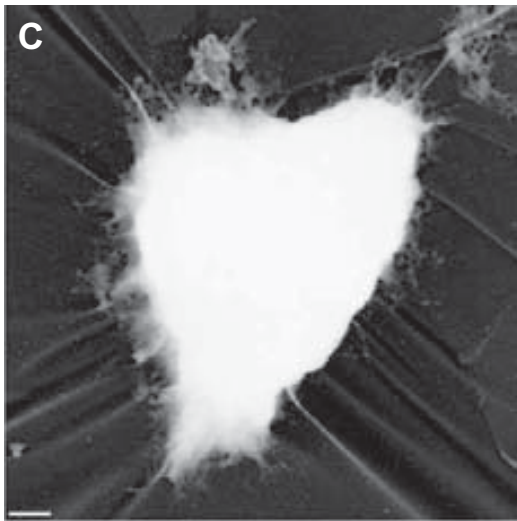


Figura 11.1: Núcleos interfásicos incubados en presencia de Mg^{2+} 1 y 2 mM. Los núcleos interfásicos se purificaron según el protocolo descrito en la sección 8.5, se resuspendieron en tampón C, se diluyeron 3 veces con tampón PM (Mg^{2+} 1 y 2 mM) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente (ver sección 9.2) en presencia de Mg^{2+} 1 mM (A-A') y 2 mM (B-B'). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2). Barras: 1 μ m.

Figura 11.2 (en la página siguiente): Núcleos interfásicos incubados en presencia de Mg^{2+} 3, 4 y 5 mM. Los núcleos interfásicos se purificaron según el protocolo descrito en la sección 8.5, se resuspendieron en tampón C, se diluyeron 3 veces con tampón PM (Mg^{2+} 3, 4 y 5 mM) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente (ver sección 9.2) en presencia de Mg^{2+} 3 mM (C-C'), 4 mM (D-D') y 5 mM (E-E'). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (apartado 7.3.5.2). Barras: 1 μ m.



Puede observarse que la cantidad de emanaciones de cromatina en torno a los núcleos interfásicos era escasa, hecho que dificultaba el análisis de la cromatina debido a la elevada densidad del material. Aún así, podían extraerse algunas conclusiones respecto al efecto que el Mg^{2+} tenía sobre la cromatina. Son apreciables sutiles diferencias en cuanto al grado de compactación de la cromatina, según la concentración de Mg^{2+} empleada. Mientras que los núcleos incubados en presencia de 1-2 mM de Mg^{2+} presentan emanaciones laxas sin una estructura definida, los núcleos incubados en presencia de 3-5 mM de Mg^{2+} muestran un material bastante más compacto. En experimentos posteriores se decidió aplicar métodos químicos que facilitaran la emanación de cromatina desde los núcleos y permitieran así su estudio.

11.2. Desestructuración de núcleos interfásicos mediante métodos químicos

Durante la realización de estos experimentos se han empleado dos tampones: el tampón de muy baja fuerza iónica, que además contiene EDTA (PE); y el tampón PM (ver Tabla 9.2), el mismo tampón en el que se resuspendían los núcleos tras la purificación, pero sin sacarosa. Con el tampón de baja fuerza iónica (PE), se pretendía secuestrar los cationes divalentes implicados en el mantenimiento de la estructura de la cromatina y provocar así la descompactación del material. Por otro lado, la dilución de los núcleos con tampón PM provocaba la entrada brusca de agua en el núcleo y se esperaba que facilitase la emanación de la cromatina desde el interior nuclear.

En la Figura 11.3 pueden verse los resultados obtenidos tras la incubación de núcleos en presencia de EDTA 10 mM durante 15 y 45 minutos. En la Figura 11.4 se muestran núcleos incubados con tampón PM (5 mM Mg^{2+}) sin sacarosa durante 15 y 45 minutos.

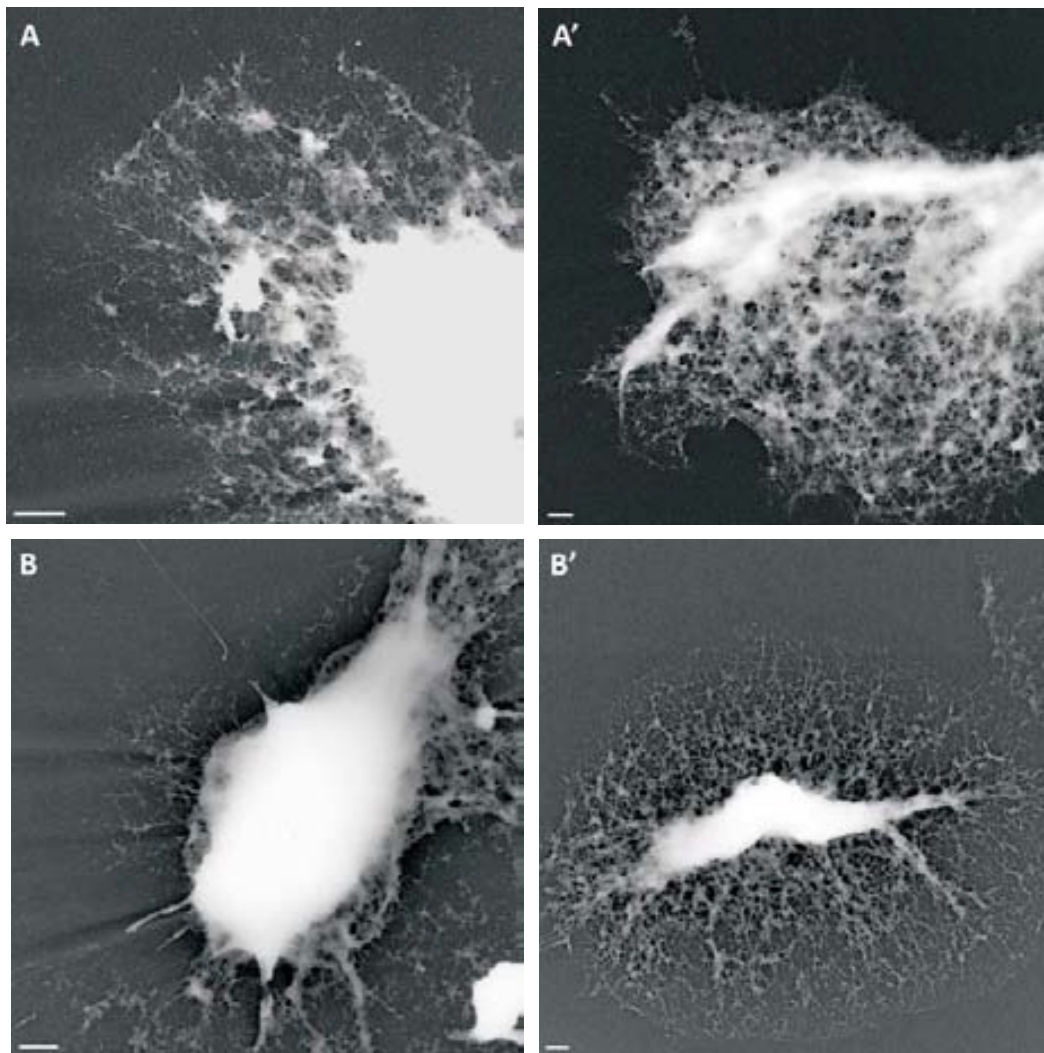


Figura 11.3: Núcleos interfásicos incubados en presencia de EDTA 10 mM. Los núcleos interfásicos purificados (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C, se diluyeron con tampón PE (EDTA 10 mM) y se incubaron en esas condiciones durante 15 (A-A') y 45 (B-B') minutos a temperatura ambiente (ver sección 9.2). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2). Barras: 1 μm .

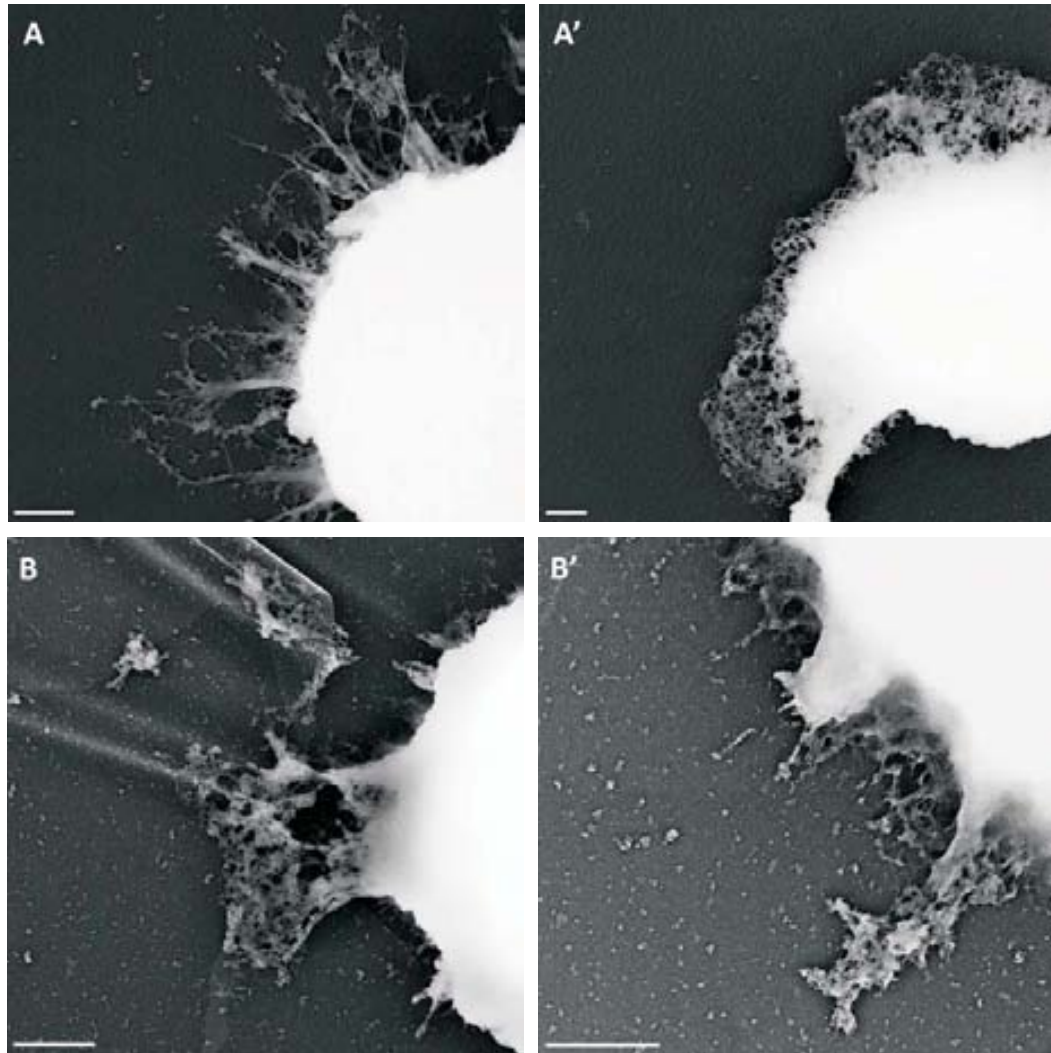


Figura 11.4: Núcleos interfásicos incubados en presencia de tampón PM. Los núcleos interfásicos purificados (ver sección 8.5) se resuspendieron en tampón C, se diluyeron con tampón PM (Mg^{2+} 5 mM) y se incubaron en esas condiciones durante 15 (**A-A'**) y 45 (**B-B'**) minutos a temperatura ambiente (ver sección 9.2). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2). Barras: 1 μm .

Como puede observarse en las micrografías mostradas en las Figuras 11.3, el tratamiento de los núcleos interfásicos con tampón quelante (EDTA) era efectivo provocando emanaciones, sin embargo, resultaba demasiado agresivo. El resultado era un material fibrilar completamente desestructurado, especialmente tras 45 minutos de incubación. La estructura de las fibras observadas recuerda a las primeras micrografías TEM de cromosomas metafásicos en presencia de medios de baja fuerza iónica y EDTA, que mostraban emanación de fibras (Paulson y Laemmli, 1977; Marsden y Laemmli, 1979; Earnshaw y Laemmli, 1983). Sin embargo, las condiciones de baja fuerza iónica distan enormemente de las que se encuentran en el núcleo interfásico, lo que sugería que dichas fibras eran el producto de la desestructuración total o parcial de la cromatina. Por el contrario, el tampón PM (Figura 11.4) conservaba mejor la estructura del material, pero resultaba muy poco efectivo para provocar emanaciones de cromatina.

11.3. Desestructuración de núcleos interfásicos mediante métodos mecánicos

Para aumentar el número de emanaciones de cromatina alrededor de los núcleos, se decidió aplicar métodos mecánicos sobre los núcleos interfásicos (ver apartado 9.2). Por medio de estos métodos se esperaba poder desestabilizar lo suficiente la membrana nuclear para permitir la observación del material. Las concentraciones de Mg^{2+} empleadas fueron 2.5 y 5 mM, que cubren los valores de concentración observados en el núcleo interfásico (Strick et al., 2001).

11.3.1. Desestructuración mediante paso por aguja hipodérmica a presión

La suspensión de núcleos interfásicos en tampón C (ver apartado 8.5.2) se pasaba 10 veces a través de una aguja hipodérmica acoplada a una jeringa, justo antes de la incubación en presencia de tampón PM (ver procedimiento en sección 9.2). En algunos experimentos se añadía tritón X-100 en el tampón de incubación, que es un detergente que facilita la desestabilización de la membrana nuclear. La Figura 11.5 muestra los resultados obtenidos tras pasar la suspensión de núcleos a través del orificio de la aguja.

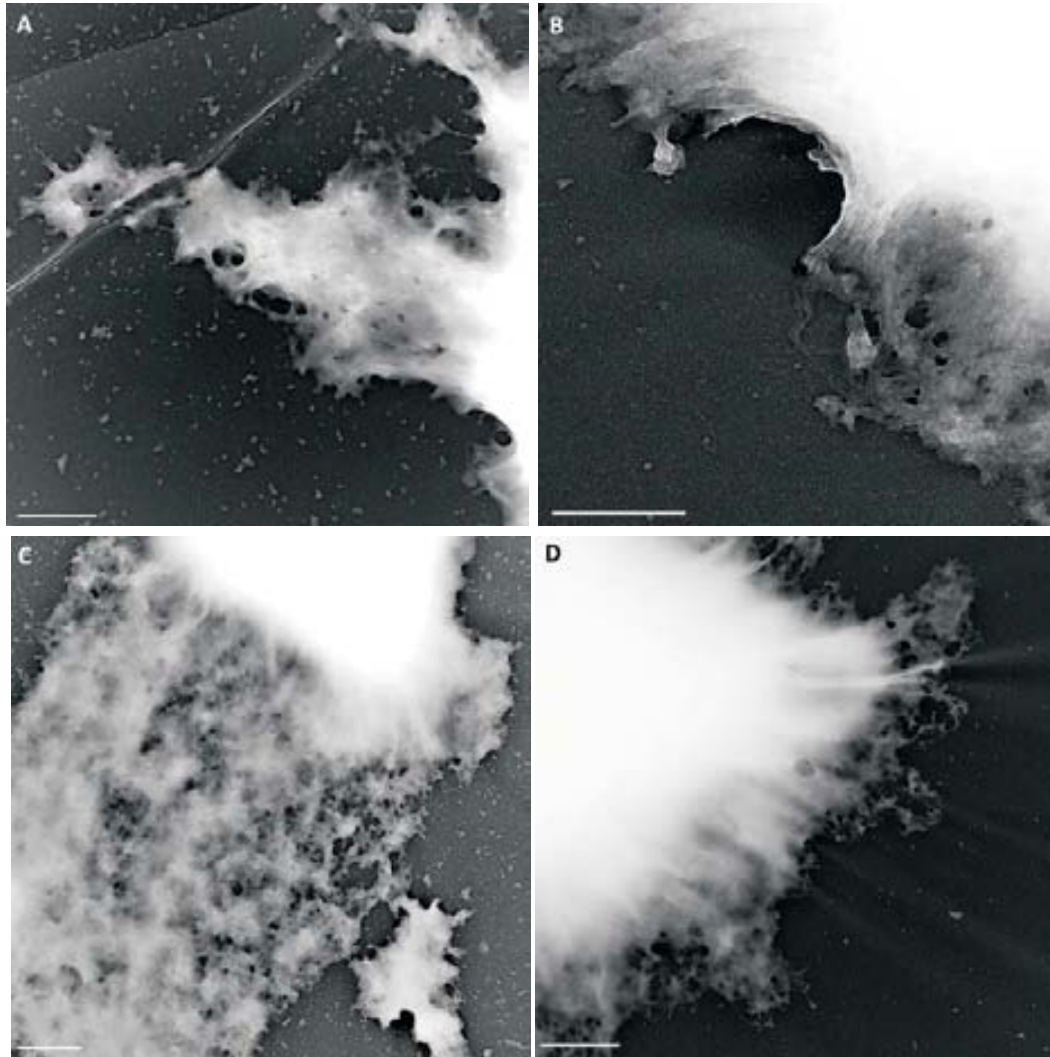


Figura 11.5: Núcleos interfásicos desestructurados por paso a través de aguja a presión. Los núcleos interfásicos purificados (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se diluyeron con tampón PM con Mg^{2+} 2.5 mM (**A, C**) y 5 mM (**B, D**). La suspensión de núcleos se pasó 10 veces a través del orificio de una aguja y se incubó durante 90 minutos a 37 °C en presencia de tampón PM con Mg^{2+} 2.5 mM (**A, C**) y 5 mM (**B, D**). En **C** y **D** el tampón de incubación se complementó con tritón X-100 (ver sección 9.2). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (apartado 7.3.5.2). Barras: **A-B** 500 nm, **C-D** 1 μ m.

El tratamiento con aguja hipodérmica y la posterior incubación de la suspensión (Figura 11.5) resultó no ser demasiado efectivo provocando emanaciones de cromatina en torno a los núcleos interfásicos. Aunque, en general, los alrededores de los núcleos mostraban más material, encontrar zonas accesibles donde se pudiera apreciar con claridad la estructura de la cromatina resultaba complicado. Una mayor concentración de Mg^{2+} en el tampón de incubación provocaba un ligero aumento en la compactación del material visible. Por otro lado, la incorporación de tritón X-100 en el tampón de incubación aumentaba ligeramente la cantidad de emanaciones, pero la textura de la cromatina se apreciaba más laxa.

11.3.2. Desestructuración mediante ultrasonidos

Otro de los métodos desestructurantes empleados con el fin de provocar emanaciones de cromatina en torno a los núcleos ha sido el tratamiento con ultrasonidos (ver procedimiento en sección 9.2). En algunos experimentos se añadió tritón X-100 durante la sonicación. La Figura 11.6 muestra los resultados obtenidos empleando el tratamiento con ultrasonidos.

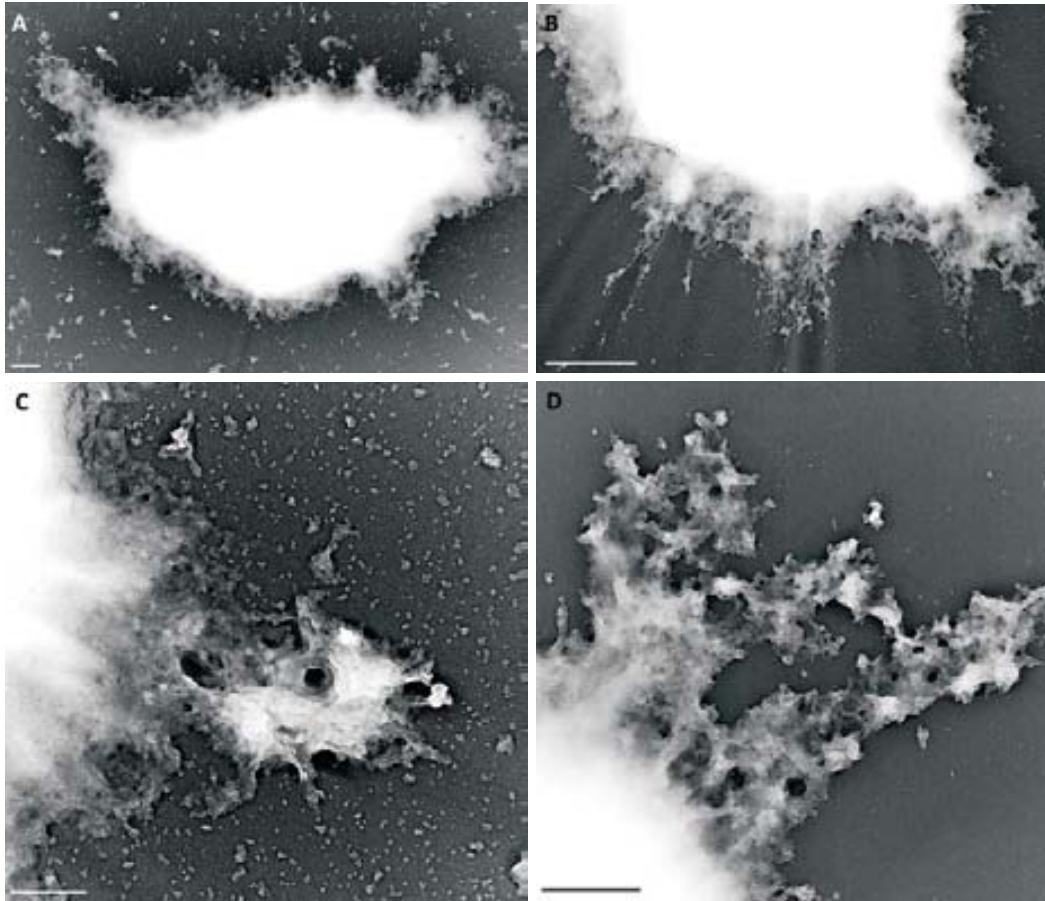


Figura 11.6: Núcleos interfásicos desestructurados mediante ultrasonidos. Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C, se diluyeron con tampón PM con Mg^{2+} 2.5 mM (A, C) y 5 mM (B, D). La suspensión de núcleos se sometió a tratamiento con ultrasonidos y se incubó durante 90 minutos a 37 °C en presencia de tampón PM con Mg^{2+} 2.5 mM (A, C) y 5 mM (B, D). En C y D el tampón de incubación se complementó con tritón X-100 (ver sección 9.2). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2). Barras: A,B y D 1 μ m, C 500 nm.

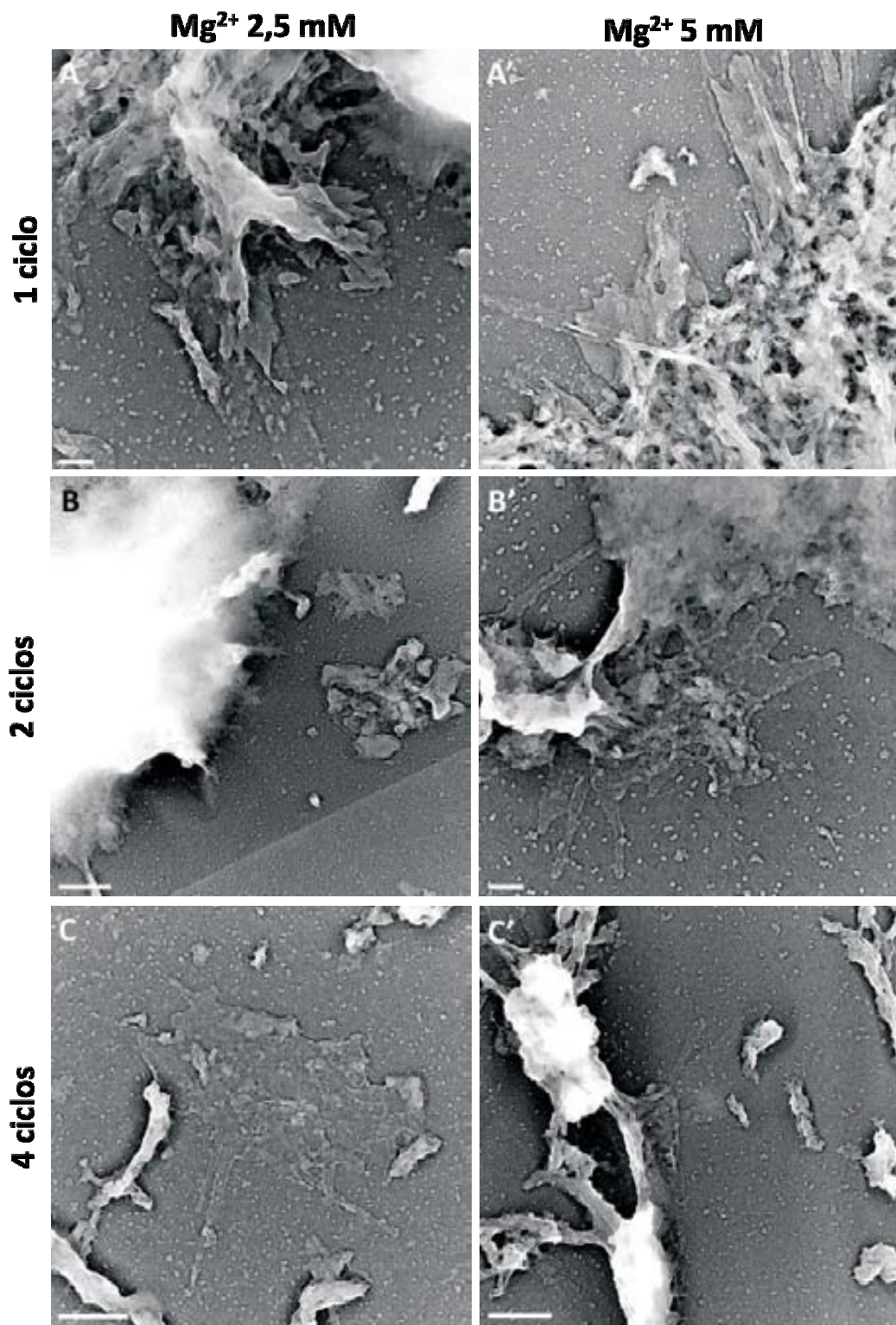
El tratamiento de los núcleos mediante ultrasonidos provocaba un mayor número de emanaciones de cromatina y, de nuevo, se observaba un ligero aumento de la compactación de material en presencia de Mg^{2+} 5 mM. La incorporación de tritón X-100 facilitaba ligeramente la emanación de la cromatina desde el interior nuclear. A pesar de que algunas zonas presentaban emanaciones de tamaño considerable (Figura 11.6 D), seguía siendo algo esporádico. Para facilitar el estudio de la estructura de

la cromatina se hacía necesario conseguir emanaciones importantes en torno a la gran mayoría de núcleos. La relativa escasez de emanaciones no permitía extraer conclusiones acerca de la estructura de la cromatina interfásica y obligaba a buscar tratamientos desestructurantes alternativos.

11.3.3. Desestructuración por agitación con bolas de vidrio

Se ha evaluado también el efecto de la agitación de la suspensión nuclear con bolas de vidrio como método de desestructuración de núcleos (ver procedimiento en sección 9.2). Las bolas de vidrio se utilizan para disgregar células bacterianas y eucariotas (Benov y Al-Ibraheem, 2002; Dunn y Wobbe, 2001). Posteriormente al tratamiento desestructurante, los núcleos eran incubados en presencia de Mg^{2+} 2.5 o 5 mM. El siguiente conjunto de micrografías (Figuras 11.7 - 11.12) muestran los resultados obtenidos tras realizar diversos ciclos de agitación de los núcleos en presencia de bolas de vidrio.

Figura 11.7 (en la página siguiente): Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio. Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se diluyeron con tampón PM con Mg^{2+} 2.5 mM (**A**, **B** y **C**) y 5 mM (**A'**, **B'** y **C'**). La suspensión de núcleos se sometió a 1 (**A-A'**), 2 (**B-B'**) y 4 (**C-C'**) ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio. Finalmente, se incubaron en tubo de 1.5 ml durante 90 minutos a 37 °C (ver protocolo en sección 9.2). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2). Barras: **A**, **B'**, 200nm; **A'**, **B**, **C**, **C'**, 500 nm.



El empleo de bolas de vidrio como método de desestructuración permitió obtener las primeras emanaciones importantes de cromatina. Se observaron emanaciones de tipo laminar en torno a núcleos interfásicos, así como también un ligero aumento en la compactación del material en presencia de Mg^{2+} 5 mM. Sin embargo, la desestructuración no era visible en toda la rejilla y dificultaba encontrar zonas que permitieran su estudio. Se decidió entonces variar el método de incubación. Se sustituyó la incubación en tubo por una diálisis desestructurante nocturna en saco (ver apartado 7.1.1) en presencia de tampón PE (ver Tabla 9.2). A continuación, se realizaba otra diálisis en saco frente a tampón PMKN (con concentraciones de Mg^{2+} de 2.5 y 5 mM). Finalmente, el material se depositaba sobre rejillas para TEM (ver apartado 7.3.5.2). La Figura 11.8 muestra los resultados obtenidos.

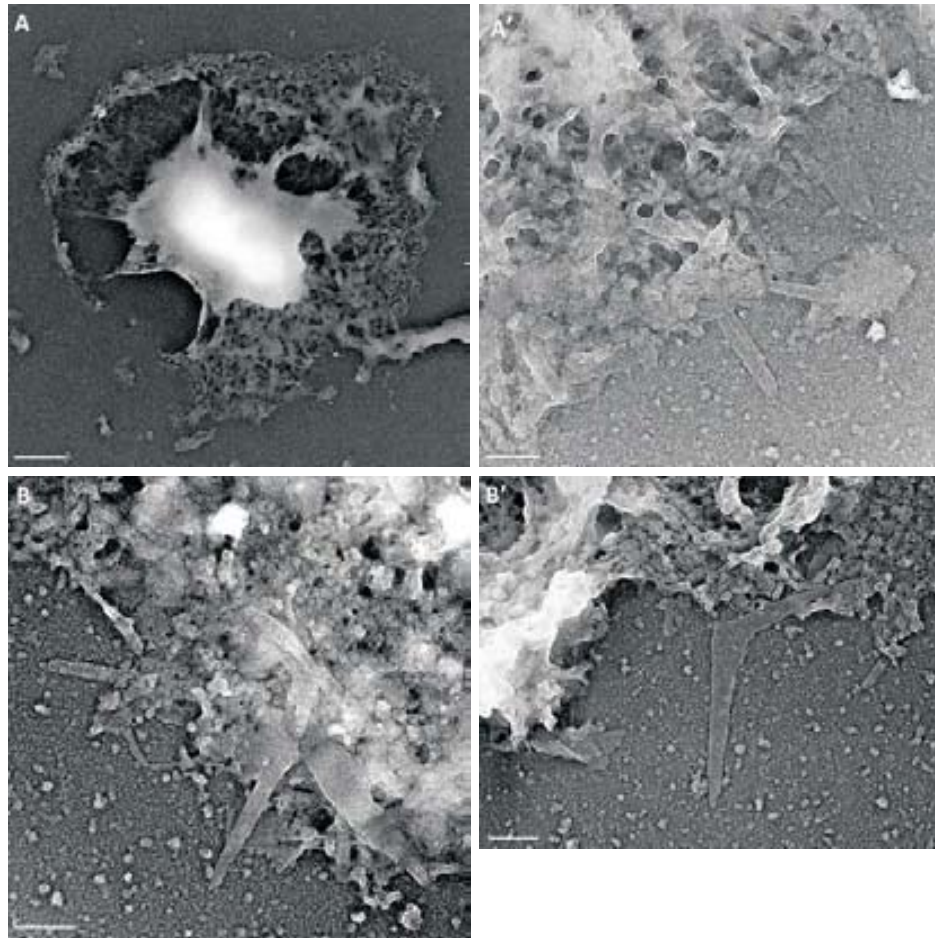


Figura 11.8: Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio y dializados con tampón PMKN con Mg^{2+} 2.5 y 5 mM. Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se desestructuraron por aplicación de 4 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, la suspensión nuclear se sometió a una diálisis desestructurante en tampón PE (EDTA 10 mM) durante toda la noche a 4 °C y finalmente, a una diálisis estructurante durante 5h con PMKN en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM (A-A') y 5 mM (B-B') a 4 °C (ver apartado 7.1.1). La extensión sobre rejilla para TEM se realizó por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2). Barras: A, 1 μ m; A', B y B', 200 nm.

De nuevo, se observaba cierto aumento en la compactación del material en presencia de Mg^{2+} 5 mM, pero este método de incubación no resultaba todavía suficientemente efectivo provocando emanaciones de cromatina. Se recurrió entonces a la incubación en cámara de polipropileno. El hecho de incubar la muestra previamente depositada sobre la rejilla, podría facilitar la deposición de cromatina sobre el soporte de carbono. También se aumentó el número de ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 11.9-11.12.

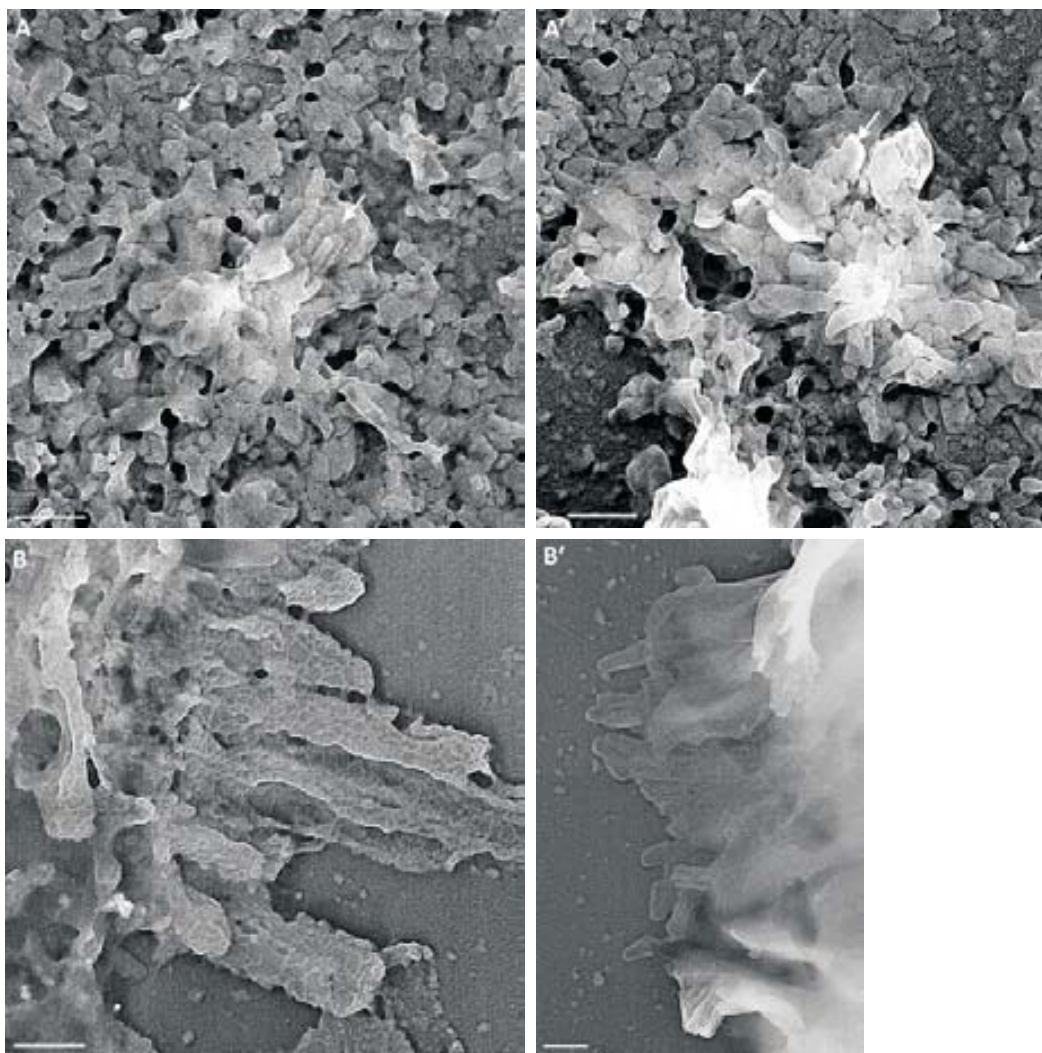


Figura 11.9: Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN (Mg^{2+} 2.5 mM). Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se desestructuraron por aplicación de 4 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 30 minutos (A-A') o 60 minutos (B-B') con PMKN (Mg^{2+} 2.5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones de tipo laminar en torno a núcleos interfásicos. Las flechas señalan bordes de placas. Barras: 200 nm.

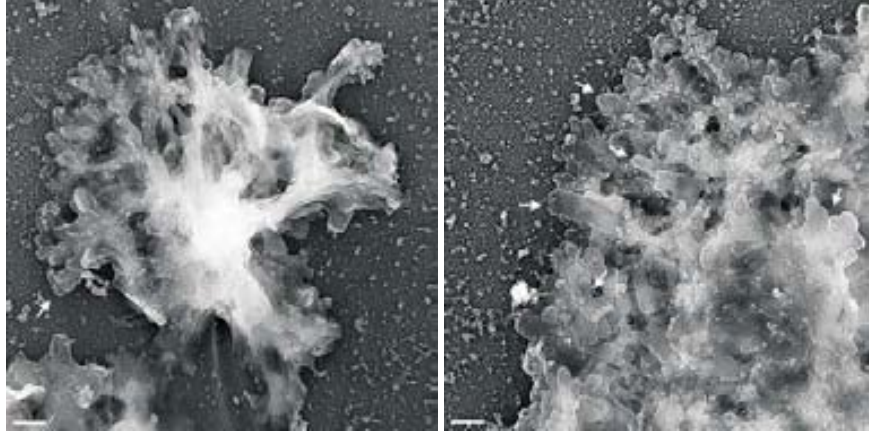


Figura 11.10: Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN (Mg^{2+} 2.5 mM). Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se desestructuraron por aplicación de 10 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (ver apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 60 minutos con PMKN (Mg^{2+} 2.5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones de tipo laminar en torno a núcleos. Las flechas señalan bordes de placas. Barras: 200 nm.

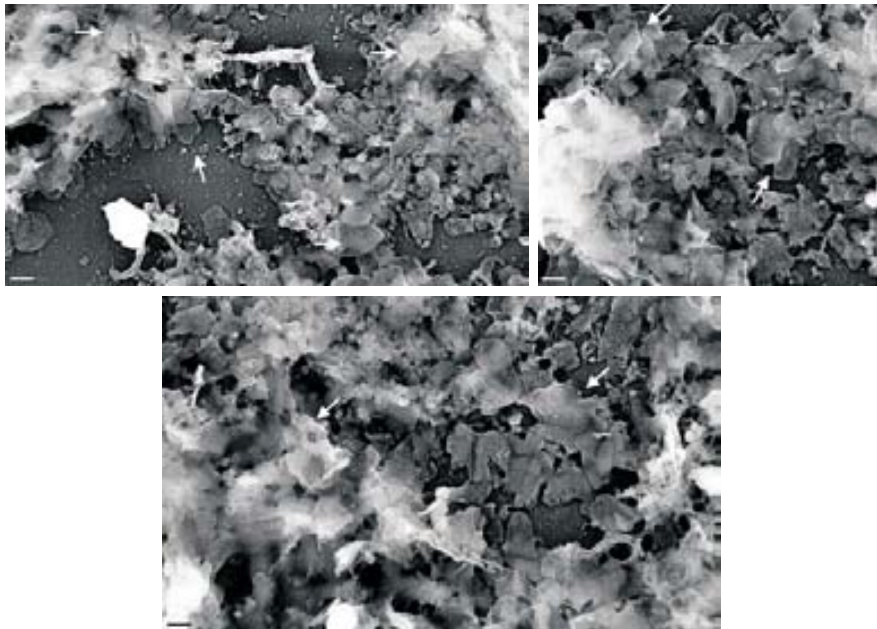


Figura 11.11: Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM). Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se desestructuraron por aplicación de 10 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 30 minutos con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones en torno a núcleos interfásicos donde son visibles numerosas placas (señaladas mediante flechas). Barras: 200 nm.

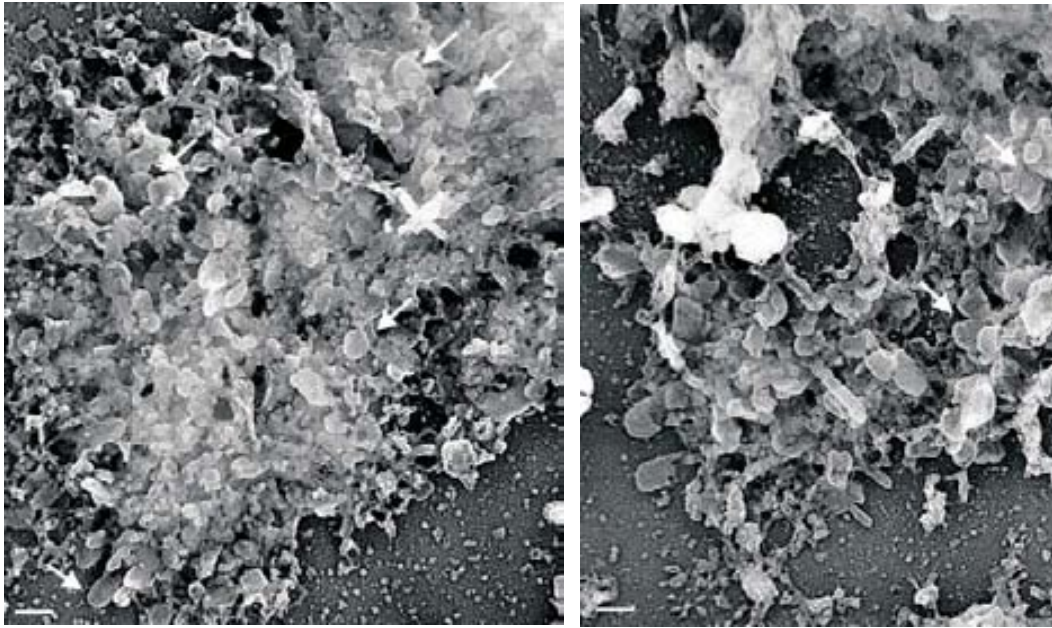


Figura 11.12: Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM). Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón C y se desestructuraron por aplicación de 10 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 120 minutos con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones importantes en torno a núcleos interfásicos donde son visibles numerosas placas. Las flechas señalan algunos bordes de placas.) Barras: 200 nm.

En resumen, la agitación en presencia de bolas de vidrio resultó ser un método de desestructuración efectivo, y la diálisis de la muestra en cámara de polipropileno generaba emanaciones importantes en torno a los núcleos interfásicos. El aumento del número de ciclos de agitación a 10 permitió obtener emanaciones importantes de forma homogénea sobre las rejillas.

La cromatina interfásica emanada de los núcleos, presenta una morfología básicamente laminar cuya compactación aumenta proporcionalmente a la concentración de Mg^{2+} . Las placas interfásicas tienen un tamaño considerablemente menor que las placas procedentes de cromosomas metafásicos, ampliamente estudiadas en nuestro grupo de investigación (Caravaca et al., 2005; Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010). Además, así como las placas emanadas desde cromosomas metafásicos suelen formar agregados multilaminares, las placas interfásicas no parecen tener tendencia a apilarse.

Capítulo 12

Estructura de la cromatina interfásica en función de la fase del ciclo celular

Una vez puesto a punto un protocolo de desestructuración de núcleos, se decidió aplicarlo a núcleos en diversas fases del ciclo celular separados mediante citometría de flujo.

12.1. Estructura de la cromatina en la fase G₁

En las páginas siguientes se muestran micrografías TEM de núcleos en fase G₁ tras ser sometidos a dos tratamientos desestructurantes: la agitación con bolas de vidrio y el paso a través de aguja hipodérmica. Se han ensayado diversas condiciones de incubación, variando también la temperatura y el tiempo de incubación, para evaluar el efecto que éstas variables tenían sobre el rendimiento de la emanación de cromatina de los núcleos interfásicos.

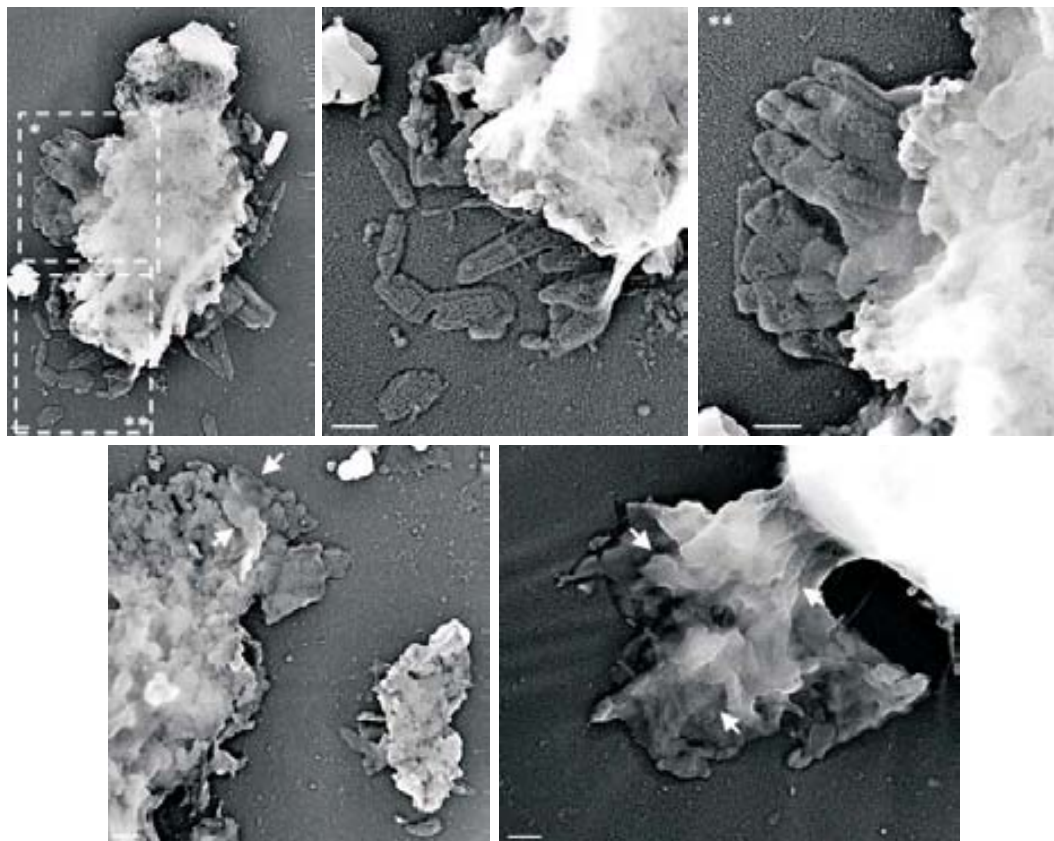


Figura 12.1: Núcleos interfásicos en fase G_1 desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (ver sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM), se separaron del resto de núcleos y se desestructuraron por aplicación de 6 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 60 minutos con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a $37^\circ C$ (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones de tipo laminar en torno a núcleos interfásicos en fase G_1 ; las flechas señalan bordes de algunas placas. Barras: 200 nm.

Tal como se ha observado en el capítulo anterior y según los resultados que se muestran en la Figura 12.1, el tratamiento con bolas de vidrio y la posterior incubación en presencia de Mg^{2+} 5 mM resultaba útil para la producción de emanaciones de cromatina en torno a núcleos. Sin embargo, la enorme pérdida de material durante la separación nuclear, junto con la posible adhesión de los núcleos a las bolas de vidrio, provocó que la cantidad de núcleos sobre las rejillas de TEM fuera muy escasa. Se decidió entonces recurrir de nuevo al tratamiento mediante aguja hipodérmica como método de desestructuración de núcleos. Las Figuras 12.2 y 12.3 muestran los resultados obtenidos.

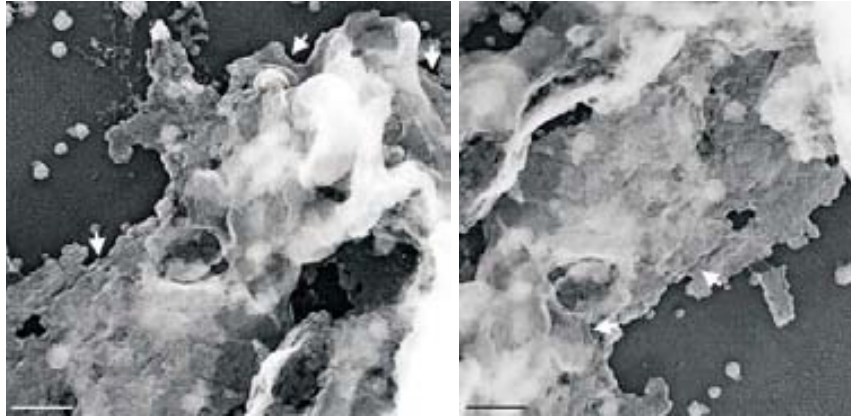


Figura 12.2: Núcleos interfásicos en fase G₁ desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en tubo en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg²⁺ 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron tras pasar la suspensión nuclear 10 veces a través de una aguja (ver protocolo en la sección 9.2). Se incubaron en tubo de 1.5 ml durante toda la noche a 37 °C en presencia de PMKN (Mg²⁺ 5 mM). Finalmente, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2). Las flechas señalan bordes de placas. Barras: 200 nm.

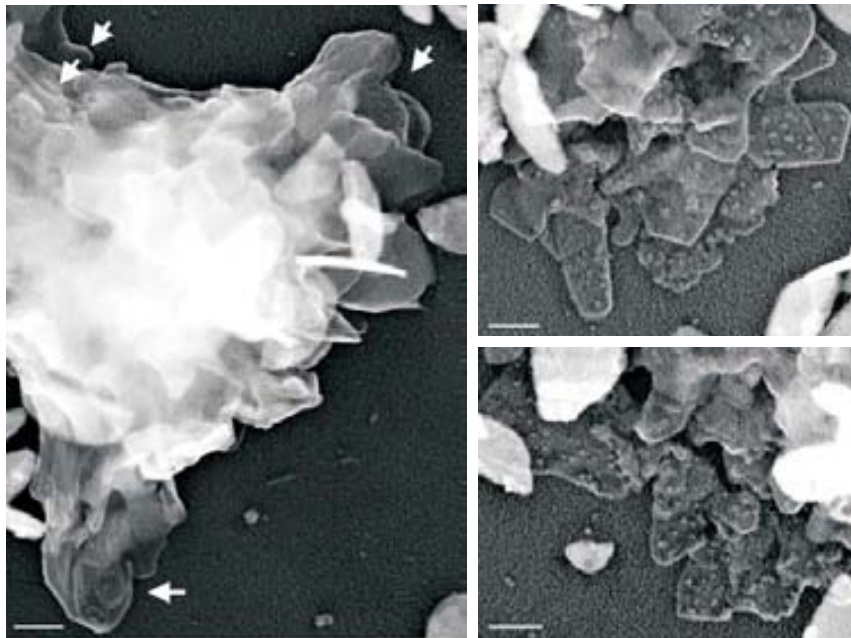


Figura 12.3: Núcleos interfásicos en fase G₁ desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en tubo en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg²⁺ 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron tras pasar la suspensión nuclear 20 veces a través de una aguja (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante toda la noche a 37 °C en presencia de PMKN (Mg²⁺ 5 mM) (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones laminares desde núcleos en fase G₁; las flechas señalan bordes de algunas placas. Barras: 200 nm.

La sustitución del método de desestructuración inicial por el tratamiento con aguja hipodérmica permitió aumentar la cantidad de material en las rejillas de microscopía. Cualquiera que fuera el método de desestructuración empleado, los núcleos en fase G₁ mostraban emanaciones laminares junto a agregados amorfos. No se apreciaban diferencias significativas en cuanto a dializar la muestra en rejilla o incubarla en solución. La temperatura de incubación tampoco afecta a la morfología del material. Las placas observadas suelen presentar un tamaño reducido y escasa tendencia al apilamiento, en comparación con las placas metafásicas (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010; Milla y Daban, 2012).

12.2. Estructura de la cromatina en la fase S

A continuación, se muestran micrografías de TEM de núcleos en fase S tras ser sometidos a dos tratamientos desestructurantes: la agitación con bolas de vidrio y el paso a través de aguja hipodérmica. De nuevo, se han ensayado diversas condiciones de incubación, variando la temperatura y el tiempo de incubación para evaluar el efecto que éstas variables provocaban en el rendimiento de emanación de cromatina.

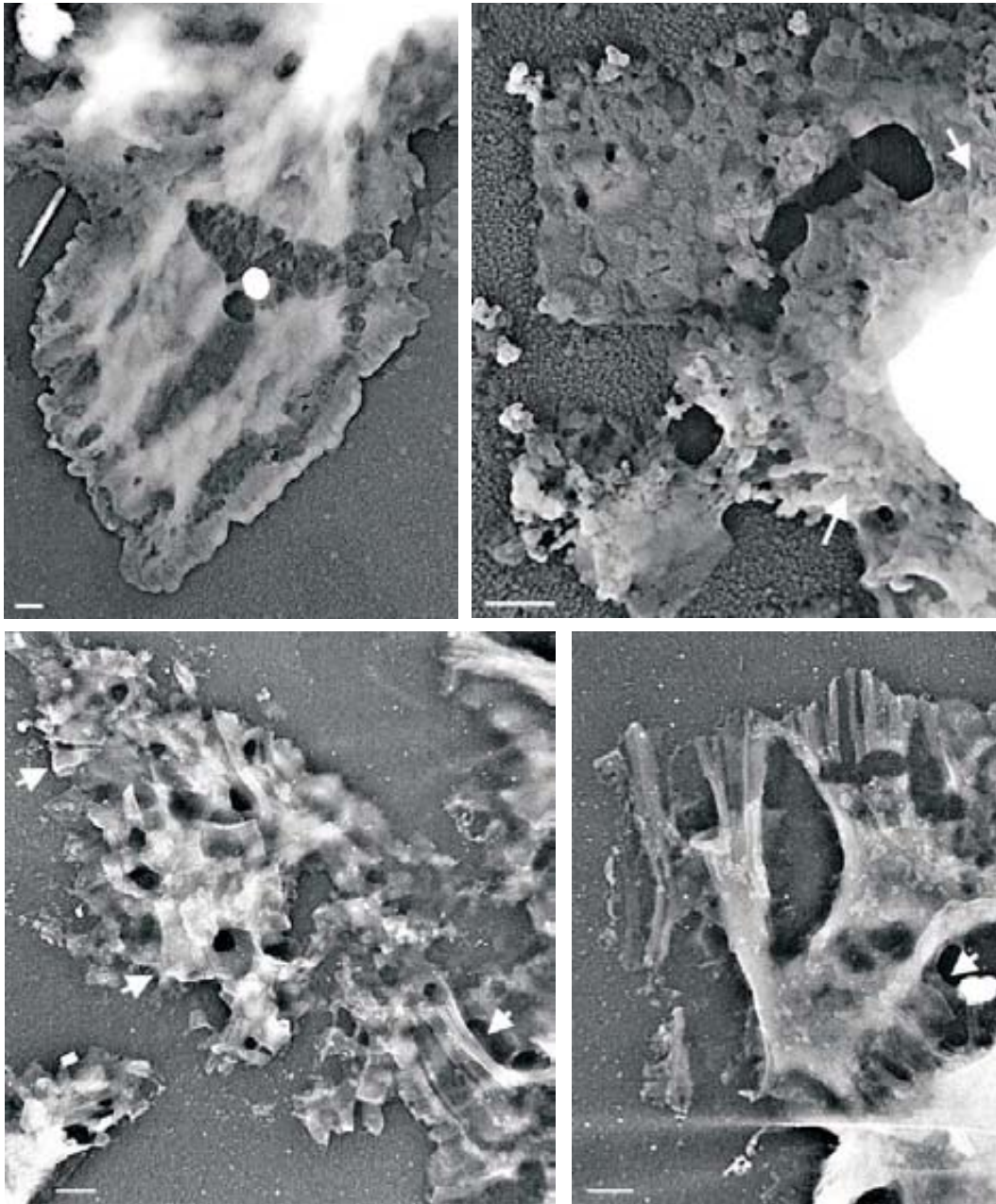


Figura 12.4: Núcleos interfásicos en fase S desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron por aplicación de 7 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 60 minutos con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Se muestran emanaciones en torno a núcleos en fase S; las felchas señalan algunos bordes evidentes de placas. Barras: 200 nm.

Como en el caso de los núcleos en fase G_1 , la agitación en presencia de bolas de vidrio provocaba pérdida de material por la adsorción a la superficie de las bolas.

El hecho de que en una población de núcleos, las fases S y G₂ sean las menos pobladas, junto a la pérdida de material que suponía la separación nuclear, tenía como resultado que la cantidad de material sobre las rejillas era mínima. Se aplicó entonces el tratamiento mediante aguja hipodérmica. La Figura 12.5 muestra los resultados obtenidos.

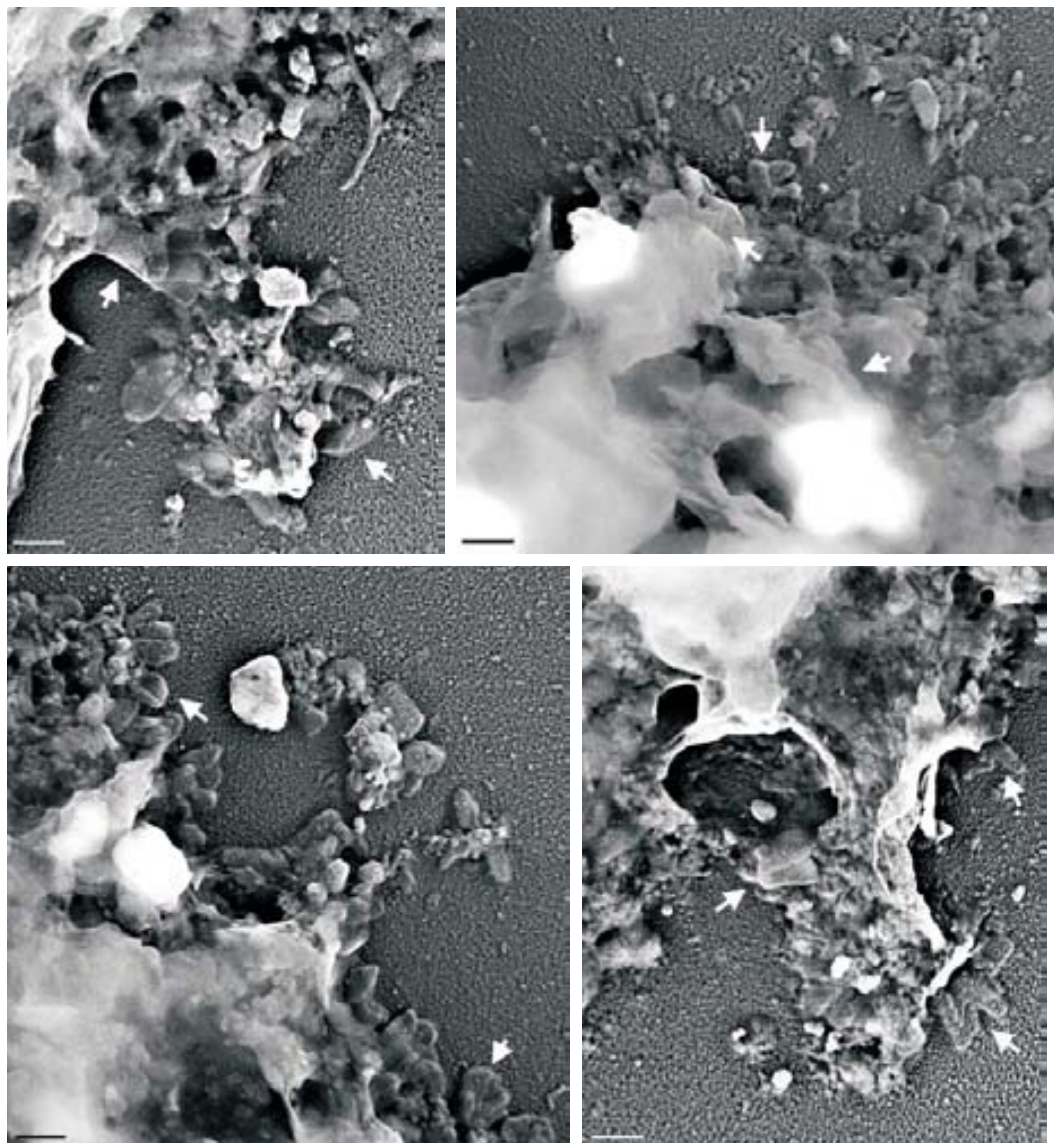


Figura 12.5: Núcleos interfásicos en fase S desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en tubo en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron tras pasar la suspensión nuclear 10 veces a través de una aguja (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se incubaron en tubo de 1.5 ml durante toda la noche a 37 °C en presencia de PMKN (Mg^{2+} 5 mM) y se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2). Las felchas señalan bordes evidentes de algunas placas de tamaño reducido. Barras: 200 nm.

Tras el tratamiento de los núcleos con aguja hipodérmica se conseguía que las rejillas presentaran más material. En la fase S, la cromatina observada presentaba una morfología entre granular y laminar, muy similar a la observada en la fase G₁. No se aprecian diferencias significativas en función del método de incubación ni de la temperatura empleada. Las placas observadas en esta fase también presentan un tamaño reducido y escasa tendencia al apilamiento.

12.3. Estructura de la cromatina en la fase G₂

También se ha estudiado la estructura de la cromatina procedente de núcleos en fase G₂ tras someterlos a agitación en presencia de bolas de vidrio (Figura 12.6) o bien desestructurados mediante aguja hipodérmica (Figuras 12.7 y 12.8).

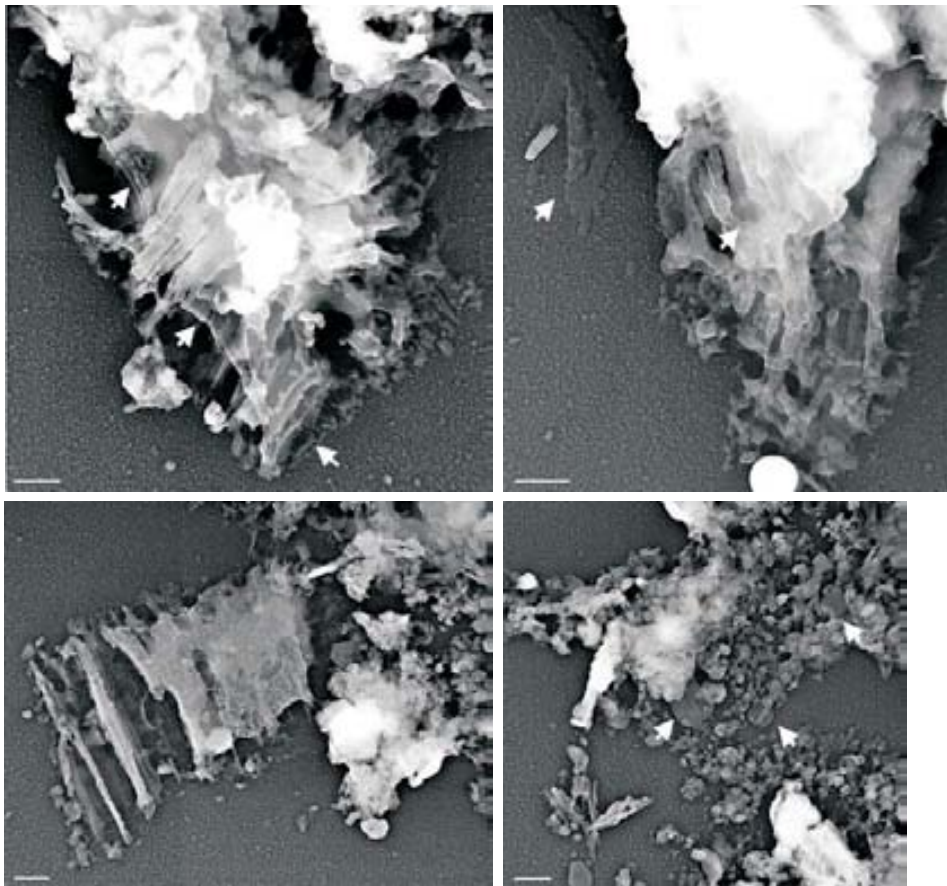


Figura 12.6: Núcleos interfásicos en fase S desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron por aplicación de 7 ciclos de agitación en presencia de bolas de vidrio (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 60 minutos con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Las felchas señalan bordes evidentes de algunas placas. Barras: 200 nm.

El tratamiento con bolas de vidrio, a pesar de que permitía obtener emanaciones importantes en torno a los núcleos interfásicos, provocaba una pérdida considerable de material, que quedaba adsorbido a las bolas. También en este caso, se recurrió al tratamiento mediante aguja hipodérmica.

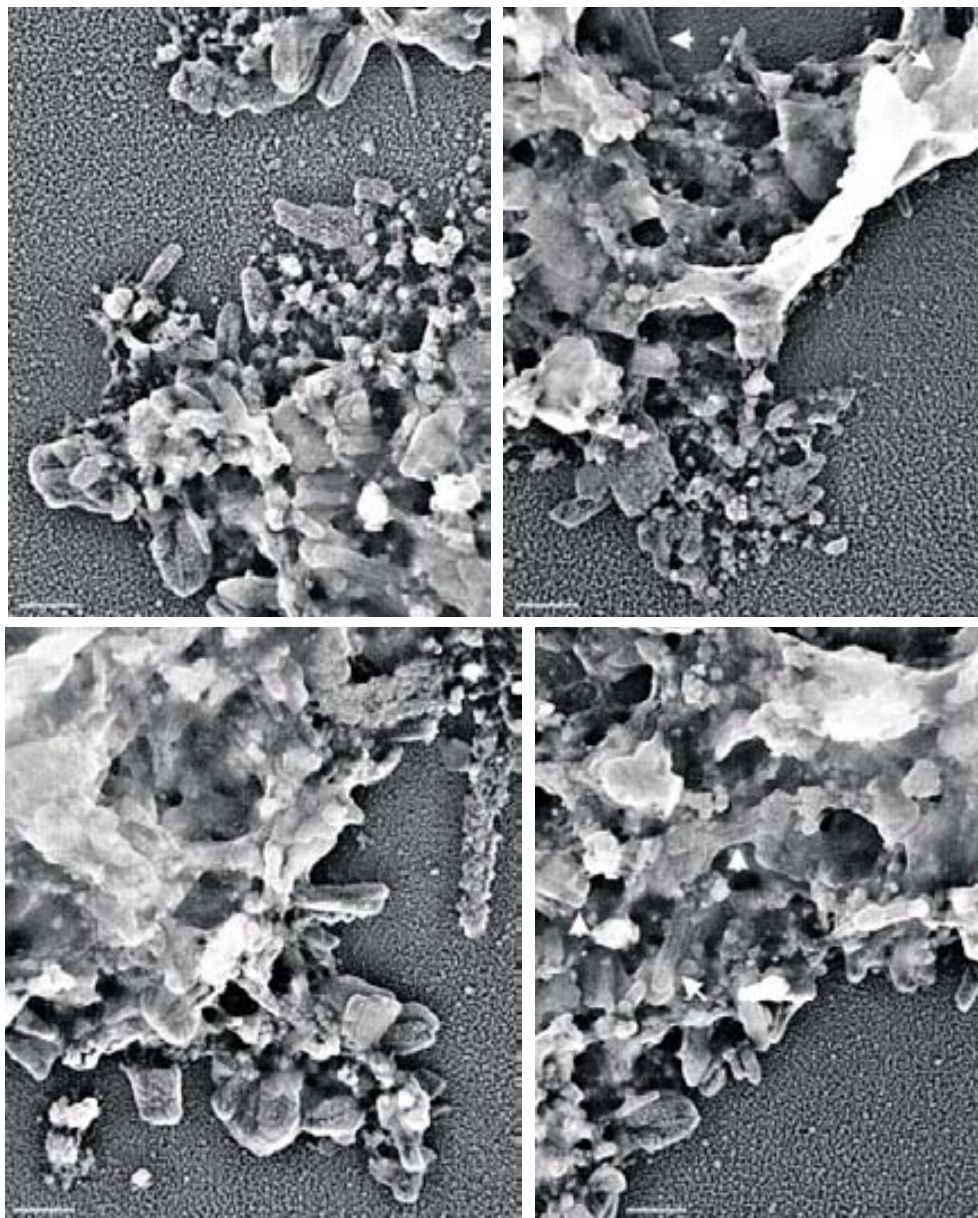


Figura 12.7: Núcleos interfásicos en fase G_2 desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en cámara en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron tras pasar la suspensión nuclear 10 veces a través de una aguja (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara durante 60 minutos con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a 37 °C (ver apartado 7.1.2). Las flechas señalan bordes de algunas placas. Barras: 200 nm.

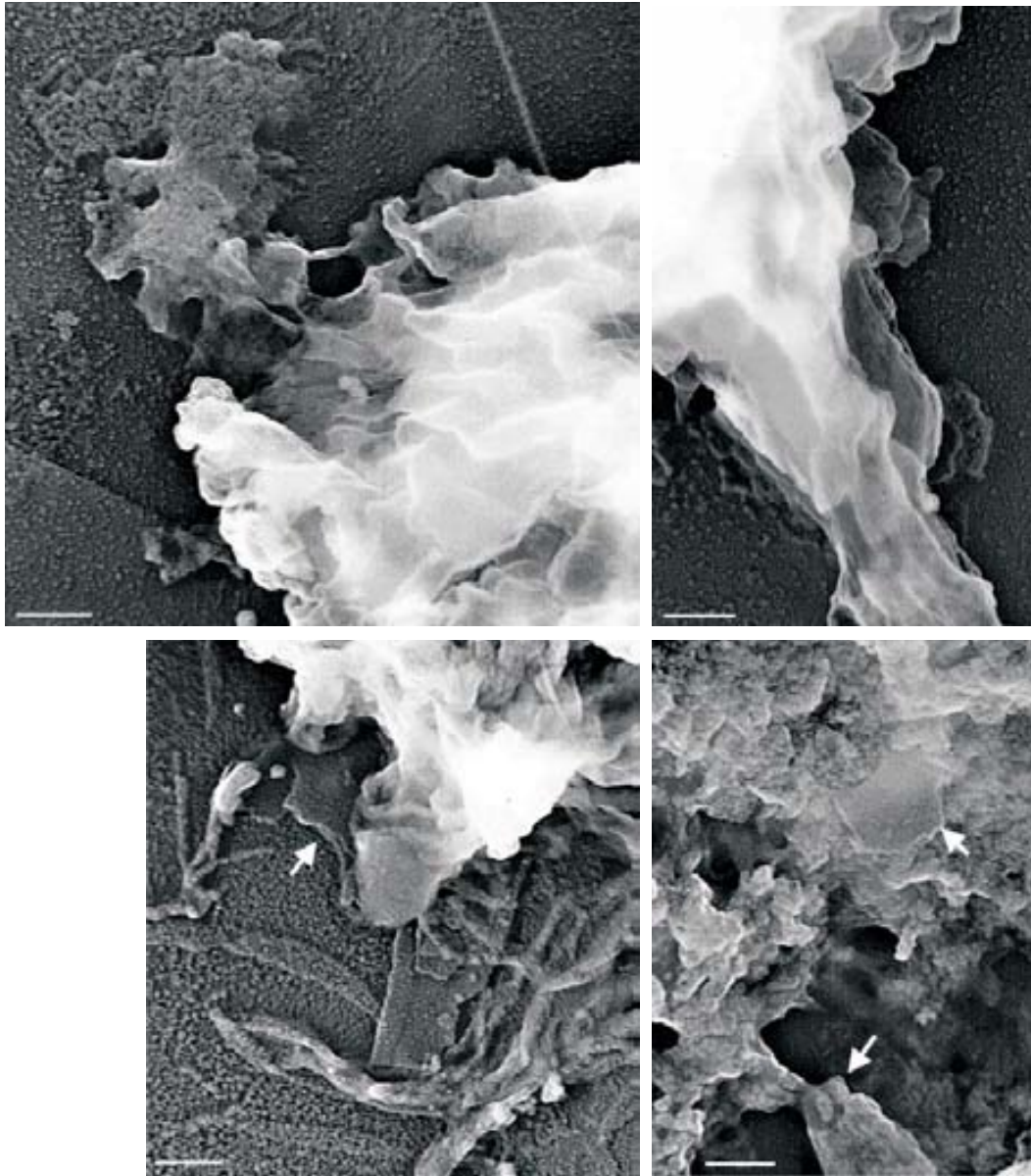


Figura 12.8: Núcleos interfásicos en fase G₂ desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en cámara en presencia de tampón PMKN. Los núcleos interfásicos se purificaron (sección 8.5), se resuspendieron en tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM), se separaron del resto de núcleos (ver apartado 9.3) y se desestructuraron tras pasar la suspensión nuclear 20 veces a través de una aguja (ver protocolo en la sección 9.2). A continuación, se extendieron sobre rejilla para TEM por centrifugación (apartado 7.3.5.2) y se incubaron en cámara con PMKN (Mg^{2+} 5 mM) a 37 °C durante toda la noche (ver apartado 7.1.2). Las flechas señalan bordes evidentes de algunas placas. Barras: 200 nm.

La desestructuración de los núcleos empleando aguja hipodérmica mejoraba el rendimiento en la emanación de la cromatina desde los núcleos. Tras pasar la muestra 10 o 20 veces a través de la aguja hipodérmica se observaban gran cantidad de placas de tamaño reducido sobre el soporte de las rejillas. La morfología observada para la

cromatina en fase G₂ era entre granular y laminar, combinada con la presencia de agregados amorfos. Cabe señalar que la cromatina procedente de núcleos en fase G₂ presenta una mayor compactación que en el resto de fases analizadas. En general, las placas de cromatina procedentes de núcleos en fase G₂ tampoco presentan tendencia al apilamiento. No se observaban grandes diferencias en función del tipo o tiempo de incubación, ni tampoco en función de la temperatura empleada.

Capítulo 13

Estudio de la autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica

Se ha realizado un estudio sobre la capacidad autoasociativa de la cromatina interfásica, como ya se hizo en nuestro laboratorio con la cromatina metafásica (Milla, 2011). Inicialmente, se determinaron las condiciones óptimas de autoasociación de la cromatina interfásica, para luego aplicarlas sobre núcleos separados en función de la fase del ciclo celular. El objetivo del estudio era poder evaluar si existen cambios en las propiedades de la cromatina a lo largo del ciclo celular. En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos en estos estudios.

13.1. Análisis de los fragmentos de cromatina obtenidos

El resultado de la digestión de la cromatina interfásica con nucleasa micrococcal fue analizado (ver procedimiento en la sección 9.4). La dilución lenta de la muestra digerida con tampón de baja fuerza iónica (tampón PE) provocaba la descondensación del material y permitía la visualización de los típicos “collares de perlas” sobre la superficie de las rejillas para TEM. En la Figura 13.1 pueden verse algunos ejemplos.

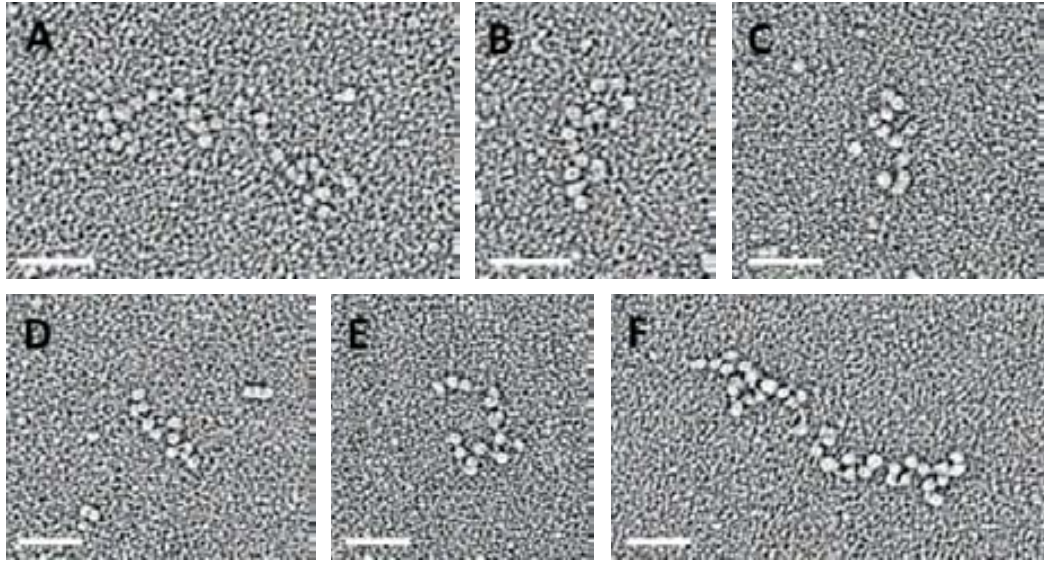


Figura 13.1: Micrograffías de TEM de cromatina interfásica digerida con nucleasa micrococcal. Los núcleos interfásicos purificados (ver sección 8.5), fueron digeridos con nucleasa micrococcal (1:100) durante 10 (A-B) y 30 minutos (C-F) a 37 °C y diluidos con Pipes 1 mM y EDTA 1 mM (ver sección 9.4) (ver protocolo en la sección 9.4). La fijación con glutaraldehído se realizó en solución (ver apartado 7.3.6.1) y, posteriormente, el material se extendió sobre rejillas para TEM (apartado 7.3.5.2). Barras: 100 nm.

En la Figura 13.2 se muestran dos ejemplos del análisis de la digestión en experimentos típicos de autoasociación de cromatina interfásica. El análisis se realizaba en gels desnaturalizantes de agarosa al 0.7% (p/v) que contenían SDS al 0.1% (v/v) (ver apartado 9.4.3). De acuerdo con el hecho de que la longitud de DNA correspondiente a un nucleosoma es de aproximadamente 200 pb, el producto de la digestión eran fragmentos con un peso molecular múltiplo de unos 200 pb. En el gel de la Figura 13.2-A puede observarse una gran dispersión de tamaños, que van desde fragmentos de dos nucleosomas (~ 400 pb) hasta largos fragmentos de 20 nucleosomas (~ 4000 pb). La banda superior en el gel indica la presencia de material sin digerir. La concentración de nucleasa micrococcal empleada en este caso era de 10^{-2} U/ml. En el caso de la Figura 13.2-B el material se ha digerido completamente, ya que no se observa banda en la parte superior del gel. El carril derecho (digestión con nucleasa micrococcal 10^{-1} U/ml) muestra fragmentos de 1-6 nucleosomas, siendo la longitud correspondiente a un solo nucleosoma la más común, lo que indica una excesiva digestión. El carril central (digestión con nucleasa micrococcal 10^{-2} U/ml) muestra la presencia de fragmentos de 2-10 nucleosomas, siendo más abundantes los fragmentos de 4-6 nucleosomas. Generalmente, se empleaba una concentración de nucleasa micrococcal de 10^{-2} U/ml, y la digestión se llevaba a cabo durante 15 minutos a 37 °C.

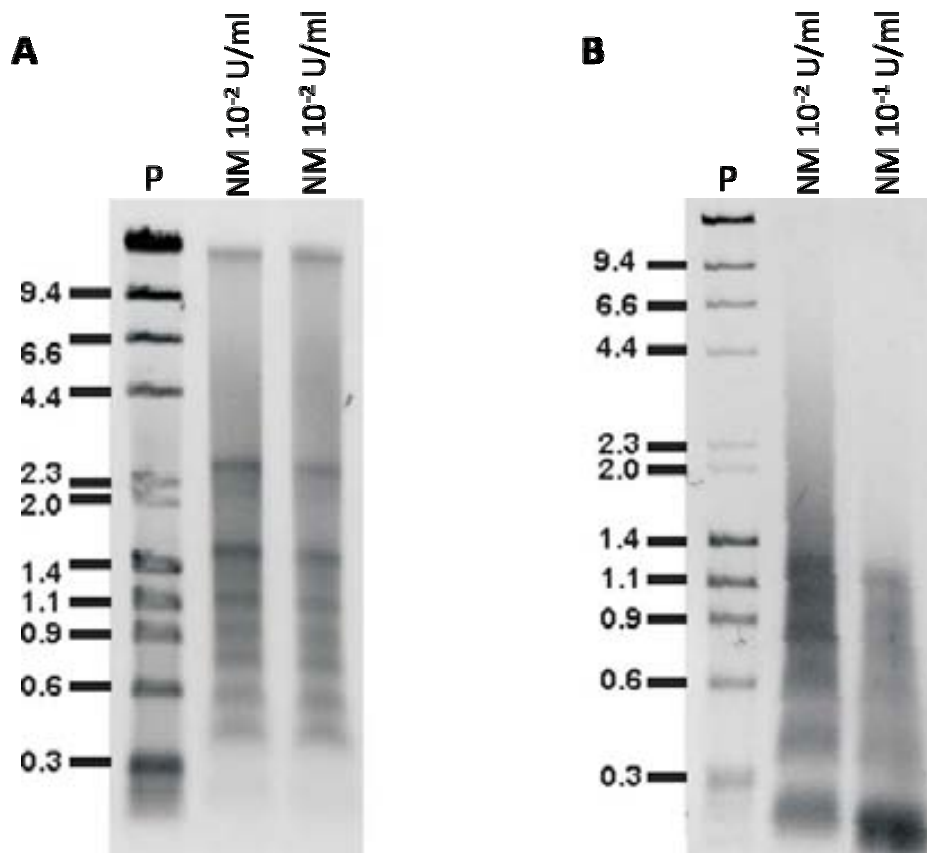


Figura 13.2: Análisis mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa. El gel contiene 0.7 % (p/v) de agarosa y 0.1 % (v/v) de SDS preparado en TBE (ver apartado 9.4.3). **A** Resultado de la digestión de núcleos interfásicos con nucleasa micrococcal (10^{-2} U/ml) durante 15 minutos a 37 °C. **B** Resultado de la digestión de núcleos interfásicos con nucleasa micrococcal (1:100 carril central; 1:1000 carril derecho) durante 1 hora a 37 °C. P corresponde al patrón de peso molecular *DRIgest III* (GE-Healthcare).

13.2. Formación de placas de cromatina interfásica

La cromatina proveniente de la digestión de los núcleos interfásicos con nucleasa micrococcal fue dializada en presencia de tampón PMKN con concentraciones de Mg^{2+} de 2.5-5 mM, la concentración que corresponde al núcleo interfásico, hasta 17 mM, la concentración típica en el cromosoma metafásico (Strick et al., 2001, ver protocolo en la sección 9.5). Ensayando estas concentraciones de magnesio se pretendía evaluar el efecto compactante de éste ion divalente sobre el material. Las Figuras 13.3-13.12 muestran los resultados obtenidos.

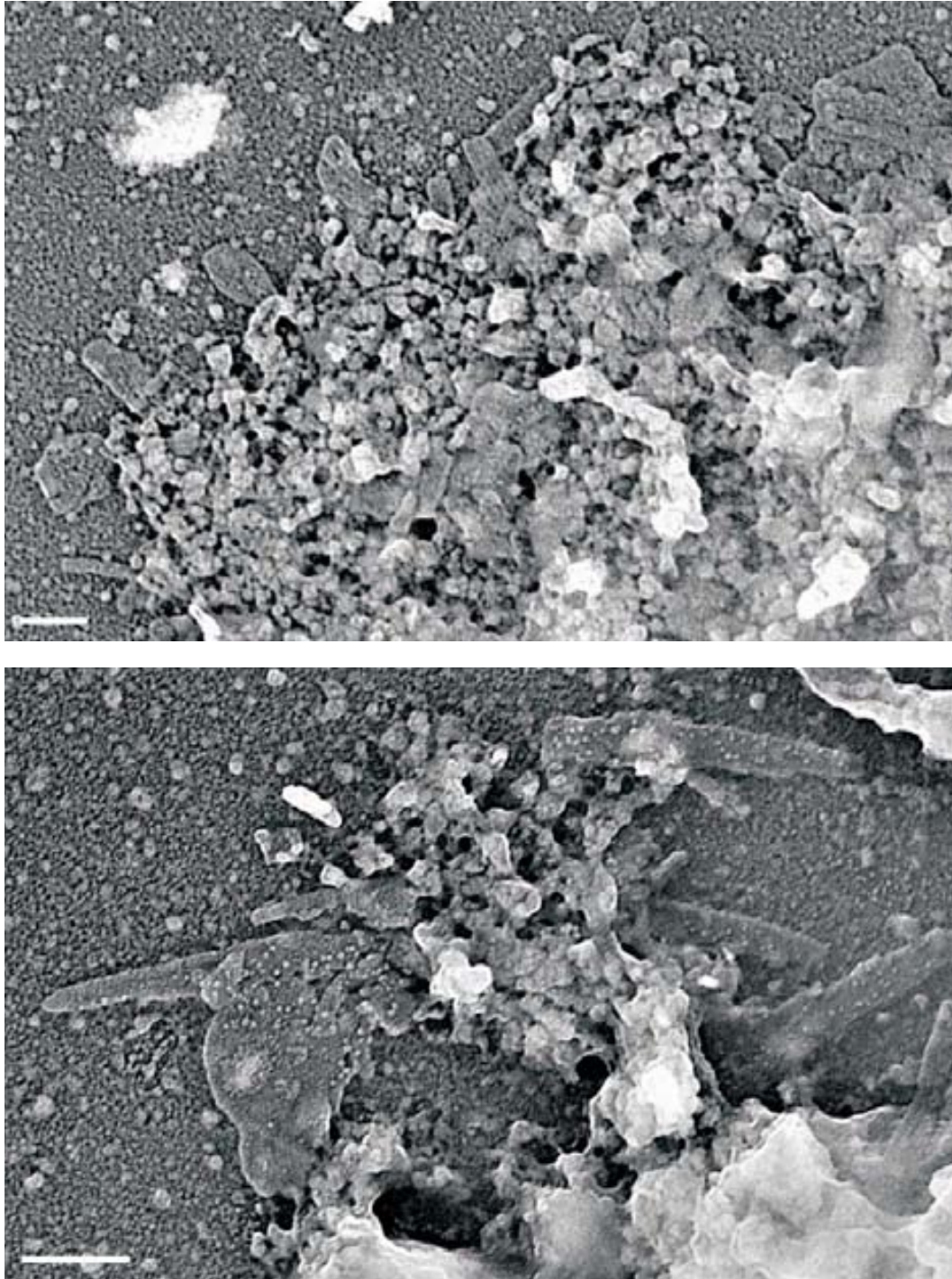


Figura 13.3: Agregados de cromatina interfásica formados por autoasociación de fragmentos dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 2.5 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

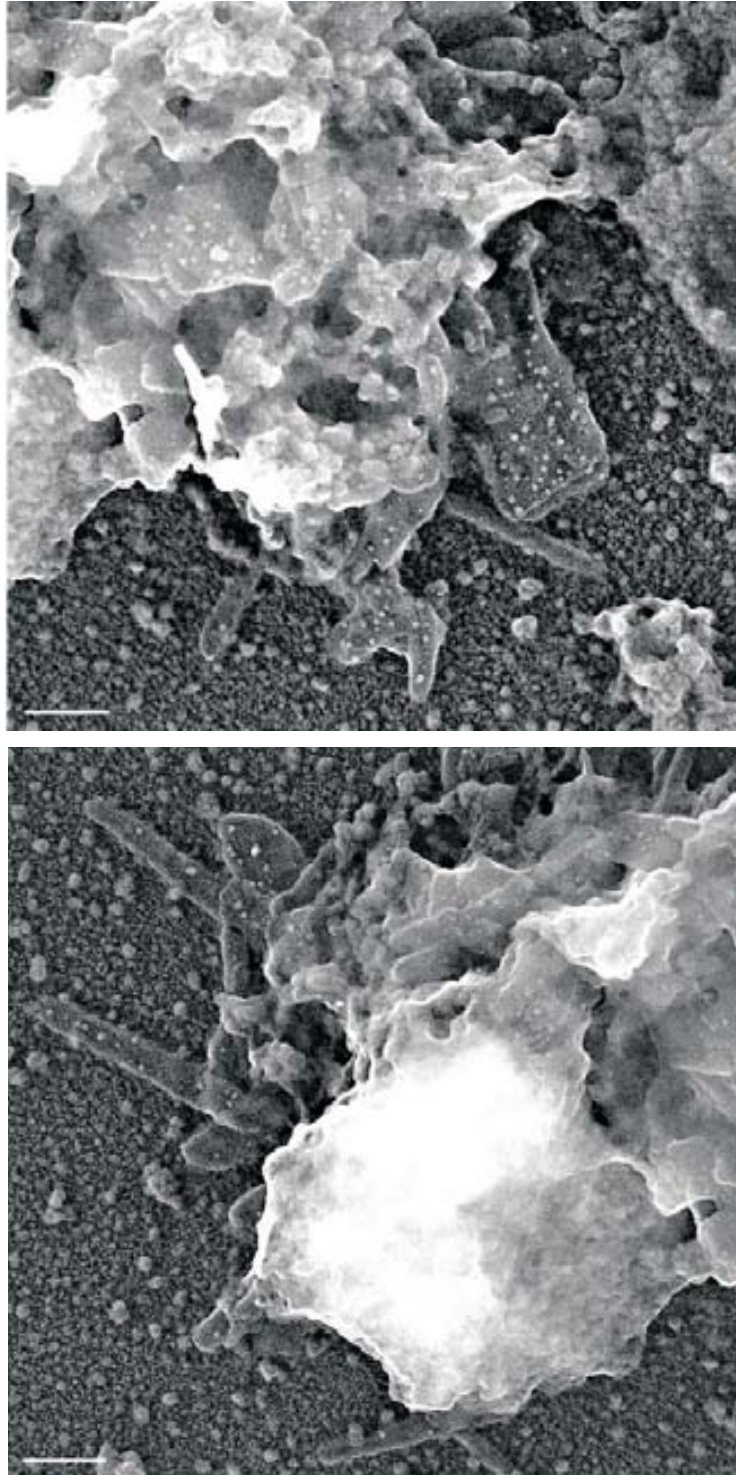


Figura 13.4: Agregados y placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 2.5 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

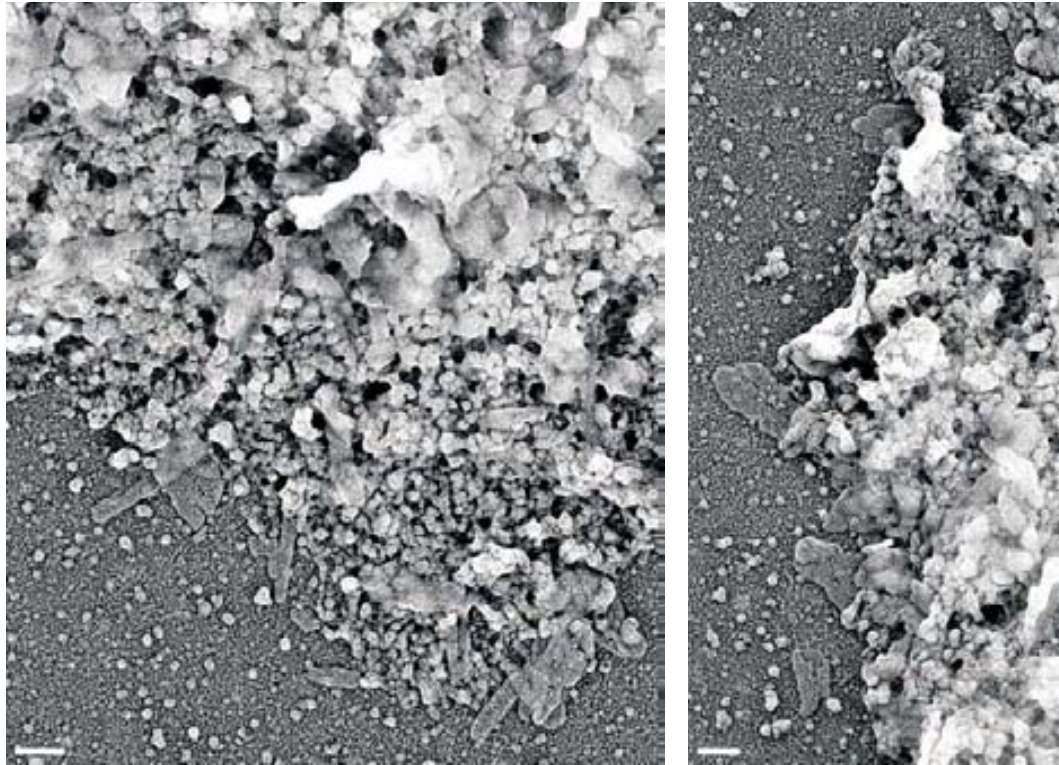


Figura 13.5: Agregado del que emanan placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

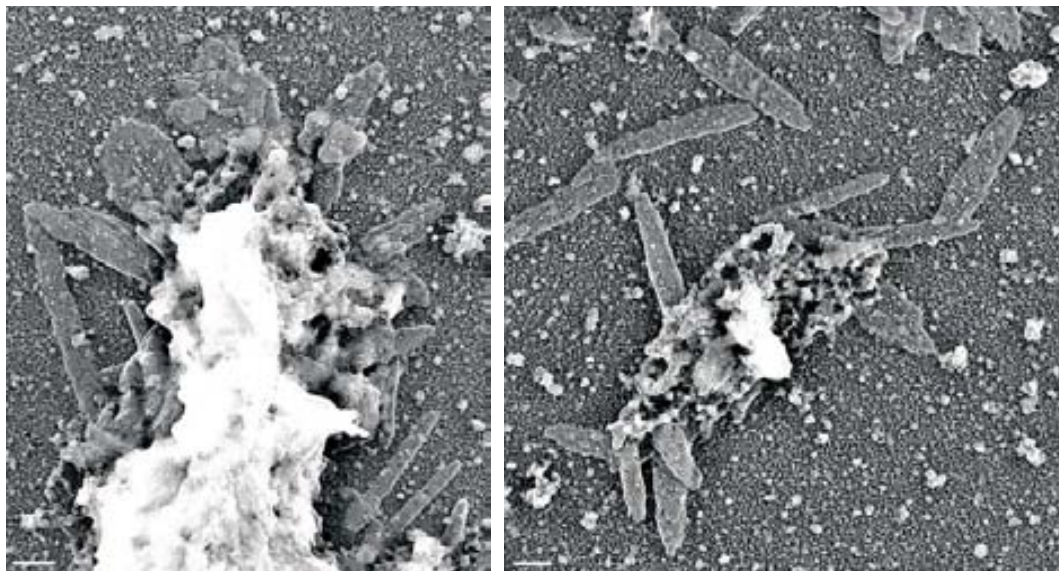


Figura 13.6: Placas alargadas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

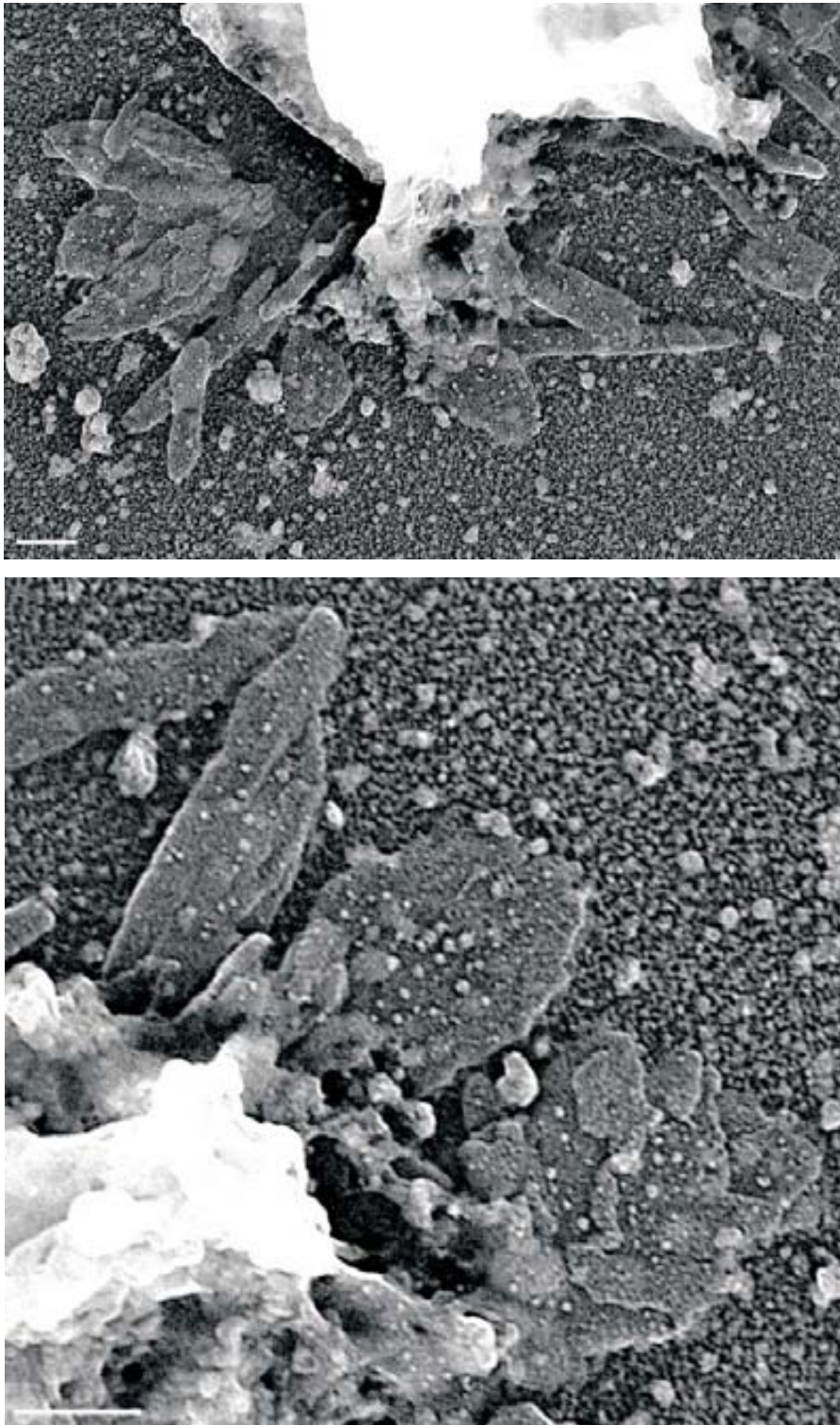


Figura 13.7: Placas de tamaño considerable con varios pisos formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 5 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

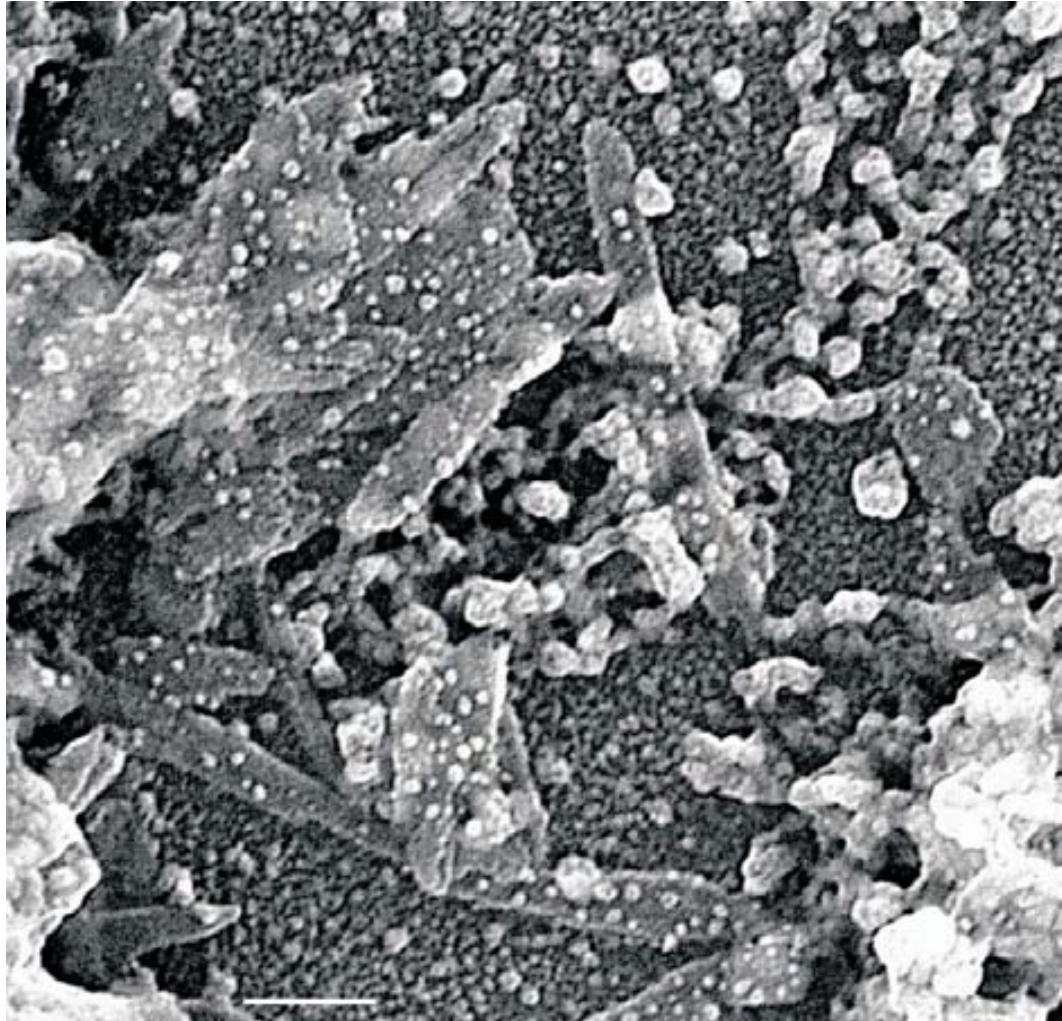


Figura 13.8: Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 10 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

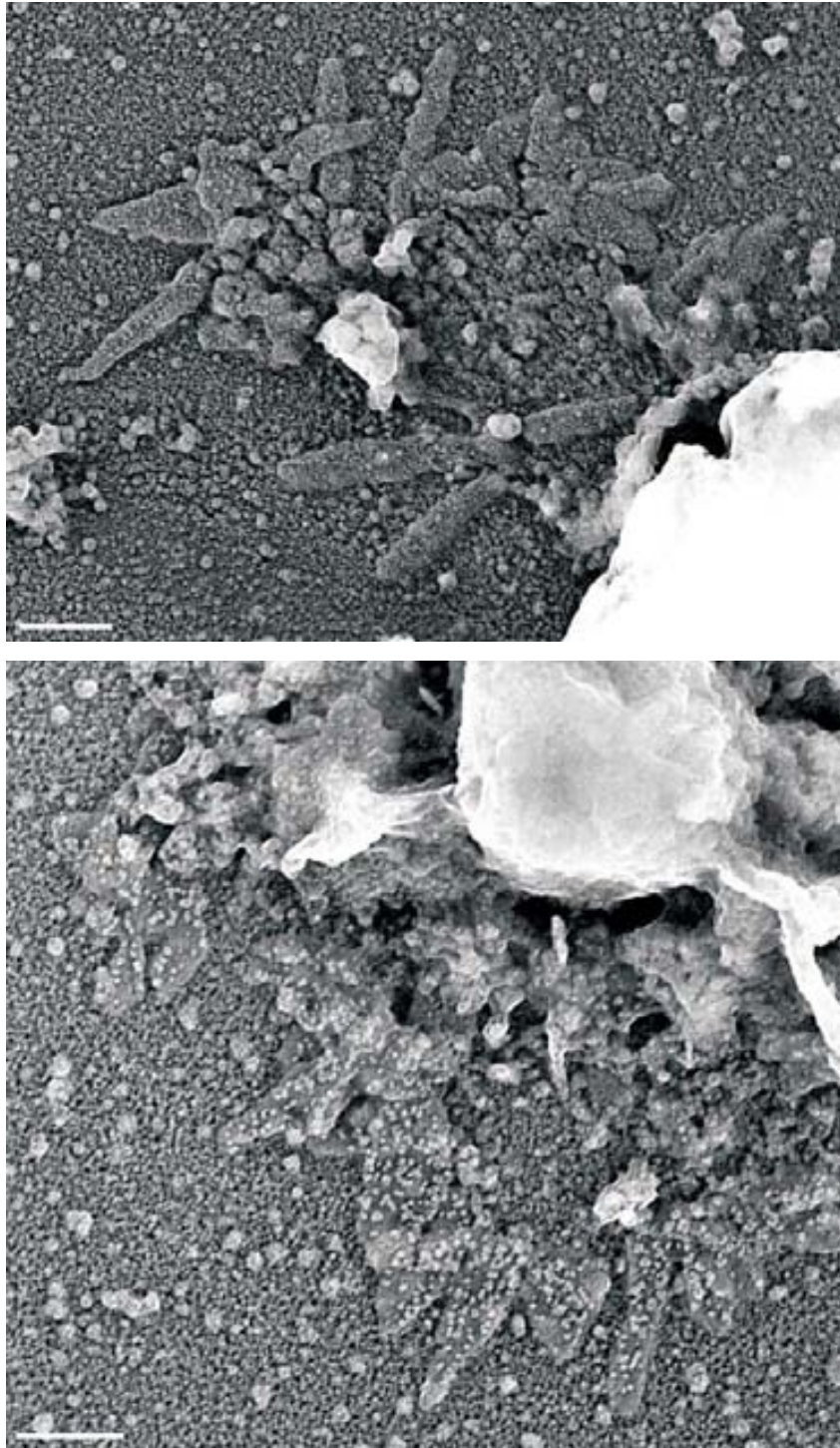


Figura 13.9: Placas alargadas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 10 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). En la micrografía inferior pueden observarse gran número de pequeños cuerpos circulares sobre la superficie de las placas. Barras: 200 nm.



Figura 13.10: Agregados con placas de diversos tamaños formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 10 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

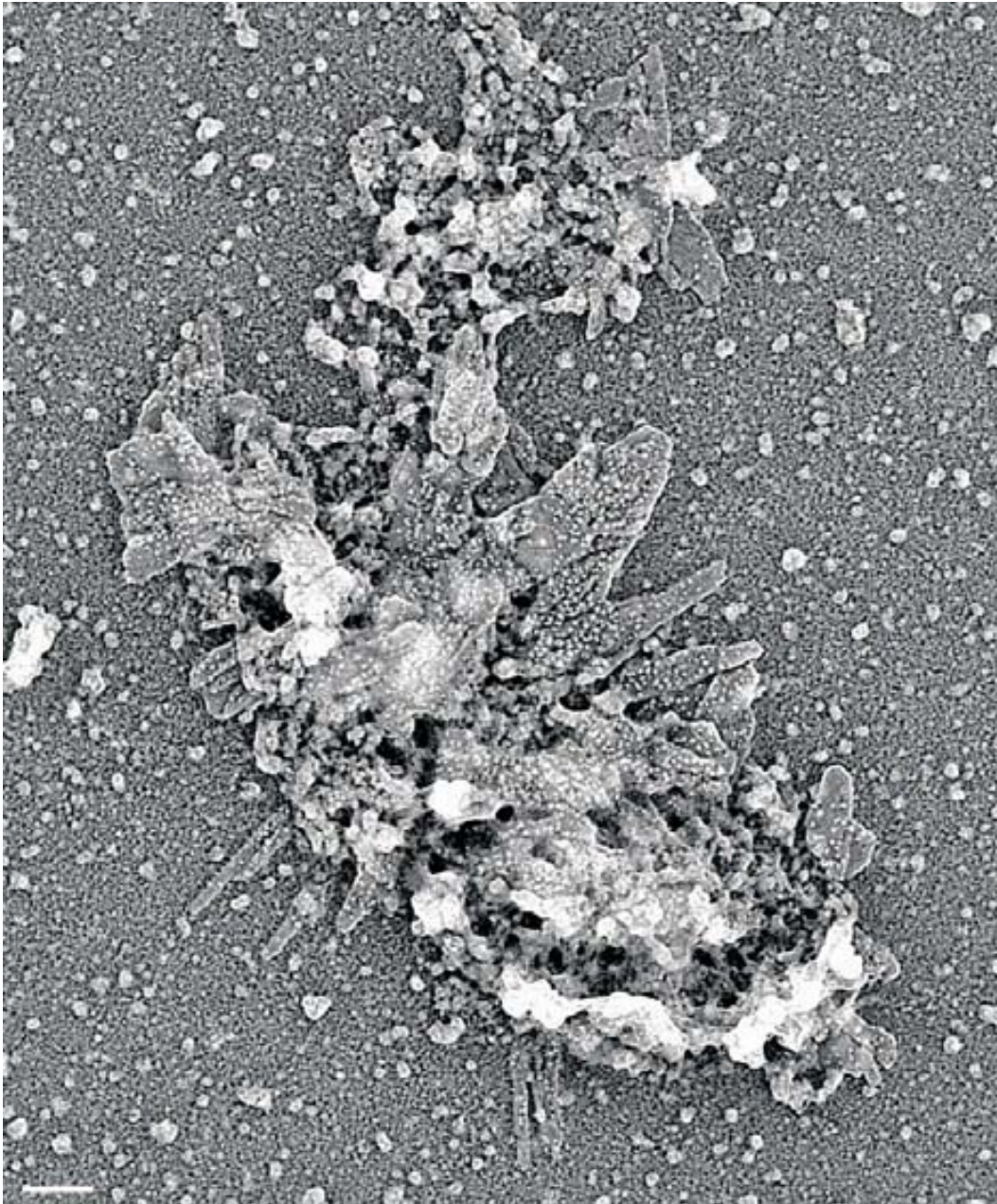


Figura 13.11: Gran agregado del que emanan placas de diversos tamaños formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 17 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Véase también la cantidad de pequeños cuerpos circulares sobre la superficie de las placas. Barras: 200 nm.

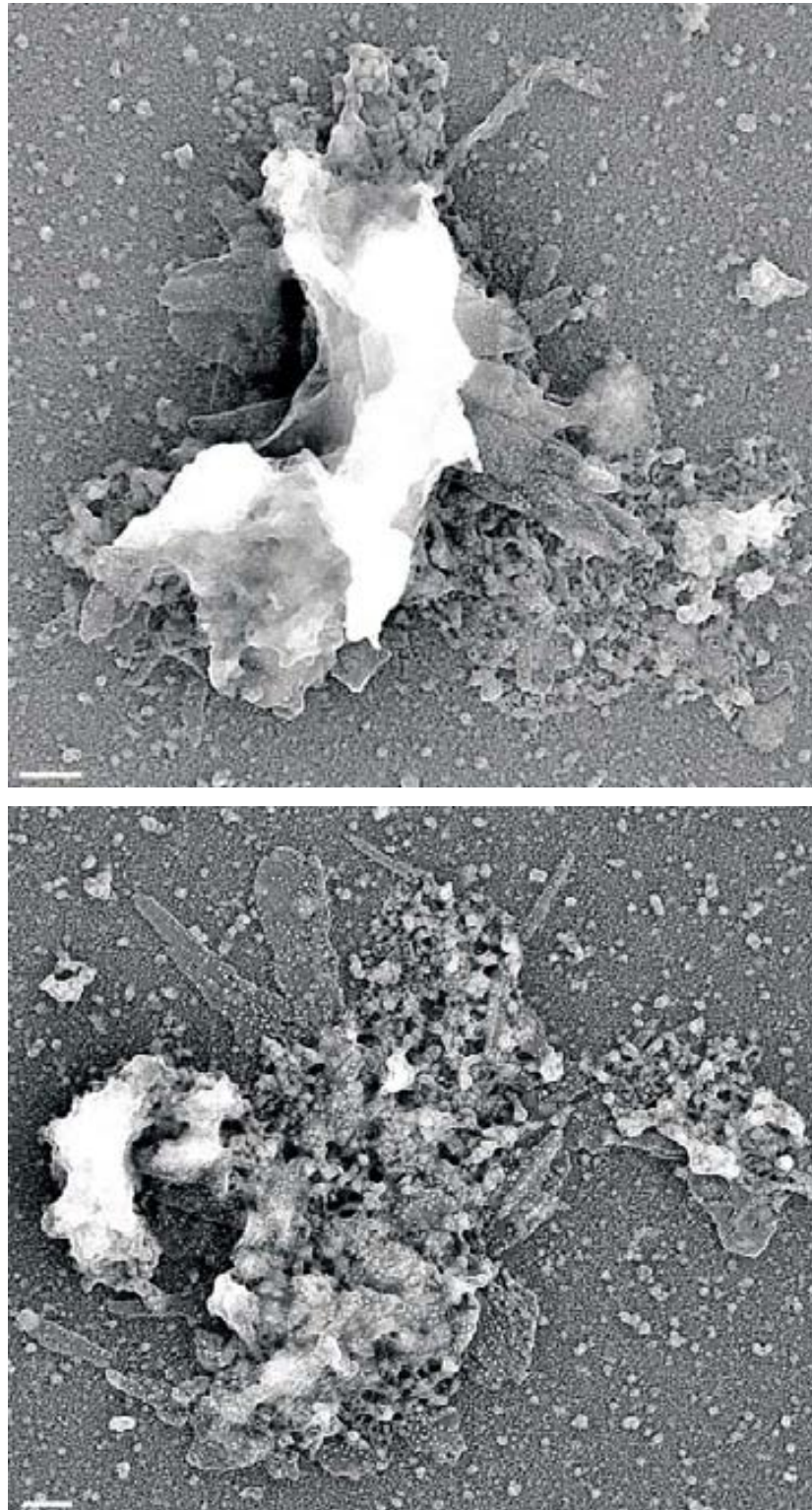


Figura 13.12: Agregados laminares y placas formadas por asociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de tampón PMKN (Mg^{2+} 17 mM) durante 6 horas a 4 °C (ver protocolo en la sección 9.5). Barras: 200 nm.

Los resultados muestran numerosas placas de tamaños diversos en cualquiera de las condiciones ensayadas, lo cual demuestra que la cromatina interfásica tiene tendencia a autoasociarse para formar estructuras laminares. Algunas placas llegan incluso a superar 1 μm de longitud. Las placas metafásicas son multilaminares y ocupan grandes superficies (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010; Milla y Daban, 2012). Las placas interfásicas pueden llegar a ser comparables a las metafásicas en longitud, pero en general son más alargadas y tienen poca tendencia a formar multicapas (Figuras 13.3-13.7). Puede observarse también un aumento de la compactación del material a medida que aumenta la concentración de magnesio, apreciable sobre todo en los grandes agregados. En condiciones iónicas próximas a la metafase (Mg^{2+} 10 y 17 mM; Figuras 13.8-13.12), las placas interfásicas conservan la forma alargada, y contienen muchos cuerpos redondeados en la superficie. El hecho de que se mantengan sus características diferenciales prácticamente invariables, aún bajo condiciones propias de la metafase, sugiere que las propiedades de asociación de la cromatina durante la interfase difieren de las que presenta la cromatina metafásica.

Algunos cuerpos circulares presentes sobre las placas tienen un diámetro aproximado de 30 nm y son similares a los que se observan a menudo en el fondo de las rejillas de las preparaciones de cromatina. Estas estructuras han sido descritas en diversos trabajos realizados en nuestro grupo de investigación a partir de cromatina de eritrocito de pollo, como pequeños fragmentos de cromatina plegados en forma de solenoide interdigitado compacto (Bartolomé et al., 1994; Bartolomé et al., 1995; Caño, 2007). Pero la mayoría de los que están sobre las placas son de menor diámetro y podrían corresponder a pequeños agregados de nucleosomas. En ocasiones, parece que los cuerpos circulares acabarían siendo incorporados a placas si el proceso de autoasociación continuase produciéndose (ver Figura 13.13).

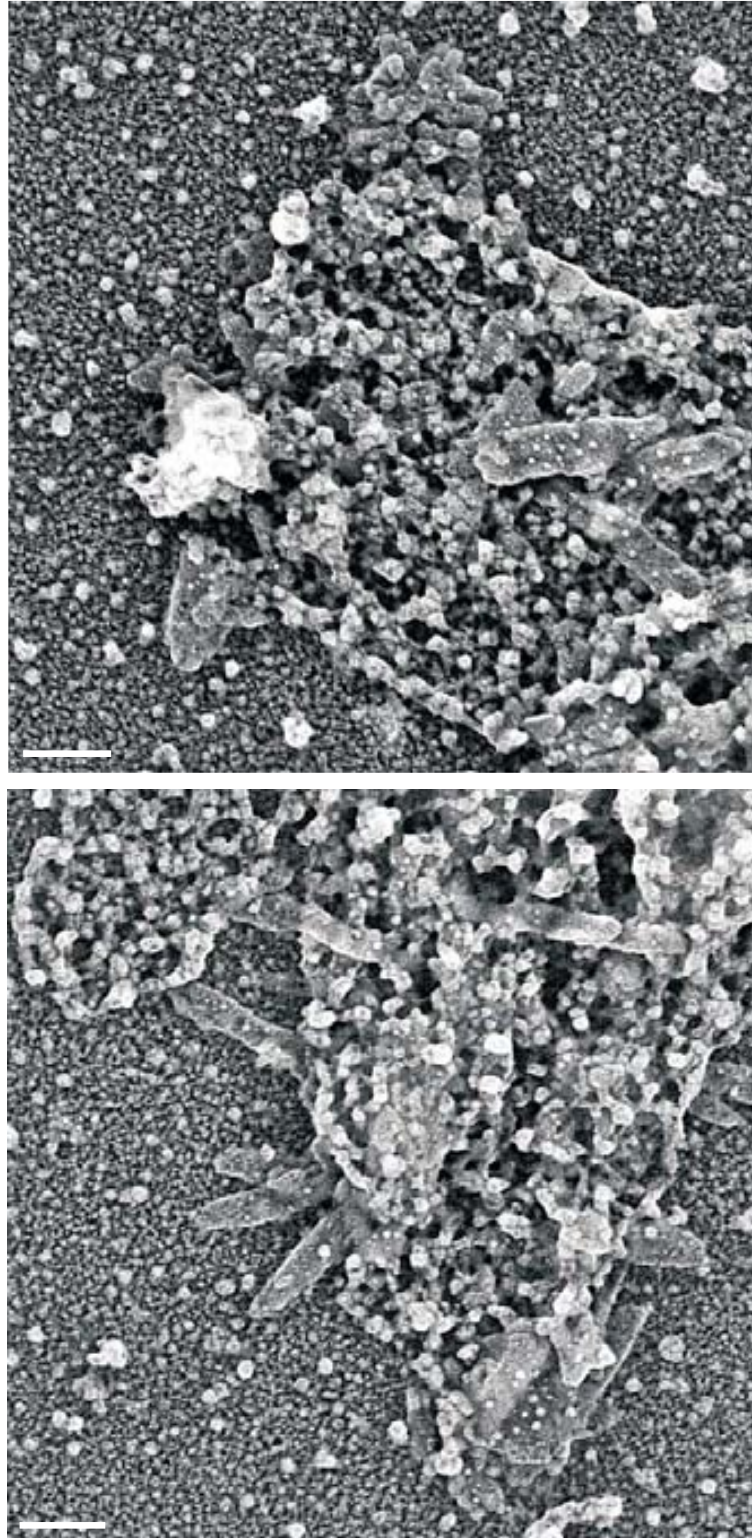


Figura 13.13: Agregados y placas de cromatina junto a gran cantidad de cuerpos de 30 nm. Se observan agregados de 30 nm distribuidos alrededor y sobre las placas de cromatina. Barras: 200 nm.

13.3. Formación de placas de cromatina en diferentes fases del ciclo celular

Tras evaluar la capacidad asociativa de la cromatina interfásica, se decidió realizar el mismo experimento, pero esta vez empleando cromatina procedente de núcleos separados en diversos estadios de la interfase (ver protocolo en la sección 9.5). Se esperaba poder detectar diferencias estructurales en función de la fase de la que procediera el material. Durante la realización de estos experimentos, la diálisis se realizó empleando concentraciones interfásicas de Mg^{2+} (2.5 y 5 mM) (Strick et al., 2001).

Las Figuras 13.14-13.17 muestran agregados que presentan regiones amorfas, así como también placas de diversos tamaños, producidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 . Se puede observar que las placas obtenidas por diálisis en presencia de Mg^{2+} 5 mM tienen un mayor tamaño y son más compactas.

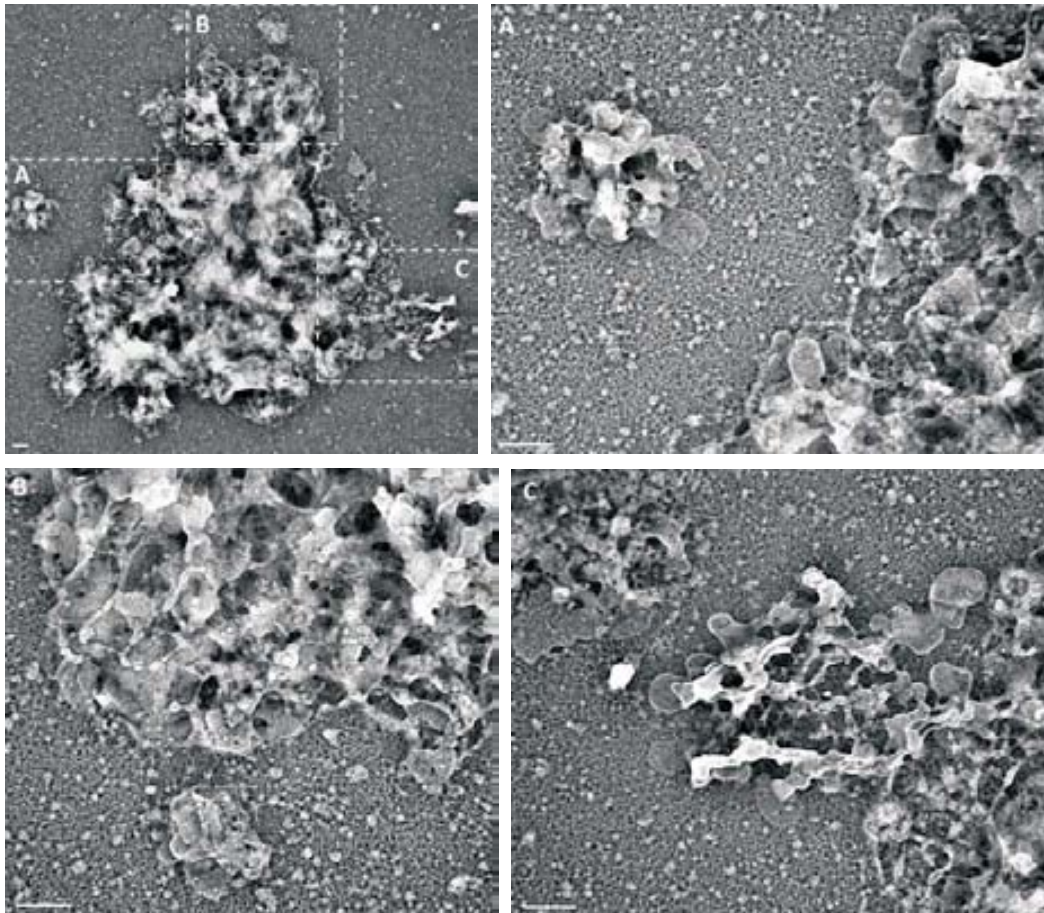


Figura 13.14: Agregado del que emanan placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 dializados en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM durante 6h a 4 °C. Las micrografías A, B y C muestran ampliaciones de las zonas señaladas. Barras: 200 nm.

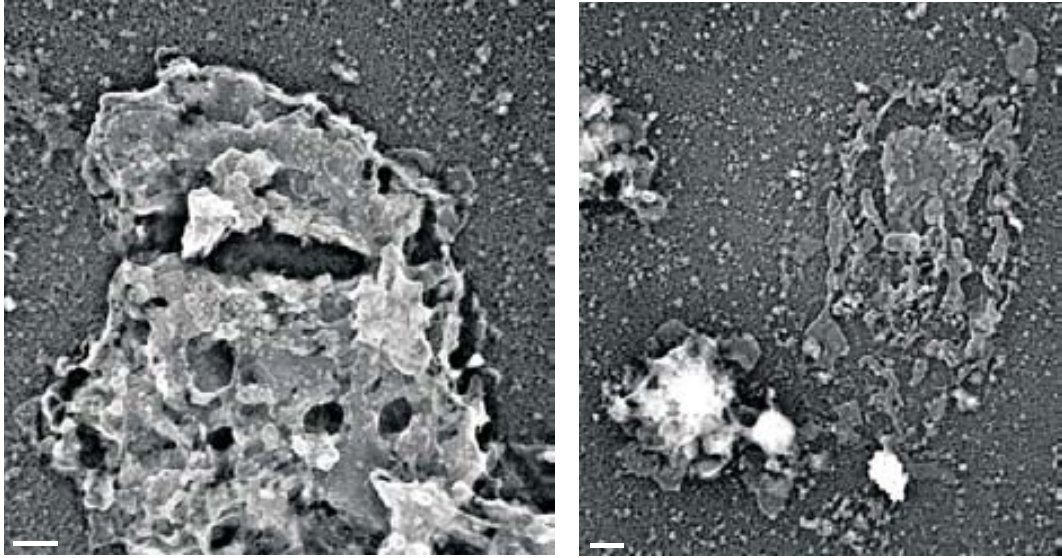


Figura 13.15: Placas de diversos tamaños obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 dializados en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

En las Figuras 13.16 y 13.17 pueden verse diversas placas en formación. La micrografía 13.16 A muestra fibras en proceso de estructuración para formar agregados laminares; B-C muestran agregados laminares en estado avanzado de compactación. Puede observarse como las capas superficiales parecen estar aún en proceso de estructuración, por la gran cantidad de rugosidades que presentan.

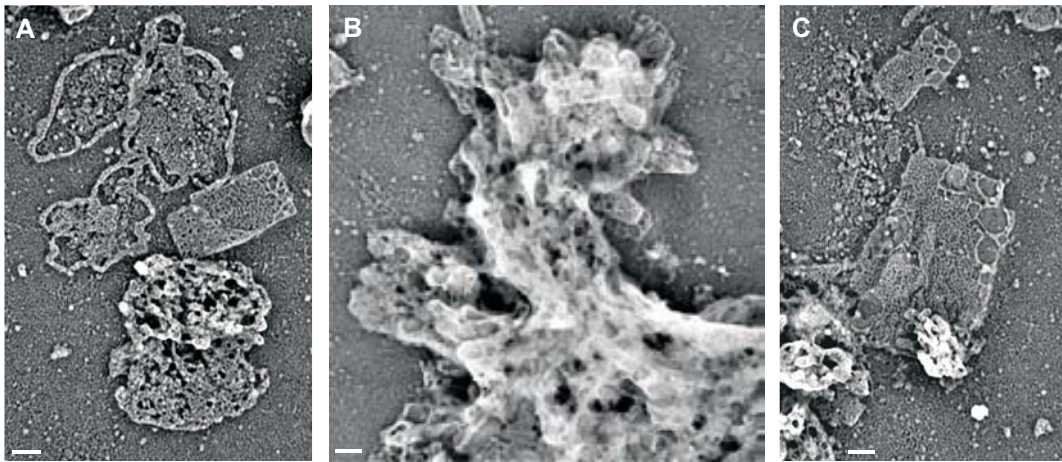


Figura 13.16: Placas en formación obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 dializados en presencia de Mg^{2+} 5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

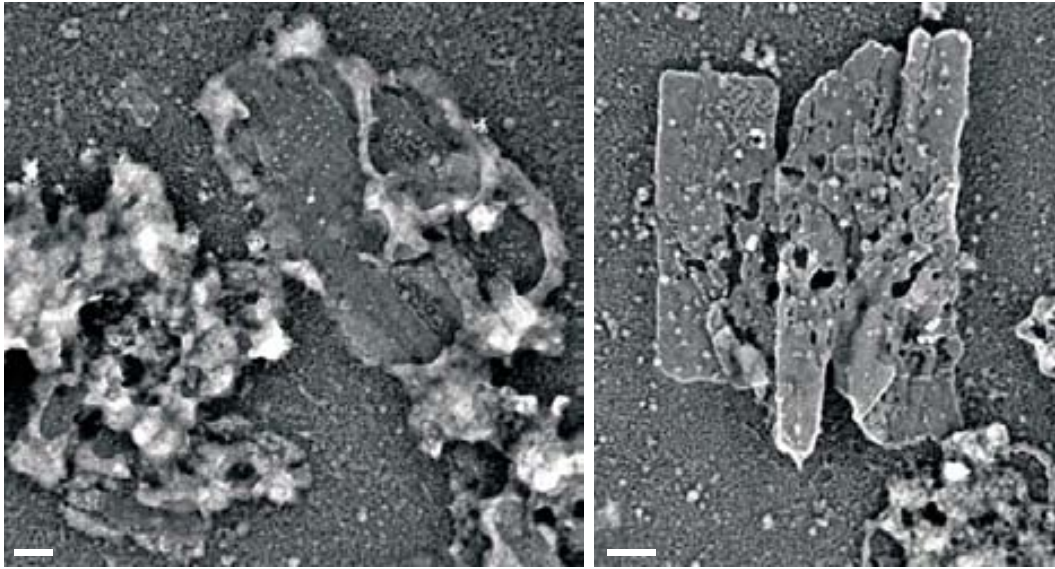


Figura 13.17: Placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G₁ dializados en presencia de Mg²⁺ 5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

Las Figuras 13.18-13.21 muestran pequeñas placas alargadas en formación a partir de fibras, agregados amorfos y placas de diversos tamaños obtenidos por autoasociación de fragmentos de cromatina de núcleos en fase S. Se puede observar que las placas obtenidas por diálisis en presencia de Mg²⁺ 5 mM suelen ser más compactas, de mayor tamaño y presentan menor número de cuerpos circulares sobre su superficie (Figuras 13.20 y 13.21). Las placas alargadas son más abundantes en presencia de Mg²⁺ 2.5 mM (Figuras 13.18 y 13.19). La Figura 13.18 A muestra pequeñas láminas espiculares formadas a partir de fibras, en B comienzan a apreciarse estructuras laminares de tamaño importante y C muestra un agregado laminar de tamaño considerable junto a otro agregado con placas pequeñas.

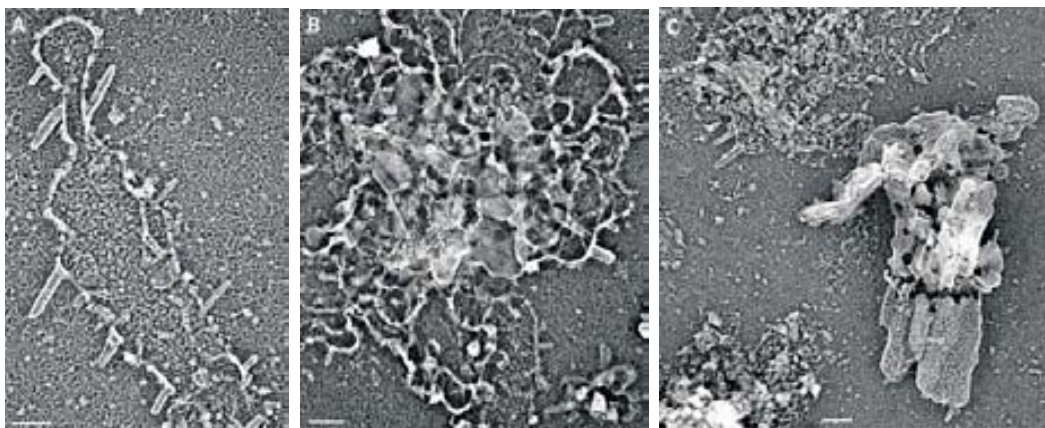


Figura 13.18: Placas en formación por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S dializados en presencia de Mg²⁺ 2.5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

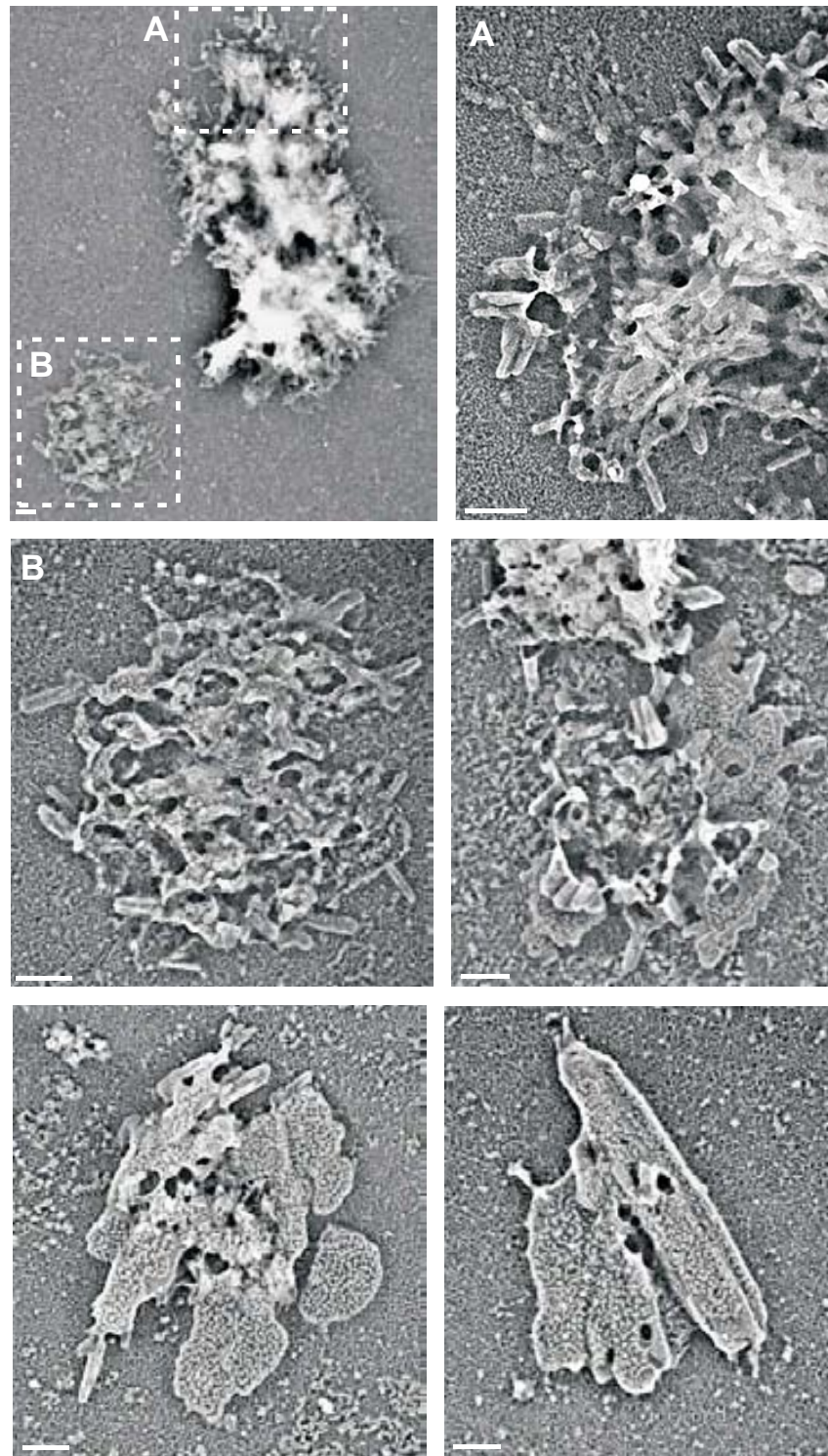


Figura 13.19: Agregados laminares obtenidos por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S dializados en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM durante 6 h a 4 °C. A y B muestran ampliaciones de las zonas señaladas. Barras: 200 nm.

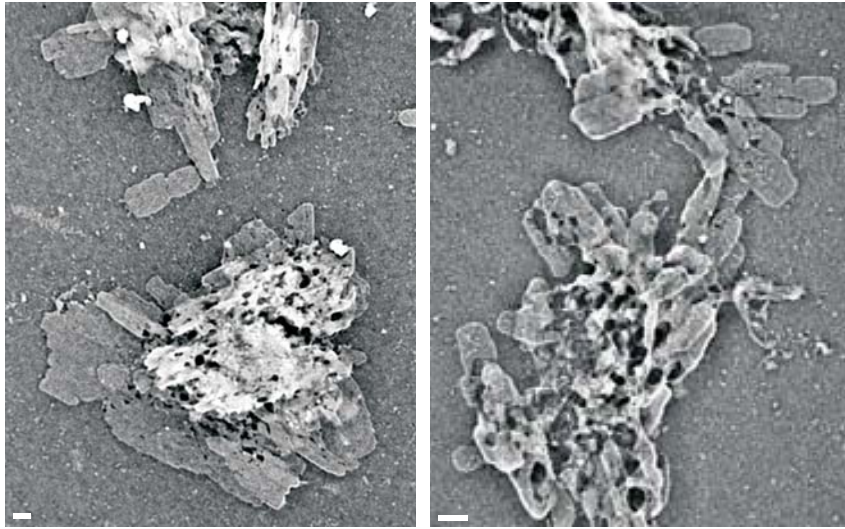


Figura 13.20: Placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S dializados en presencia de Mg^{2+} 5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

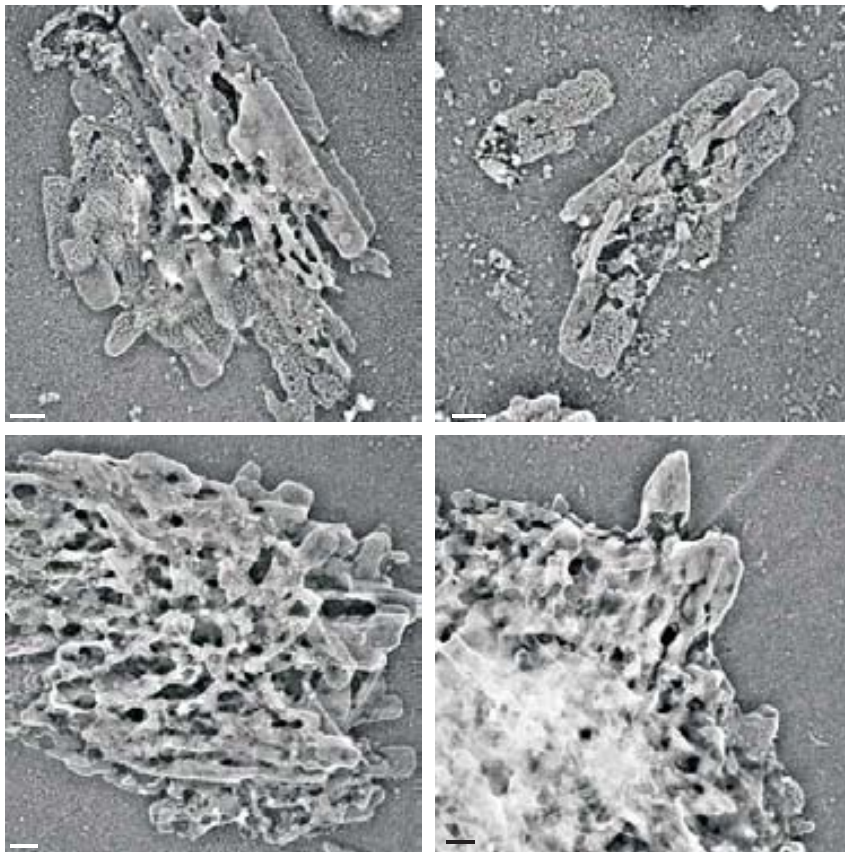


Figura 13.21: Más ejemplos de placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S dializados en presencia de Mg^{2+} 5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

Las Figuras 13.22-13.25 muestran pequeñas placas alargadas en formación a partir de fibras, agregados laminares y placas de diversos tamaños obtenidos por autoasociación de fragmentos de cromatina correspondiente a núcleos en fase G₂. De nuevo, se aprecia que las placas obtenidas por diálisis en presencia de Mg²⁺ 5 mM son más compactas y generalmente más grandes.

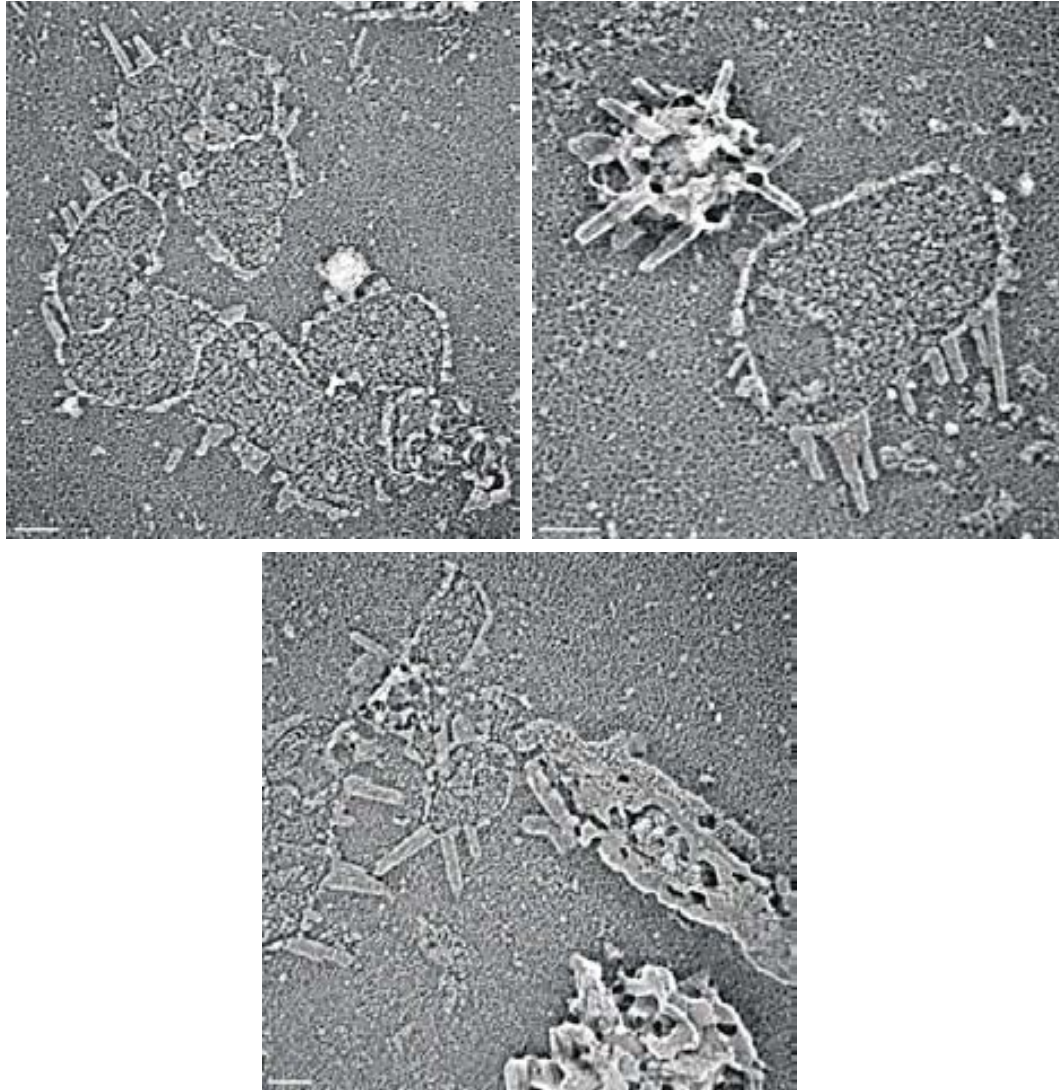


Figura 13.22: Placas en formación obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G₂ dializados en presencia de Mg²⁺ 2.5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

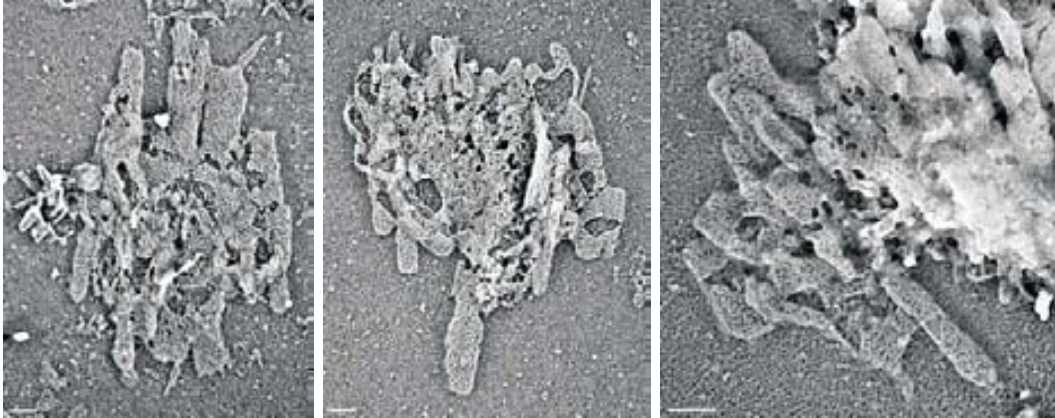


Figura 13.23: Placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G₂ dializados en presencia de Mg²⁺ 2.5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

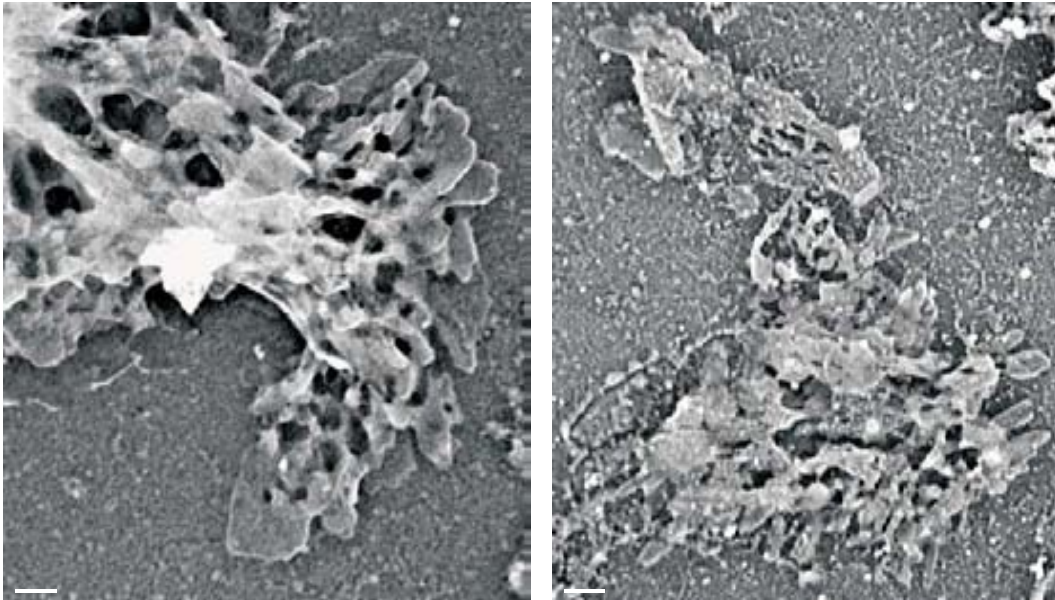


Figura 13.24: Más ejemplos de placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G₂ dializados en presencia de Mg²⁺ 5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

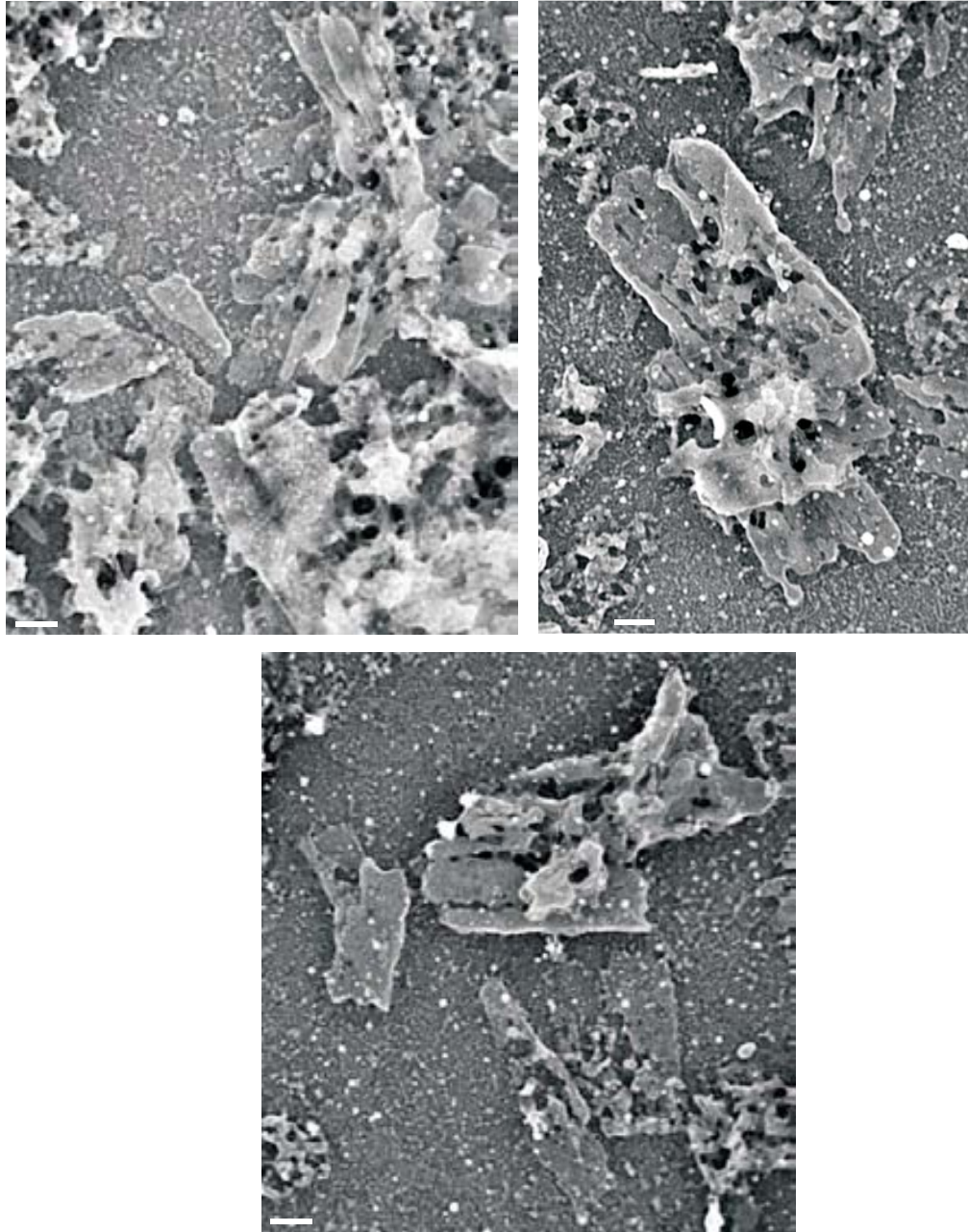


Figura 13.25: Grandes agregados laminares obtenidos por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_2 dializados en presencia de Mg^{2+} 5 mM durante 6 h a 4 °C. Barras: 200 nm.

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo indican que la cromatina procedente de los tres periodos en los que se divide la interfase (G_1 , S y G_2), tiene la capacidad intrínseca de autoasociarse para formar estructuras laminares. Apparentemente, las estructuras formadas son menos compactas y con menor tendencia a formar multicapas que las placas autoasociadas a partir de cromatina metafásica (Milla, 2011; Milla y Daban, 2012).

Capítulo 14

Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos: Preparación de muestras y análisis mediante SAXS

El presente capítulo se centra en el estudio de la estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos. Se incluye la preparación de muestras y el análisis de los patrones de dispersión de cromosomas metafásicos obtenidos mediante SAXS.

14.1. Resultados obtenidos en la preparación de muestras: Observación de cromosomas

En cada uno de los experimentos realizados, se evaluaba la cantidad y calidad de los cromosomas antes y después de la realización de los tratamientos pertinentes. Para ello, se extraía una alícuota de la suspensión de cromosomas y se depositaba por centrifugación sobre rejillas para TEM. La Figura 14.1 muestra micrográficas de cromosomas íntegros y compactos observados en controles preparados tras la purificación en gradiente escalonado de sacarosa (ver protocolo en la sección 10.2). En ocasiones en que los cromosomas, aún en condiciones estructurantes, perdían su integridad, han podido observarse placas (ver Figura 14.2). De nuevo, el fondo de las preparaciones de cromatina metafásica presentaba gran cantidad de agregados y cuerpos circulares de unos 30 nm, como se aprecia en la Figura 14.3.

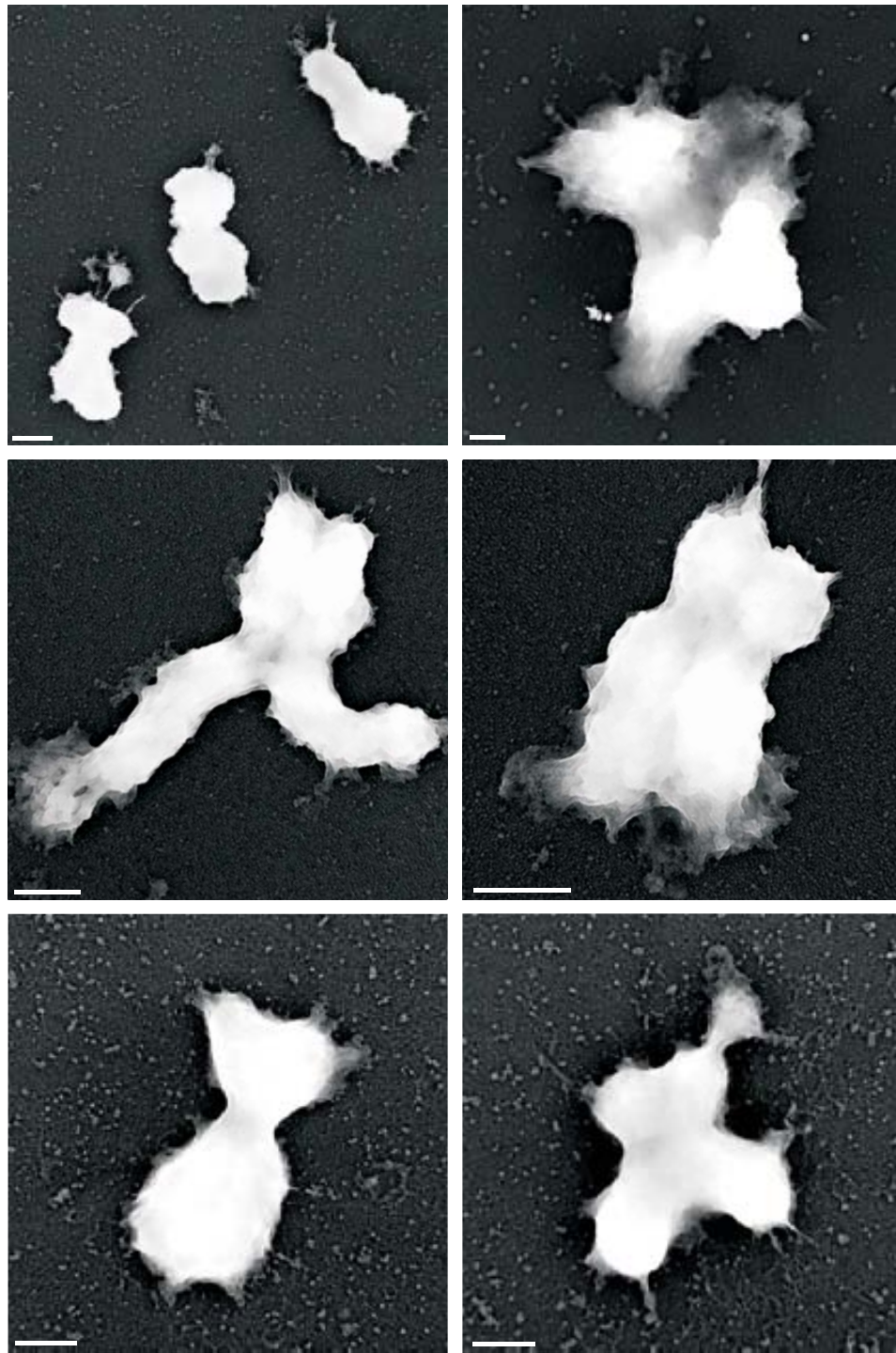


Figura 14.1: Micrografías de cromosomas purificados a través de gradiente escalonado de sacarosa. La extensión se realizó por centrifugación (sección 7.3.5.2), el material se fijó sobre rejilla (sección 7.3.6) y se platinó siguiendo el protocolo habitual (sección 7.3.7). Barras: 200 nm.

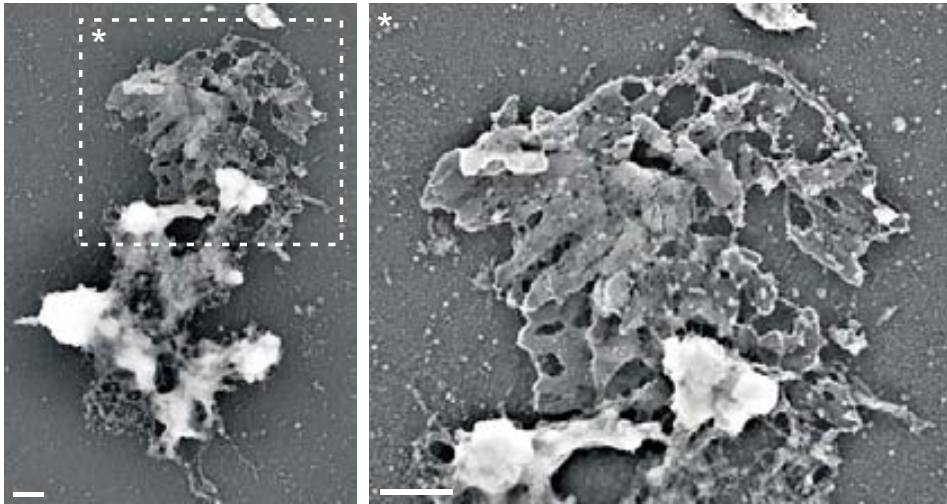


Figura 14.2: Cromosoma con emanaciones laminares. Los cromosomas fueron purificados en gradiente escalonado de sacarosa, diluidos 5 veces con tampón PM y dializados durante 4 h en presencia de tampón PM. Barras: 500 nm.

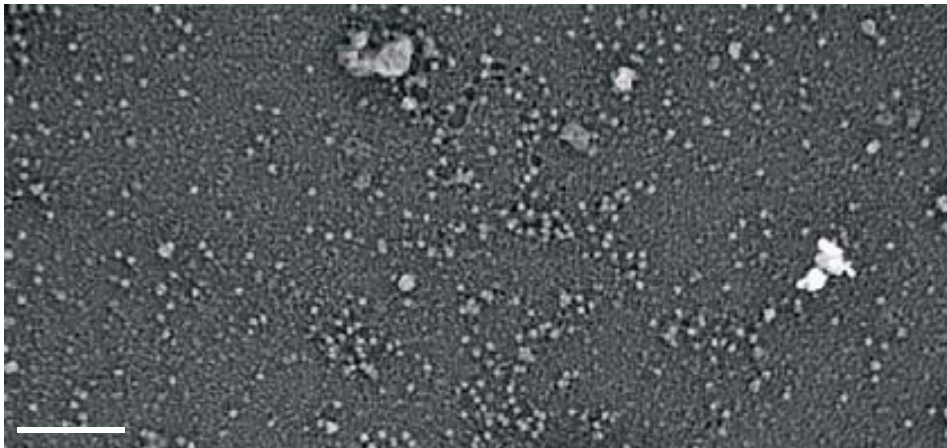


Figura 14.3: Pequeños agregados circulares de cromatina metafásica de ~ 30 nm de diámetro. Barra: 500 nm.

14.2. Resultado del análisis de cromosomas mediante SAXS

Se han realizado muchos estudios para comprender la estructuración de la cromatina en el interior de los cromosomas metafásicos. Tal como se ha comentado a lo largo de la introducción de este trabajo, han sido propuestos diversos modelos estructurales que consideran las fibras de 30 nm el elemento estructural fundamental de la cromatina (ver sección 4.4). Diversos estudios basados en técnicas bioquímicas (TEM y SAXS) apoyan los modelos basados en fibras de 30 nm (Finch y Klug, 1976; Woodcock et al., 1984; Widom y Klug, 1985; Bordas et al., 1986; Schalch et al., 2005; Robinson et al., 2006). Lo cierto es que muchos de estos estudios se han realizado bajo condiciones de baja fuerza iónica, que distan considerablemente de las condiciones celulares *in vivo*. Estudios previos de Poirier et al. (2002) han evaluado el efecto de cationes con diferente tamaño y carga sobre la condensación de la cromatina metafásica. Estos autores concluyen que las interacciones electrostáticas entre la cromatina y los cationes juegan un papel importante en la compactación y mantenimiento de la estructura del cromosoma metafásico. Por esta razón, otros autores han intentado estudiar la estructura del cromosoma en condiciones próximas a las que se encuentran en la célula. Las técnicas de crió-EM presentan la ventaja de que permiten la observación del material *in situ*. Los resultados obtenidos al aplicar esta técnica al estudio estructural del cromosoma no muestran fibras de 30 nm (McDowall et al., 1986; Eltsov et al., 2008; Maeshima et al., 2010).

El reciente trabajo de Nishino et al. (2012), que aplica la técnica de SAXS al estudio de la estructura interna del cromosoma, muestra unos perfiles de SAXS en los que aparece una señal correspondiente a distancias de aproximadamente 30 nm. Los autores han empleado también la técnica de crió-EM para el estudio del cromosoma. Las micrografías muestran agregados granulares en torno a los cromosomas, cuyo tamaño es similar al del ribosoma. Al analizar cromosomas previamente desprovistos de ribosomas mediante SAXS, los autores han observado cómo la señal correspondiente a 30 nm desaparece. Concluyen, por tanto, que la señal de 30 nm corresponde a ribosomas y no a fibras de 30 nm en el interior del cromosoma.

En nuestros experimentos en la estación de difracción de rayos X para materiales no-cristalinos del sincrotrón ALBA (ver métodos en la sección 10.3), hemos obtenido patrones de dispersión de cromosomas preparados en presencia de diversas condiciones iónicas (ver Tabla 10.2). En todas las condiciones ensayadas se han observado las señales típicas de la estructura interna del nucleosoma (2.8 y 3.7 nm). La señal a 11 nm, correspondiente a la distancia entre columnas paralelas de nucleosomas, muestra muy poca intensidad; la señal a 30 nm, correspondiente a la distancia repetida entre fibras empaquetadas de 30 nm (Widom y Klug, 1985), únicamente es visible en condiciones poco compactantes (Mg^{2+} 5mM y EDTA 100 mM). En condiciones estructurantes, pero sobretudo en condiciones iónicas propias de la metafase (Mg^{2+} 17 mM, K^+ 120 mM y Na^+ 20 mM) aparece una señal prominente centrada a 6 nm. Esta distancia corresponde a interacciones cara-cara entre nucleosomas. Además, tal como se indicará en el próximo capítulo, es equivalente a la distancia entre placas adyacentes.

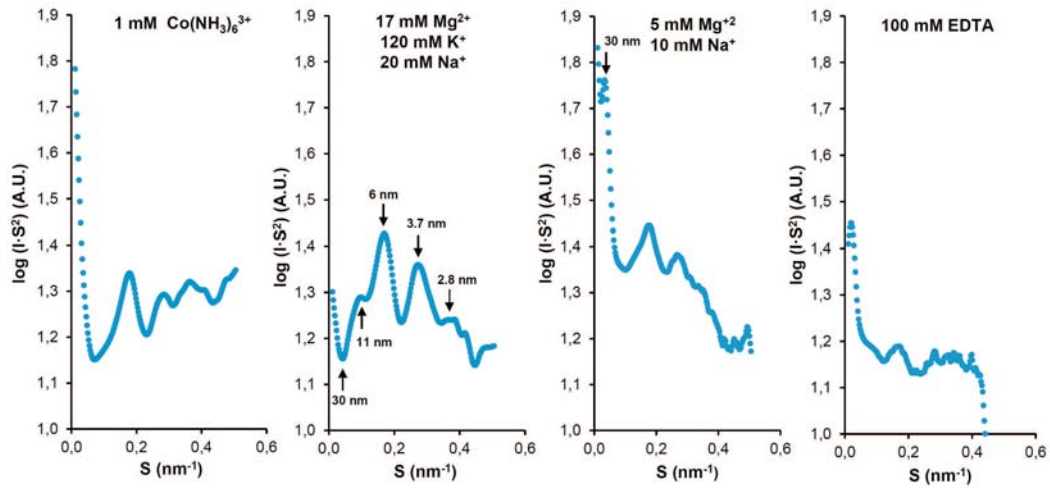


Figura 14.4: Perfiles de SAXS de cromosomas metafásicos adquiridos en presencia de diversas condiciones iónicas. Se representa $\log(I \times S^2)$ en función de S , siendo I la intensidad media y S el vector de *scattering*.

Capítulo 15

Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos: Caracterización ultraestructural mediante crio-ET

El presente capítulo se centra en el estudio de la estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos. Este capítulo incluye la caracterización ultraestructural de las placas de cromatina metafásica realizada mediante crio-tomografía electrónica.

15.1. Resultados obtenidos en la preparación de suspensiones de cromatina metafásica para su estudio mediante crio-ET

Para la realización de experimentos de crio-ET era necesario obtener una suspensión suficientemente concentrada de cromatina metafásica. Los cromosomas purificados en gradiente escalonado y diluidos posteriormente 5 veces con tampón PM, se desestructuraban parcialmente al hacerlos pasar varias veces a través de una aguja hipodérmica acoplada a jeringa. A continuación, se sometían a diálisis a 37 °C durante 2 h y, finalmente, eran depositados sobre rejilla para TEM por centrifugación (ver métodos en el capítulo 10). El rendimiento de la preparación se evaluó en el microscopio electrónico de transmisión.

Los primeros experimentos se realizaron empleando el tampón MT para provocar la lisis celular y el tampón PM con una concentración de Mg^{2+} de 17 mM durante el resto del proceso (ver Tabla 10.1). Se decidió emplear estas condiciones experimentales ya que la lisis con tritón X-100 y Mg^{2+} durante la obtención de cromosomas para SAXS había resultado dar muy buen rendimiento, y en segundo lugar porque está descrito que el cromosoma metafásico contiene una concentración de Mg^{2+} de 17 mM (Strick et al., 2001) y dicha condición mostraba placas muy compactas. La Figura 15.1 resume los resultados obtenidos en los primeros experimentos.

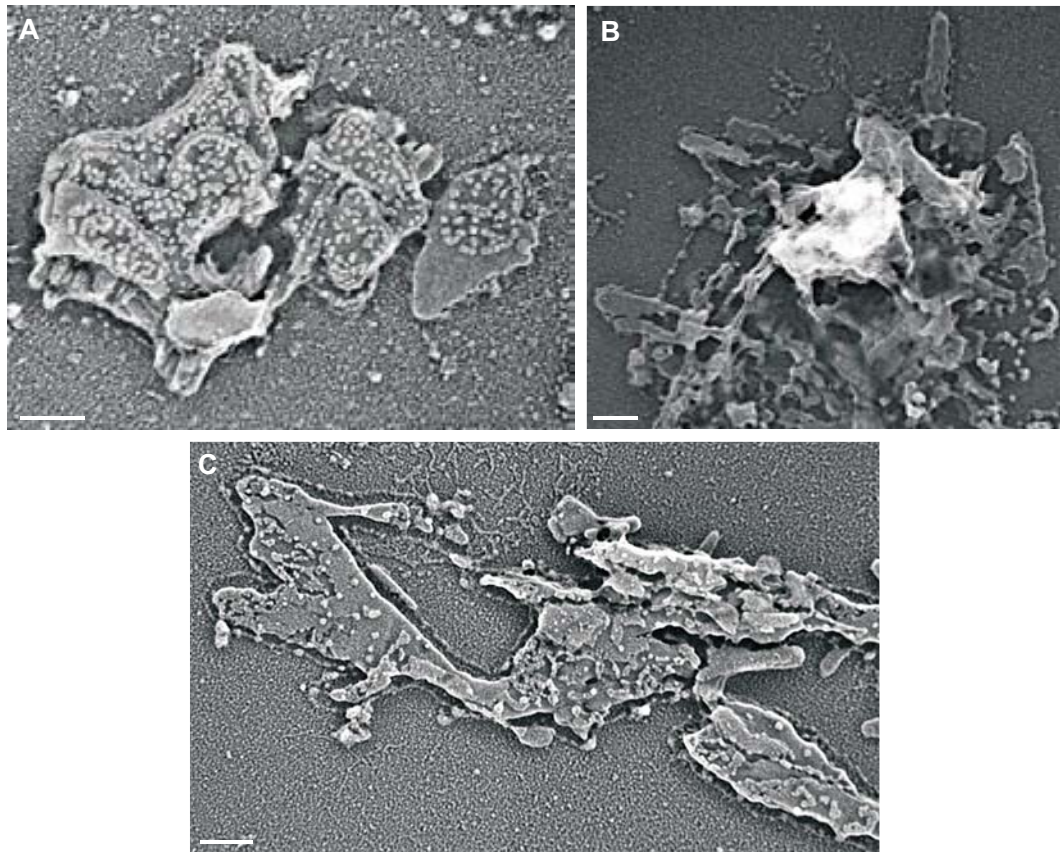


Figura 15.1: Placas de cromatina obtenidas a partir de cromosomas purificados en gradiente escalonado de sacarosa, desestructurados tras pasar la suspensión 15 veces a través de aguja a presión y diálizados en presencia de Mg^{2+} 17 mM a 37 °C durante 2 h. En A y B la muestra fue depositada sobre rejillas para TEM justo después de la diálisis. En C la muestra obtenida tras la diálisis se conservó en baño de hielo durante 42 h. Barras: 200 nm.

Puesto que las adquisiciones de las series tomográficas iban a realizarse en el Max-Planck Institut für Biochemie (Martinsried, München), y la muestra debía ser trasladada a 4 °C, era necesario asegurar la completa integridad de las placas preparadas el día anterior en la UAB. Para evaluar el efecto del tiempo sobre la suspensión de placas, se mantuvieron en baño de hielo durante 42 h y, a continuación, fueron depositadas sobre rejillas para TEM. Tras este tiempo, las placas eran equivalentes a las que fueron depositadas el mismo día de su preparación (ver Figura 15.1 C).

Tras varios intentos para obtener una gran cantidad de placas en las preparaciones, se llegó a la conclusión de que el empleo de una concentración de Mg^{2+} de 17 mM provocaba tal compactación del material que aumentaba el número de grandes agregados, pero reducía notablemente la presencia de placas en la superficie de las rejillas para TEM. Por esta razón, se decidió disminuir la concentración de Mg^{2+} . Se substituyó la lisis con tampón MT por la lisis con tampón PA y en el resto del proceso se empleó Mg^{2+} 5 mM. Esta condición demostró ser mucho más efectiva para producir suspensiones concentradas de placas.

La Figura 15.2 muestra placas obtenidas a partir de cromosomas purificados en gradiente escalonado de sacarosa (ver sección 10.2), diluidos 5 veces con PM (Mg^{2+}

5 mM), desestructurados tras pasar 20 veces a través de una aguja hipodérmica acoplada a jeringa y dializados a 37 °C durante 4h con tampón PM (Mg^{2+} 5 mM; ver procedimiento en la sección 10.4.3). La muestra se despositó por centrifugación sobre rejillas para TEM (ver apartado 7.3.5.2).

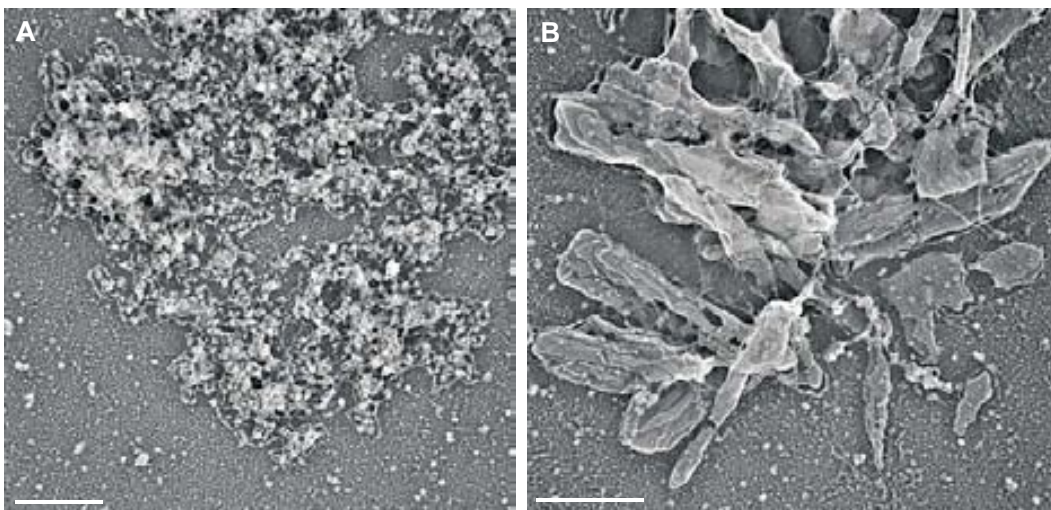


Figura 15.2: Placas de cromatina obtenidas a partir de cromosomas purificados en gradiente escalonado de sacarosa, desestructurados tras pasar la suspensión de cromosomas 20 veces a través de aguja a presión y dializados en presencia de Mg^{2+} 5 mM a 37 °C durante 4 h. En **A** se muestra un gran agregado bastante desestructurado, caracterizado por la presencia de placas de reducido tamaño. En **B** se puede ver un agregado laminar. Barras: 500 nm.

Tras pasar la muestra a través del orificio de una aguja hipodérmica 20 veces se obtenían placas, pero no en suficiente cantidad como para llevar a cabo experimentos de crio-ET. En general, se veían muchos agregados muy desestructurados, en los que podían intuirse bordes laminares y alguna que otra placa pequeña. Pero, en definitiva, no resultaba un material apto para los experimentos que se querían realizar. Se decidió reducir el número de pases a través de la aguja, con el fin de que el tratamiento resultara menos agresivo para el material. El hecho de reducir el uso de la aguja hipodérmica, provocó un aumento en el rendimiento de producción de placas. En la Figura 15.3 se muestran los resultados obtenidos tras pasar la muestra a través de aguja hipodérmica 5 veces. Para los experimentos de crio-ET también se prepararon muestras pasadas 1 sola vez por aguja hipodérmica. Estas dos últimas condiciones ensayadas mostraron un rendimiento óptimo para la preparación de suspensiones concentradas de placas. A pesar de que, sobre todo tras pasar la suspensión nuclear una sola vez a través de la aguja hipodérmica, algunos cromosomas permanecían prácticamente intactos, estas condiciones mostraban una gran presencia de placas de tamaños diversos y fue el tratamiento elegido para la preparación de las muestras que se destinarían a experimentos de crio-ET.

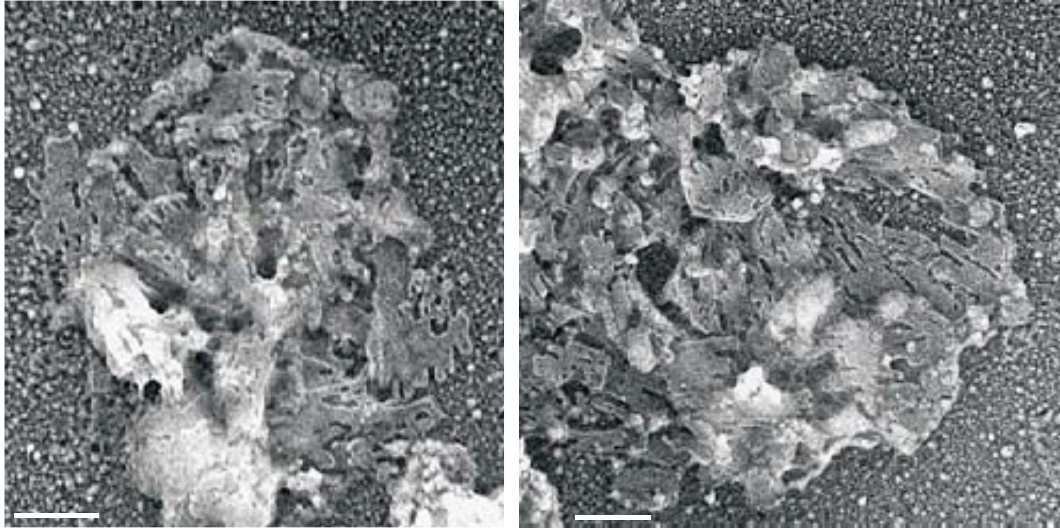


Figura 15.3: Placas de cromatina obtenidas a partir de cromosomas purificados en gradiente escalonado de sacarosa, desestructurados tras pasar la suspensión de cromosomas 5 veces a través de aguja a presión y dializados en presencia de Mg^{2+} 5 mM a 37 °C durante 2 h. Barras: 200 nm.

15.1.1. Optimización de las condiciones de deposición de placas de cromatina sobre rejillas para criomicroscopía

Las micrografías obtenidas bajo temperaturas criogénicas presentan muy bajo contraste, debido a la baja dosis electrónica empleada en el proceso de adquisición. En estas condiciones, se hacía muy complicado evaluar el estado del material, pero era útil para evaluar el estado del hielo, su grosor y la cantidad de muestra. La Figura 15.4 muestra los resultados obtenidos tras depositar la muestra sobre las rejillas con Quantifoil por contacto directo durante diversos tiempos (ver procedimiento en el apartado 10.4.4).

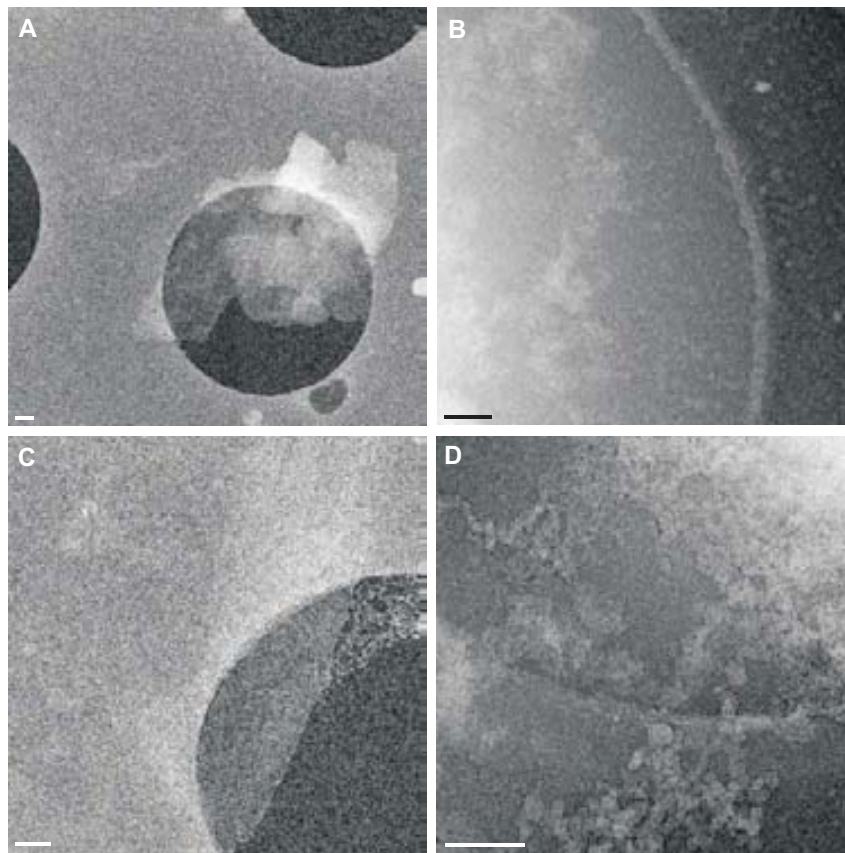


Figura 15.4: Imágenes de crio-TEM de placas de cromatina metafásica depositadas sobre rejillas para criomicroscopía mediante curación a diversos tiempos. Las rejillas con Quantifoil estuvieron en contacto con la muestra durante 1 h (A), 2 h (B), 3 h (C) y 16 h (D). Barras: 200 nm.

Las preparaciones con tiempos cortos presentaban un hielo muy limpio y pocos agregados grandes. Sin embargo, la presencia de placas era muy escasa. Las preparaciones de 16 h presentaban mayor cantidad de material pero no eran óptimas porque requerían demasiado tiempo de preparación.

Se ensayó la deposición mediante centrifugación de la suspensión de placas directamente sobre rejillas con Quantifoil activado. A pesar de la posible fragilidad del Quantifoil, este método resultó ser el mejor para depositar placas. En la Figura 15.5 pueden verse micrografías que muestran placas depositadas por centrifugación, observadas mediante crio-TEM.

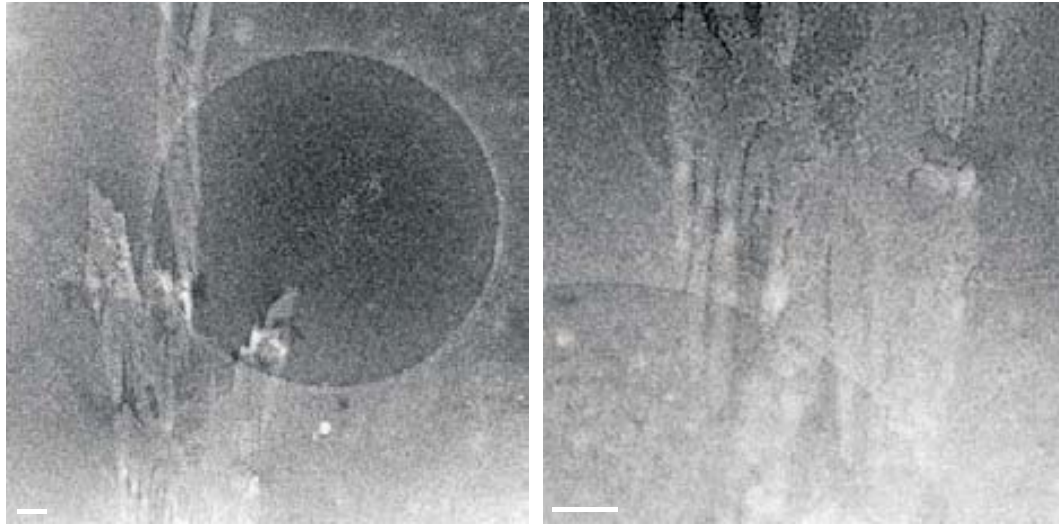


Figura 15.5: Micrografías de placas de cromatina metafásica depositadas sobre rejillas para criomicroscopía mediante centrifugación adquiridas en condiciones criogénicas. La centrifugación de la muestra sobre Quantifoil activado se realizó durante 10 minutos a 4 °C (ver sección 7.3.5.2). Barras: 200 nm.

Para poder evaluar el estado de las placas depositadas sobre rejillas para crio-TEM, se procedió a descongelar algunas de estas rejillas. La Figura 15.6 muestra micrografías de TEM convencional de las rejillas empleadas en crio-TEM, descongeladas y platinadas *a posteriori*. En estas rejillas, gran cantidad del material se perdía al descongelar la rejilla y retirar el exceso de líquido, pero aún así se observó la presencia de placas.

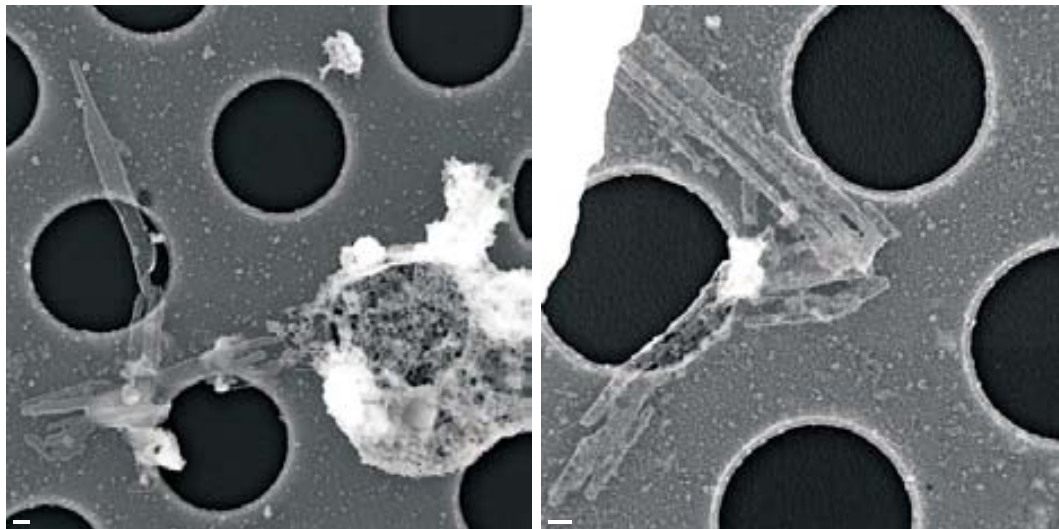


Figura 15.6: Micrografías de placas de cromatina metafásica depositadas sobre rejillas para criomicroscopía mediante centrifugación. Estas rejillas fueron empleadas para su valoración bajo condiciones criogénicas; posteriormente fueron descongeladas y platinadas para su observación mediante TEM convencional. Barras: 200 nm.

15.2. Caracterización ultraestructural de las placas de cromatina metafásica mediante crio-ET

En primer lugar, se debe tener presente que las placas analizadas mediante crio-ET se encontraban en suspensión acuosa antes de que se procediera a la vitrificación del agua por inmersión en etano licuado. Las adquisiciones tomográficas se realizan en las zonas libres de carbono que proporcionan los agujeros de la lámina de Quantifoil. Por lo tanto, en contraste con las placas vistas previamente mediante TEM convencional (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010; Milla y Daban, 2012), no existe un soporte que oriente las placas en una dirección preferente. Como resultado, las placas adoptan trayectorias complicadas dentro del volumen de hielo que las contiene.

Los primeras reconstrucciones tridimensionales de placas resultaron desconcertantes, ya que únicamente presentaban líneas y no superficies planas. El análisis de un tomograma se realiza sección a sección, y cada sección tiene un grosor correspondiente a un píxel. Por tanto, cada plano que se observe, muestra una sección concreta del volumen. Si el tomograma posee diversas placas distribuidas por todo el volumen, en cada sección se verán líneas correspondientes a las placas presentes en ese plano concreto (ver Figura 15.7).

Por otro lado, el contraste proporcionado por la técnica de crio-ET es escaso, aunque aumenta considerablemente cuanto más material encuentren los electrones a su paso a través de la muestra. Es decir, si tenemos una placa dispuesta de forma perpendicular a la dirección del haz de electrones, la cantidad de átomos que encontrarán los electrones al atravesar la placa será pequeña. Por el contrario, si la superficie de la placa es paralela a la dirección de los electrones, estos encontrarán una gran cantidad de átomos a su paso, y esto se traducirá en un aumento considerable del contraste. Entre ambas situaciones existe todo un abanico de inclinaciones posibles de las placas contenidas en la película de hielo. Además, las placas varían su orientación a lo largo de las secciones, lo que provoca variaciones del contraste de las líneas observadas. Al analizar los tomogramas, también se debe tener en cuenta el efecto del *missing wedge* (ver apartado 5.3.1).

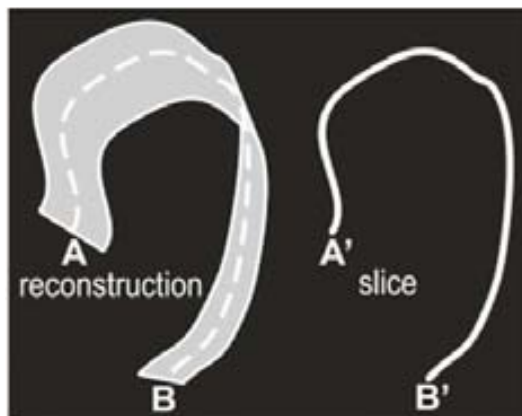


Figura 15.7: Representación esquemática de la observación de una placa reconstruida mediante crio-ET. Se muestra la reconstrucción tridimensional de una placa y la correspondiente visualización en una sección concreta del volumen reconstruido.

15.2.1. Reconstrucciones sin placa de fase a una magnificación de 27500x

La Figura 15.8 muestra un tomograma reconstruido (ver métodos en la sección 10.4). Se pueden observar las tres proyecciones XY, XZ e YZ intersecadas en un punto concreto del volumen. El plano XY muestra una imagen más comprensible del contenido del volumen, pero corresponde únicamente a una sección (ver Figura 15.7). Los planos XZ e YZ ayudan a entender la distribución de las estructuras en el interior del volumen, pero tienen menor definición.

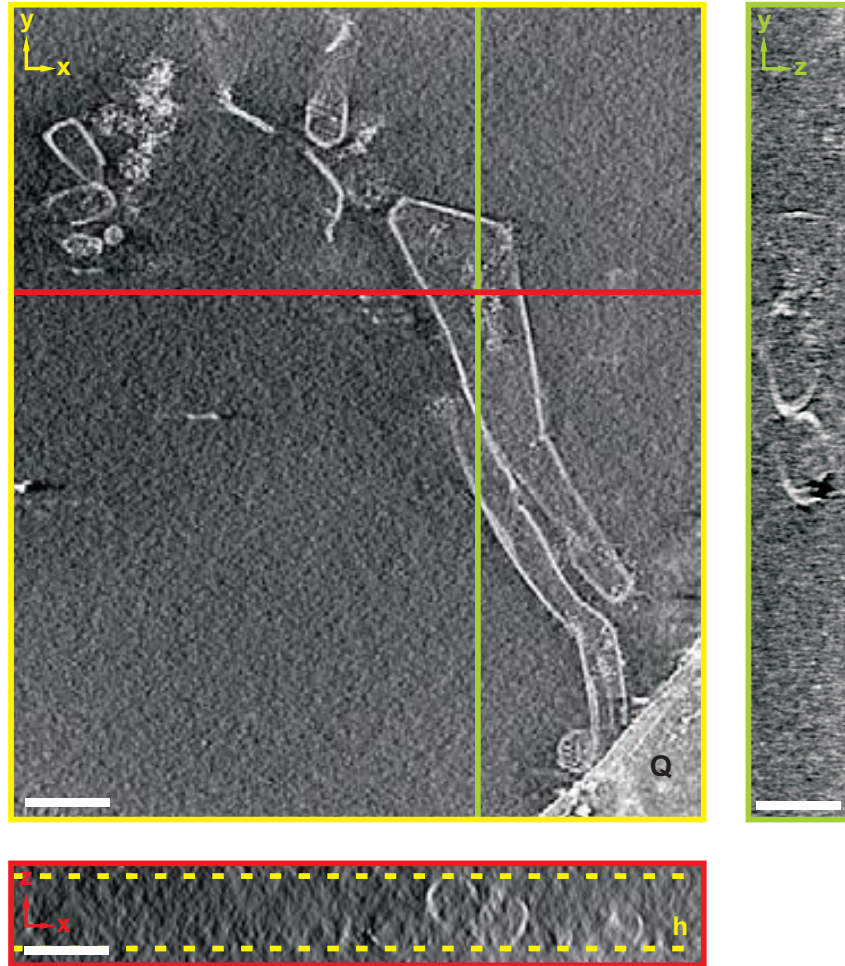


Figura 15.8: Proyecciones XY, XZ e YZ correspondientes a una vista general de un volumen de ~ 200 nm de grosor reconstruido; tomograma obtenido a $27500\times$ mediante crio-ET a 300 kV y un tamaño de píxel de 0.427 nm. Las líneas amarillas en el plano XZ limitan el grosor de hielo, h ; Q en el plano XY indica la superficie de carbono Quantifoil. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y filtrado mediante TOMOBFLOW. Barras: 100 nm.

El grosor (en el eje Z) del volumen reconstruido suele ser de 200-300 nm, muy estrecho si se tienen en cuenta las dimensiones de algunas de las placas. Debido a que durante la deposición de muestra sobre rejillas, se retira el exceso de líquido con papel absorbente, las placas ven reducido el espacio en el que se encuentran, lo que provoca cierto colapso, y esto hace que algunas presenten trayectorias complejas a lo largo del eje Z. La Figura 15.9 muestra el efecto de la compresión en la dirección del eje Z sobre una placa, cuyas paredes se ven curvadas. El efecto del *missing wedge* es visible en los planos XZ e YZ, ya que las zonas superior e inferior de la placa en la dirección Z no aparecen en la imagen.

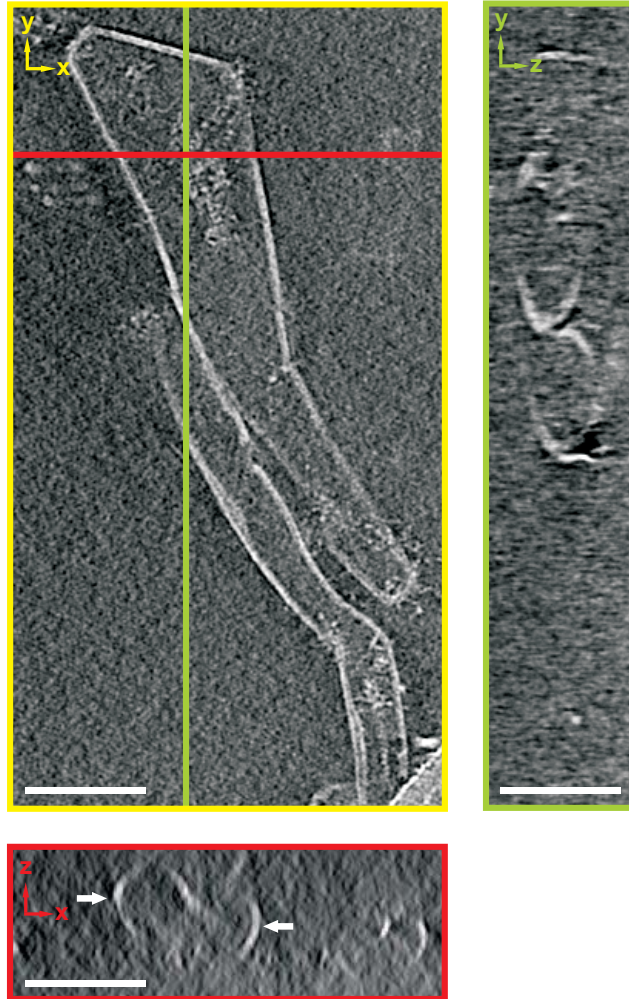


Figura 15.9: Placa de cromatina sometida a compresión debido a las dimensiones reducidas del hielo vítreo en el eje Z. Las flechas en el plano XZ señalan zonas curvas de la placa.

A lo largo de estos experimentos se han observado placas de tamaños y orientaciones muy diversas, llegando incluso a superar 1 μm de longitud en el plano XY. La mayoría de las placas analizadas son visibles como monocapas, aunque también se observan numerosas bicapas formadas por la interacción total o parcial de dos placas. Las placas individuales también muestran contactos internos que dan lugar a estructuras cilíndricas. Por último, se han observado zonas con placas parcialmente desestructuradas, así como también agregados, en los que se han visualizado pequeñas estructuras más o menos circulares con un tamaño similar al del nucleosoma. Las siguientes figuras resumen lo observado en reconstrucciones tridimensionales de placas metafásicas obtenidas sin placa de fase a una magnificación relativa de 27500 \times .

Las Figuras 15.10 y 15.11 muestran reconstrucciones de placas sencillas, acompañadas de su correspondiente segmentación.

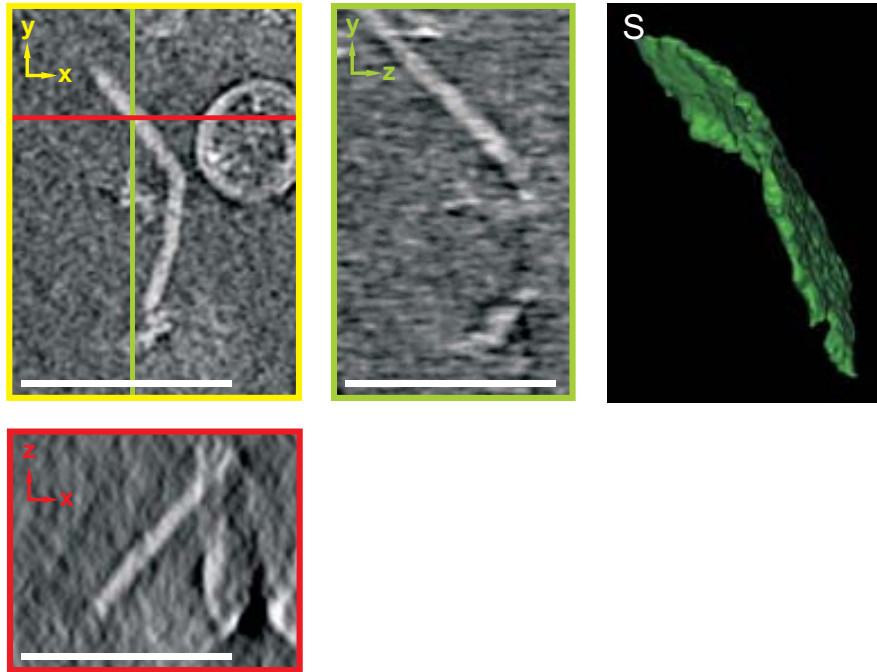


Figura 15.10: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa obtenida a partir de imágenes de crio-ET a $27500\times$. S muestra la segmentación de la placa. Para facilitar la observación, la placa segmentada ha sido ampliada y reorientada. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel de 0.427 nm. Barras: 100 nm.

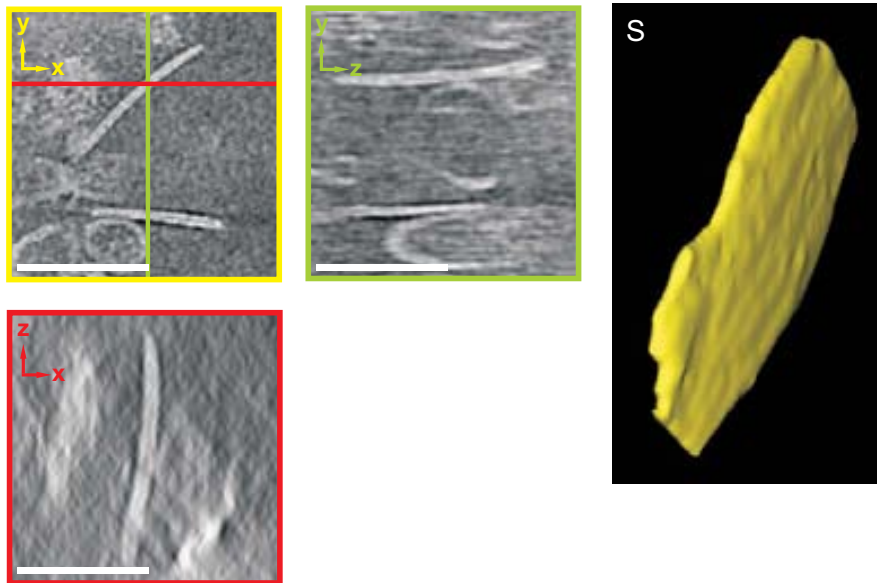


Figura 15.11: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa obtenida a partir de imágenes de crio-ET a $27500\times$. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel de 0.427 nm. Barras: 100 nm.

Se han realizado gran cantidad de medidas del grosor de las placas; el valor promedio obtenido es de 9.8 ± 1.6 nm. Los datos provienen de más de 400 medidas del grosor de placas presentes en tomogramas reconstruidos con un tamaño de píxel de 0.427 nm. También se han realizado medidas sobre reconstrucciones empleando un *pixel binning* de 4×; en este caso el valor promedio es 10.2 ± 1.6 (89 medidas). La Figura 15.12 muestra el procedimiento seguido en la determinación de grosores, así como el histograma correspondiente a estas medidas.

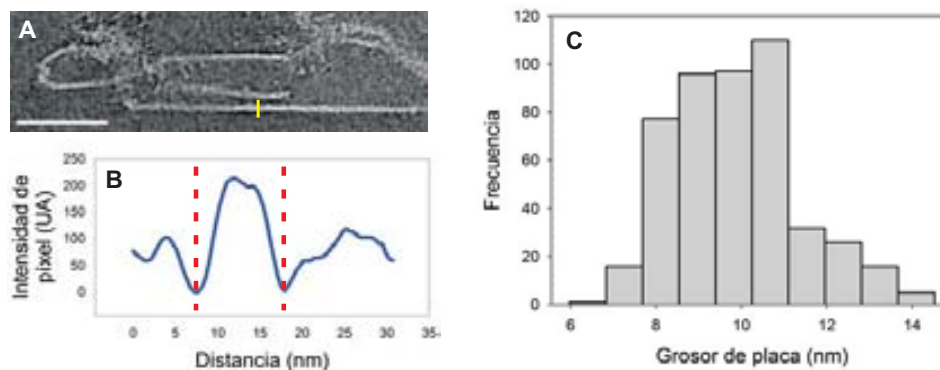


Figura 15.12: Medidas de grosor de placas de cromatina metafásica reconstruidas a partir de imágenes de crio-ET (27500×). **A** muestra una micrografía que contiene varias placas. La línea amarilla muestra la zona aproximada de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, que se muestra en el gráfico **B**; las líneas rojas delimitan el grosor de la placa (UA: unidades arbitrarias). **C** Histograma obtenido a partir de más de 400 medidas de grosores de placas. Todas las medidas se han extraído de tomogramas reconstruidos mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrados mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel de 0.427 nm. Barra: 100 nm.

Se ha observado que algunas placas pueden cerrarse sobre sí mismas adoptando formas cilíndricas; ver por ejemplo la estructura presentada en la Figura 15.13. Esta observación no es sorprendente teniendo en cuenta que las placas de cromatina presentan una elevada tendencia a incorporar nucleosomas (Milla y Daban, 2012). Además, en términos energéticos debe resultar más estable para los nucleosomas colocarse uno junto al otro en el seno de una placa, minimizando así la desestabilización debida al contacto con el medio acuoso (Daban, 2014).

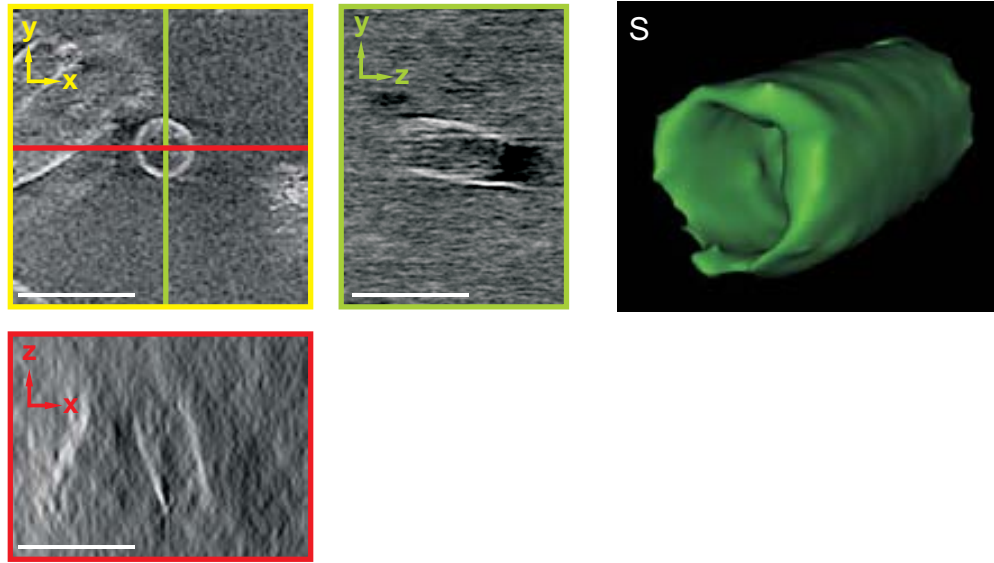


Figura 15.13: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional correspondiente a una placa cerrada sobre sí misma adoptando una forma cilíndrica. **S** muestra la segmentación del cilindro, que ha sido ampliado y reorientado. El tomograma obtenido mediante crio-ET a 27500 \times ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT realizando 20 iteraciones; se ha aplicado un *pixel binning* de 4 \times . Tamaño de píxel original: 0.427 nm. Barras: 100 nm.

También han sido comúnmente observadas en las reconstrucciones tomográficas zonas de contacto entre placas como las que se muestran en las Figuras 15.14 y 15.15.

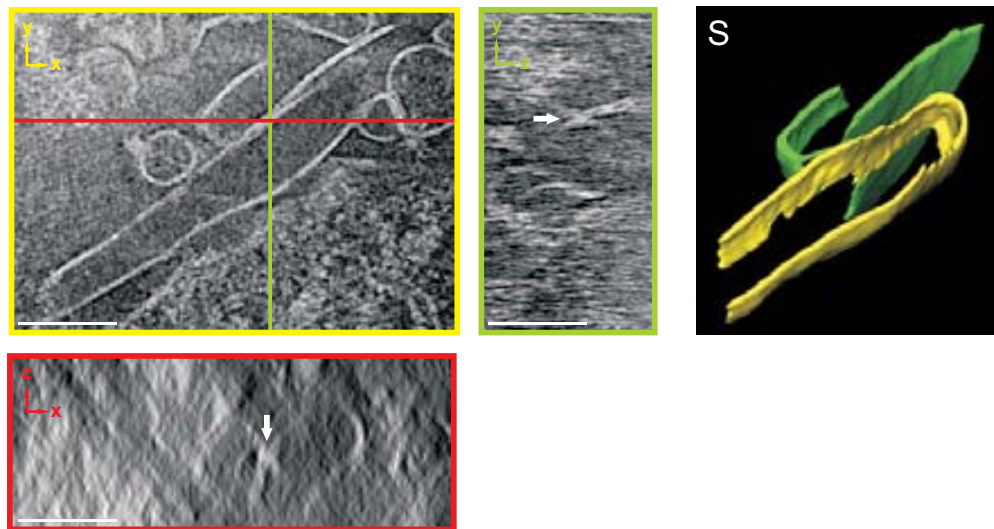


Figura 15.14: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional correspondiente a un contacto entre dos placas de cromatina. Las flechas señalan zonas de contacto. **S** muestra la segmentación de la zona. El tomograma obtenido mediante crio-ET a 27500 \times ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOFLOW. Tamaño de píxel de 0.427 nm. Barras: 100 nm.

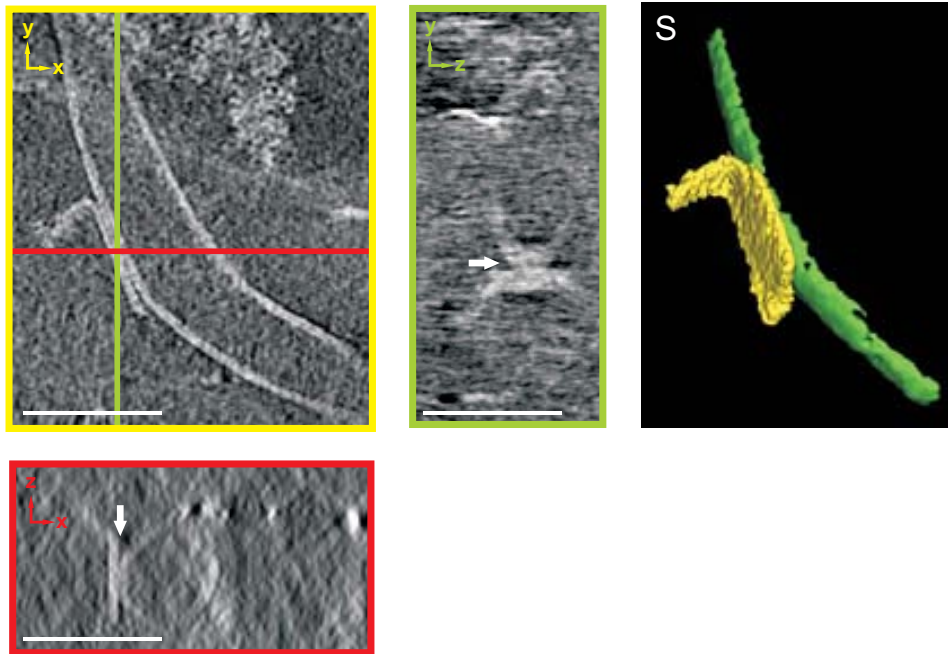


Figura 15.15: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional correspondiente a un contacto entre dos placas de cromatina. Las flechas señalan zonas de contacto. **S** muestra la segmentación de la zona, que ha sido ampliada y reorientada. El tomograma obtenido a 27500× mediante crio-ET ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel de 0.427 nm. Barras: 100 nm.

Se ha determinado también el grosor de estas bicapas presentes en los tomogramas reconstruidos; el valor promedio es de 16.0 ± 1.3 nm. Estos datos provienen de 28 medidas de contactos presentes en tomogramas reconstruidos con un tamaño de píxel de 0.427 nm. Puede observarse que el grosor del contacto entre dos placas es menor que la suma del grosor de dos placas individuales. Este resultado es coherente con la interdigitación entre nucleosomas de capas adyacentes propuesto en el modelo de las placas delgadas para el cromosoma metafásico (ver Introducción, apartado 4.4.1 y Discusión, apartado 17.2). La Figura 15.16 muestra un ejemplo de determinación del grosor de un contacto, así como también el histograma correspondiente a las medidas realizadas.

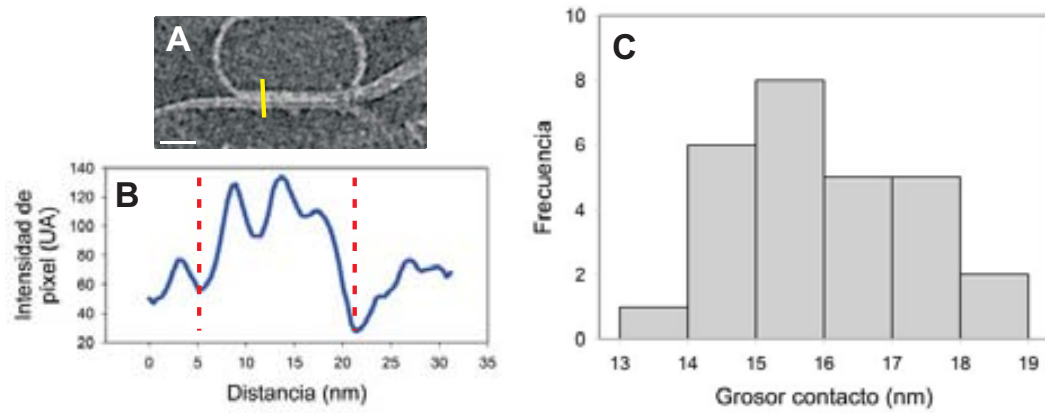


Figura 15.16: Medidas de grosor de contactos entre dos placas de cromatina metafásica. **A** muestra una sección de un tomograma con dos placas en contacto (barra: 100 nm). Tamaño de píxel de 0.427 nm. La línea amarilla muestra la zona aproximada de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, que se representa en el gráfico **B**; las líneas rojas delimitan el grosor del contacto (UA: unidades arbitrarias). **C** Histograma obtenido a partir de 28 medidas de contactos de placas. Todas las medidas se han extraído de tomogramas de crio-ET (27500 \times) reconstruidos mediante el algoritmo SIRT realizando 20 iteraciones y finalmente filtrados mediante TOMOBFLOW empleando 15 iteraciones.

En algunas de las reconstrucciones tomográficas obtenidas, se han observado grandes agregados que en el plano XY presentan líneas en su interior. A partir del estudio de las proyecciones XZ e YZ en diferentes zonas de estas estructuras, se han podido ver también líneas, lo que indica que dichas líneas son placas que tienen profundidad en el eje Z. Estas estructuras corresponden a agregados multilaminares, que posiblemente debido a los métodos preparativos pierden cohesión entre placas adyacentes, permitiendo que puedan observarse como placas individuales. Si estas láminas mantuvieran su cohesión, tal como se muestran en preparaciones deshidratadas de TEM, probablemente sería imposible discernir entre capas adyacentes. Puede verse un ejemplo de una reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar en la Figura 15.17. La Figura 15.18 muestra diversas secciones de esta misma estructura.

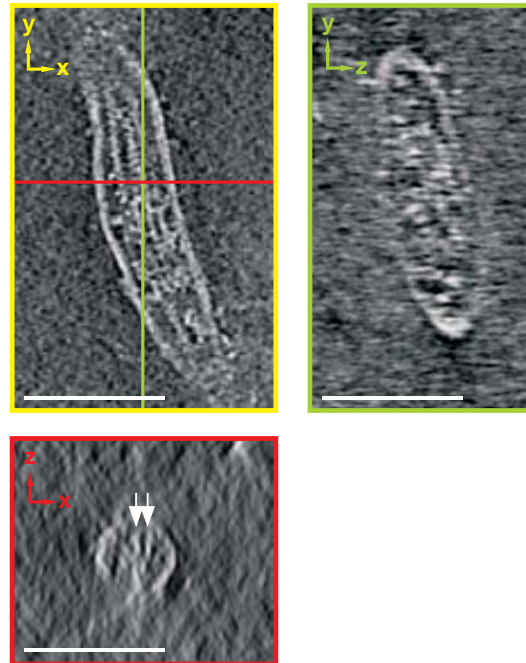


Figura 15.17: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional correspondiente a un agregado multilaminar. El tomograma obtenido mediante crio-ET a $27500\times$ ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel: 0.427 nm. Barras: 100 nm.

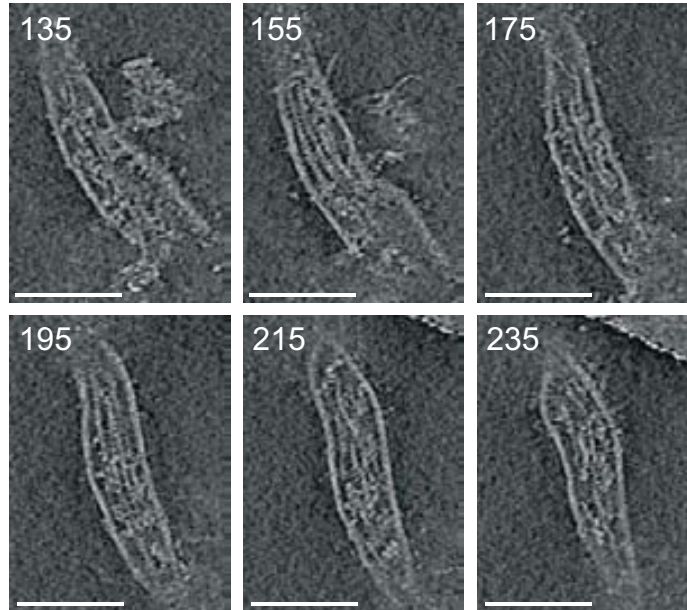


Figura 15.18: Capturas de secciones sucesivas del agregado multilaminar mostrado en la Figura 15.17. Se han obtenido imágenes cada 10 secciones, desde la sección 135 hasta la 235 (una sección equivale al grosor de un píxel). El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel: 0.427 nm. Barras: 100 nm.

Las placas externas del agregado son claramente visibles en los planos XZ e YZ; son placas que ocupan gran parte del espesor total del hielo, bien formadas y por esta razón se muestran más intensas. Las líneas internas, corresponden a placas adyacentes que han perdido cohesión entre ellas. Si se analizan en detalle estas placas internas, es posible ver una serie de pequeñas líneas perpendiculares a la dirección de la línea principal y más o menos paralelas entre ellas (ver Figura 15.18). Este interlineado presente en las placas de cromatina, no solo se ha observado en grandes agregados como el mostrado, sino que también se ha observado en gran cantidad de placas analizadas en detalle, como las que se muestran en la Figura 15.19.

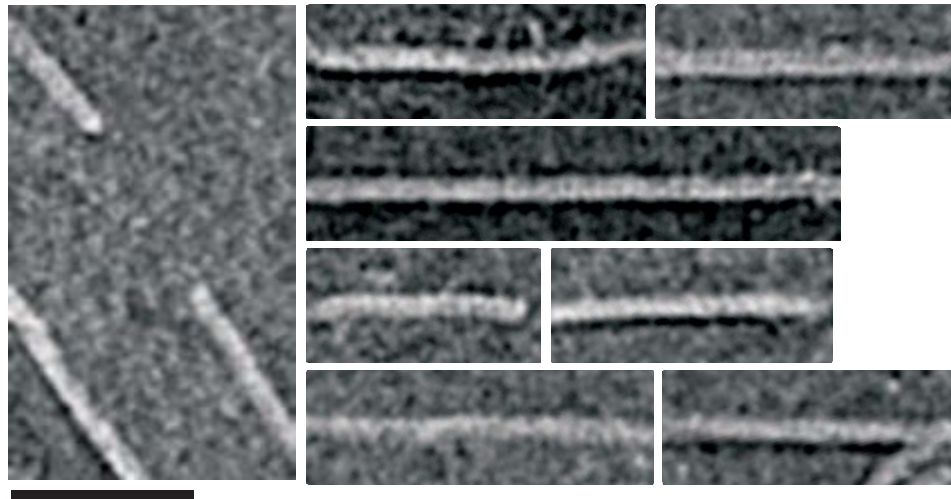


Figura 15.19: Ejemplos de ampliaciones correspondientes a reconstrucciones de placas donde se aprecia un interlineado interno. Se muestran ampliaciones donde se observan líneas transversales en el interior de las líneas de placa. Las imágenes provienen de diversos tomogramas adquiridos a $27500\times$, todos ellos reconstruidos mediante el algoritmo SIRT realizando 20 iteraciones y finalmente filtrados mediante TOMOBFLOW empleando 15 iteraciones. Tamaño de píxel: 0.427 nm. Barra: 50 nm.

Se ha determinado la distancia entre las líneas presentes en las placas; se ha obtenido un valor promedio de 5.2 ± 1.6 nm al analizar más de 700 medidas (Figura 15.20) procedentes de tomogramas reconstruidos con un valor de píxel de 0.427 Å. Estas líneas presentes en las placas han sido observadas en estudios previos de tomografía electrónica y podrían corresponder al DNA nucleosomal (Castro-Hartmann et al., 2010). La distancia entre estas líneas en muestras deshidratadas es de 4.0 ± 0.3 nm ($n=259$). La diferencia entre ambos resultados puede ser debida a la presencia o ausencia de agua en las preparaciones. El distanciado entre líneas en las placas es significativamente superior a la distancia entre las vueltas de DNA en las columnas de nucleosomas apilados de forma regular a través de sus caras laterales (~ 2.8 nm; Finch et al., 1977; Uberbacher y Bunick, 1985; Leforestier et al., 1999). Una posible explicación es que la orientación irregular de los nucleosomas provoca un aumento de la distancia entre líneas.

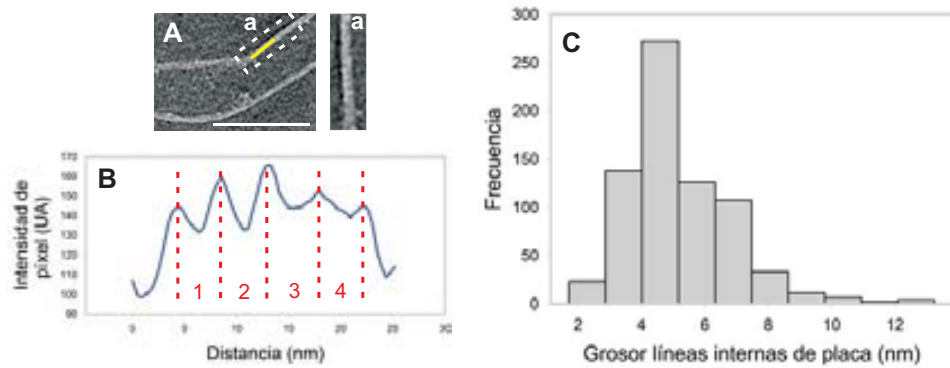


Figura 15.20: Distancia entre las líneas internas encontradas en las placas de cromatina. **A** muestra una sección de una reconstrucción tridimensional de una placa. La región **a** de la placa presenta líneas internas (barra: 100 nm; tamaño de píxel de 0.427 nm); la línea amarilla muestra la zona aproximada de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, representada en el gráfico **B**. La distancia entre líneas es de: (1) 4.3, (2) 4.7, (3) 4.7 y (4) 4.3 nm. (UA: unidades arbitrarias). **C** Histograma obtenido a partir de más de 700 medidas de líneas internas en placas. Todas las medidas se han extraído de tomogramas obtenidos a 27500× reconstruidos mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrados mediante TOMOBFLOW.

En ciertas ocasiones, se han observado agregados de tamaños diversos que parecen estar desestructurados, como el que se muestra en la Figura 15.21. Estos agregados no presentan estructura clara cuando se observan en los planos XZ e YZ. En el plano XY, dentro de estos agregados, se han observado zonas con pequeñas estructuras circulares que presentan dimensiones típicas de nucleosomas en diferentes orientaciones. Pueden verse algunos ejemplos en la Figura 15.22. Además, es posible observar en algunas de estas partículas, dos líneas de intensidad, que sugieren nuevamente que se trata de nucleosomas y las líneas que observamos corresponden a las vueltas de DNA de la partícula núcleo.

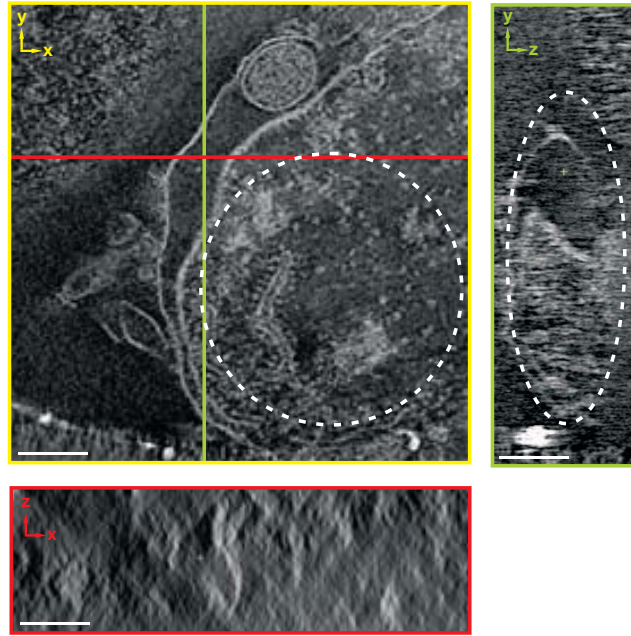


Figura 15.21: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de un gran agregado desestructurado. Enmarcada en blanco se encuentra la zona desestructurada. El tomograma obtenido a $27500\times$, ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel: 0.427 nm. Barras: 200 nm.

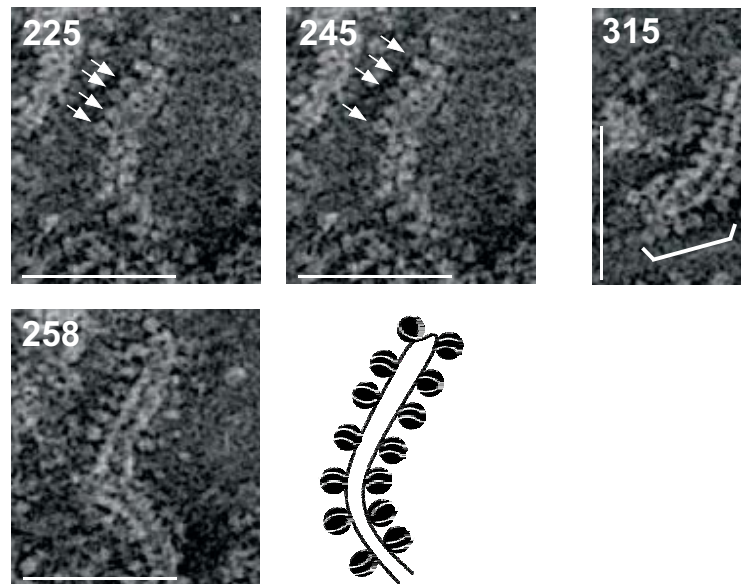


Figura 15.22: Capturas de secciones sucesivas del agregado desestructurado mostrado en la Figura 15.21. Las secciones 225, 245 y 258 corresponden a la misma zona, y se acompañan de una figura esquemática. Las flechas señalan partículas con tamaño de nucleosoma observadas en zonas desestructuradas. La sección 315 corresponde a otra zona en el mismo tomograma. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo SIRT y finalmente filtrado mediante TOMOBFLOW. Tamaño de píxel: 0.427 nm. Barras: 100 nm.

15.2.2. Reconstrucciones con placa de fase Volta a una magnificación de 33000x

Se realizó una nueva serie de adquisiciones empleando el microscopio Titan Krios (FEI) a 33000 \times y complementado con la placa de fase Volta (Danev et al., 2014). En estas condiciones se conseguía aumentar considerablemente el contraste de las imágenes. En la Figura 15.23 puede verse la comparación entre tomogramas reconstruidos a partir de adquisiciones sin y con placa de fase Volta. Las placas presentes en la imagen B presentan un mayor contraste con respecto al fondo, además de mejor resolución.

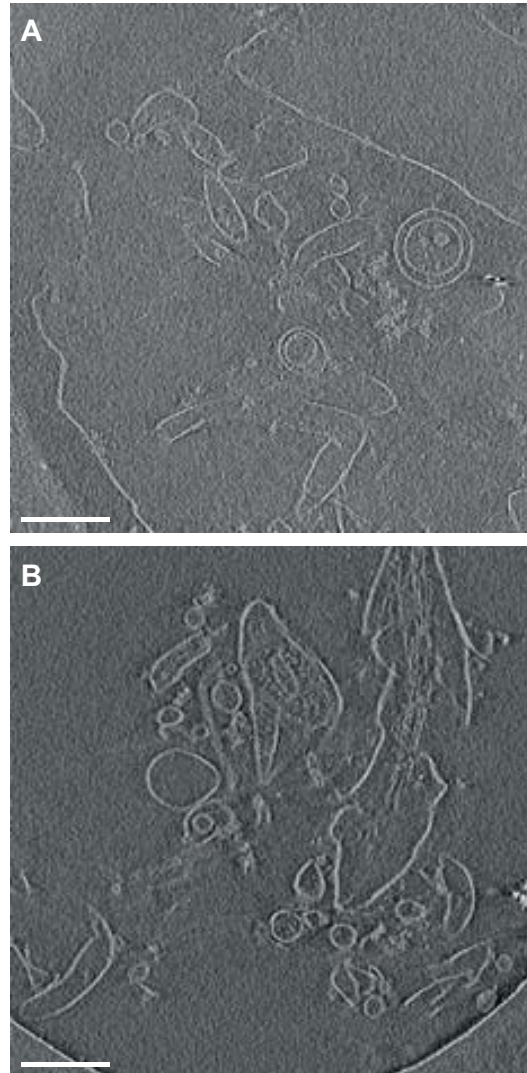


Figura 15.23: Comparación de dos secciones XY generales de tomogramas adquiridos con y sin placa de fase Volta. A y B son tomogramas adquiridos respectivamente, sin y con placa de fase Volta. Ambos tomogramas han sido reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4 \times . Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 200 nm.

La Figura 15.24 muestra vistas generales XY, XZ e YZ de un tomograma en el que puede verse el grosor de hielo (acotado por líneas amarillas), de aproximadamente 300 nm. También puede verse el film de carbono Quantifoil (indicado mediante líneas blancas, Q). En este tomograma se pueden ver ejemplos de todas las estructuras que se observarán en el resto de reconstrucciones. Pueden verse agregados circulares de unos 30 nm en forma de solenoides interdigitados (X), varias placas (placa), algunas de ellas con formas complejas, contactos entre ellas (c) e incluso zonas multilaminares (multi). También se observan agregados completamente desestructurados, aparentemente formados por nucleosomas con orientaciones al azar (ncl).

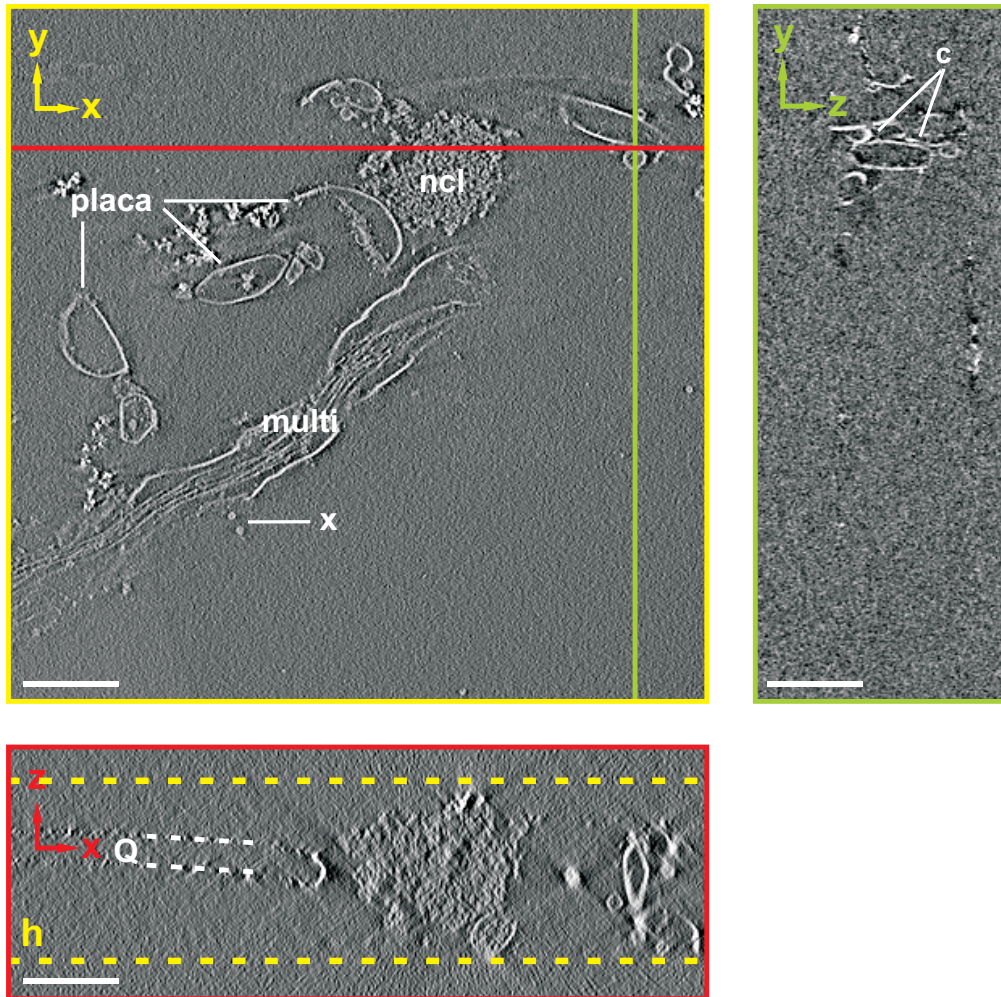


Figura 15.24: Proyecciones XY, XZ e YZ correspondientes a una vista general de un volumen de ~ 300 nm de grosor reconstruido; tomograma obtenido mediante crio-ET a 300 kV y $33000\times$. Las líneas amarillas en el plano XZ limitan el grosor de hielo, indicado con la letra **h**. Las líneas blancas **Q** indican la lámina de carbono Quantifoil. En esta vista pueden observarse diversas **placas**, contactos (**c**), agregados desestructurados con nucleosomas (**ncl**), estructuras circulares de unos 30 nm (**x**) y una zona multilaminar (**multi**). El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 200 nm.

A lo largo de estos experimentos se han observado gran cantidad de placas con tamaño, orientación y forma muy diversa. Se han reconstruido, desde pequeñas placas de pocos cientos de nm, hasta grandes placas o agregados multilaminares de hasta $2\ \mu\text{m}$. El grosor del hielo oscila entre 200-400 nm. Se han encontrado placas cuya extensión en el eje Z es considerablemente más grande. Las placas adoptan formas muy diversas, algunas de ellas complejas, e incluso se rasgan en las zonas de tensión. Ocasionalmente, se han observado pequeños agregados de cromatina en forma de solenoide interdigitado. También se han encontrado numerosas zonas de contacto entre placas, ya sea entre placas distintas, o en una misma placa, dando lugar, en este último caso, a formas cilíndricas. Otra estructura común en estas reconstrucciones han sido los agregados multilaminares, a menudo de tamaño considerable tanto en extensión como en grosor. Además, la incorporación de la placa de fase Volta ha permitido aumentar el contraste en reconstrucciones de placas desestructuradas, facilitando la adquisición de imágenes de calidad de zonas con nucleosomas.

Ocasionalmente, han podido observarse en las reconstrucciones tridimensionales realizadas, pequeños agregados circulares. Estas estructuras han sido previamente descritas en diversos trabajos realizados en nuestro laboratorio como fibras muy cortas de cromatina que adoptan un plegamiento en forma solenoidal, que permite la interdigitación de nucleosomas entre vueltas sucesivas (Bartolomé et al., 1994; Bartolomé et al., 1995; Caño, 2007; Caño et al., 2006). También se han detectado estas estructuras en micrografías de TEM mostradas en esta tesis (Figura 14.3). La Figura 15.25 muestra algunos ejemplos de estas estructuras circulares observadas en las reconstrucciones tridimensionales. Ciertamente, el aumento del contraste permite detectar la presencia de líneas internas más o menos radiales que podrían corresponder a DNA enrollado en torno a partículas núcleo de los nucleosomas que forman la estructura.

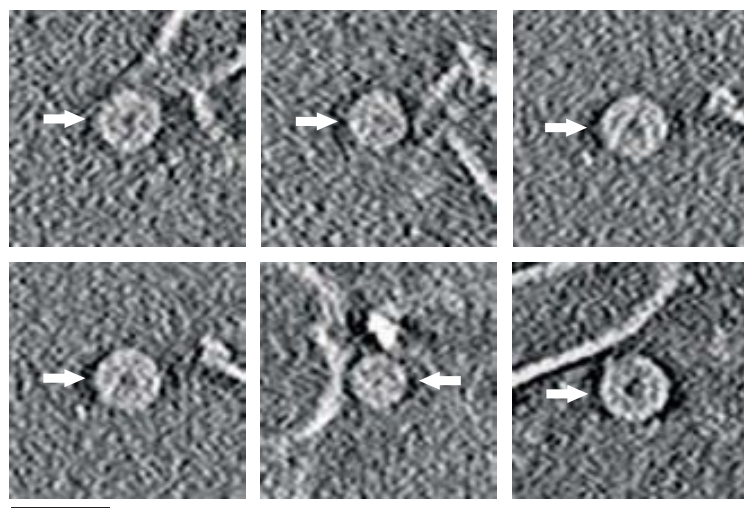


Figura 15.25: Secciones de diversos tomogramas que muestran ejemplos de solenoides interdigitados encontrados en reconstrucciones tridimensionales. Las imágenes provienen de tomogramas obtenidos mediante crio-ET a $33000\times$ reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 50 nm.

Las reconstrucciones de la Figura 15.26 muestran que este tipo de estructuras circulares pueden ser absorbidas por placas, lo que sugiere que la cromatina posee una gran capacidad autoasociativa.

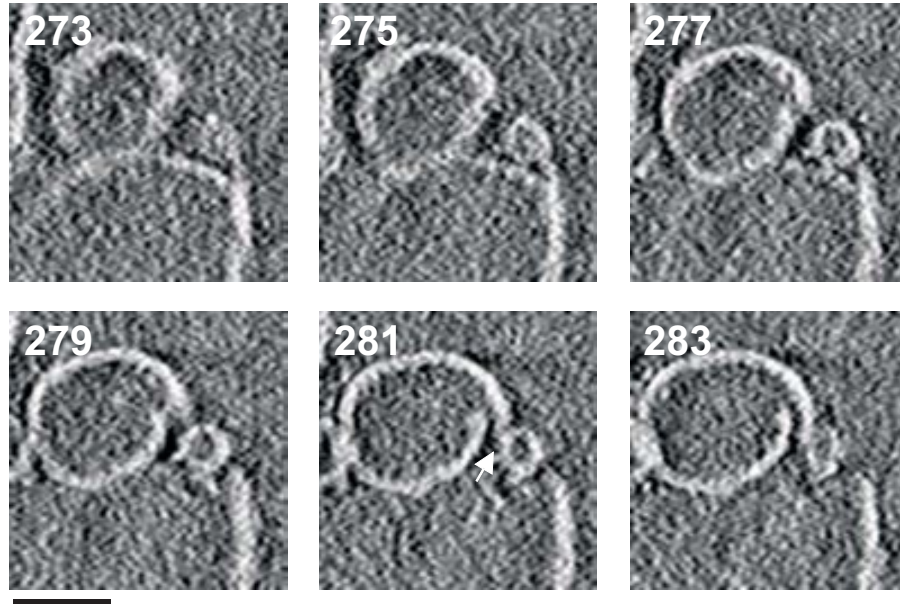


Figura 15.26: Ejemplo de solenoide interdigitado incorporado parcialmente a una placa de cromatina. Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de crio-ET a $33000\times$. Reconstrucción mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 50 nm.

Se han realizado medidas de las dimensiones de estas estructuras circulares (ver Figura 15.27). Se ha encontrado un diámetro promedio de 32.1 ± 4.0 nm (177 medidas) y una altura de 29.9 ± 3.0 nm (168 medidas) en medidas procedentes de tomogramas reconstruidos a partir de imágenes adquiridas con placa de fase Volta. En las reconstrucciones de tomogramas obtenidos sin placa de fase, se ha encontrado un diámetro promedio de 26.4 ± 4.0 nm (34 medidas) y una altura de 22.0 ± 2.8 nm (34 medidas). En estudios previos acerca de la estructura de estos agregados circulares de cromatina mediante TEM, se encontró que poseían un diámetro de 33 nm aproximadamente, independientemente del número de nucleosomas que formaran los agregados, mientras que la altura aumentaba en función del número de nucleosomas (Bartolomé et al., 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo están en consonancia con estos resultados anteriores. El hecho de que presenten una altura pequeña sugiere que esta estructura resulta estable para filamentos cortos y aislados de cromatina. Por otra parte, el hecho de que se trate de una estructura esporádica y que se haya observado su incorporación a placas parece indicar que, en condiciones de elevada concentración de cromatina, la estructura dominante es la lámina.

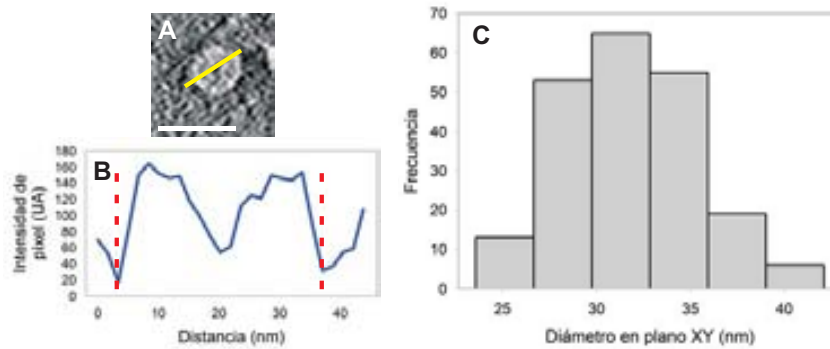


Figura 15.27: Tamaño de los agregados de cromatina en forma de solenoide interdigitado encontrados en reconstrucciones obtenidas a partir de tomogramas adquiridos con placa de fase Volta. **A** muestra una sección de un tomograma en la que se observa un solenoide interdigitado. La línea amarilla muestra la zona aproximada de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, que se muestra en el gráfico **B**; las líneas rojas delimitan el diámetro del agregado (UA: unidades arbitrarias). **C** Histograma obtenido a partir de 177 medidas de partículas. Las medidas se han extraído de tomogramas reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.427 nm. Barra: 50 nm.

Las reconstrucciones tridimensionales analizadas muestran gran cantidad de placas individuales de cromatina; algunas sencillas y otras con formas complejas muy variables a lo largo de las secciones del volumen reconstruido. En estos casos es de enorme valor obtener la segmentación de la zona, ya que ayuda al observador a visualizar la imagen tridimensional. Las Figuras 15.28-15.34 muestran reconstrucciones de placas de cromatina de cromosomas metafásicos acompañadas de las correspondientes segmentaciones.

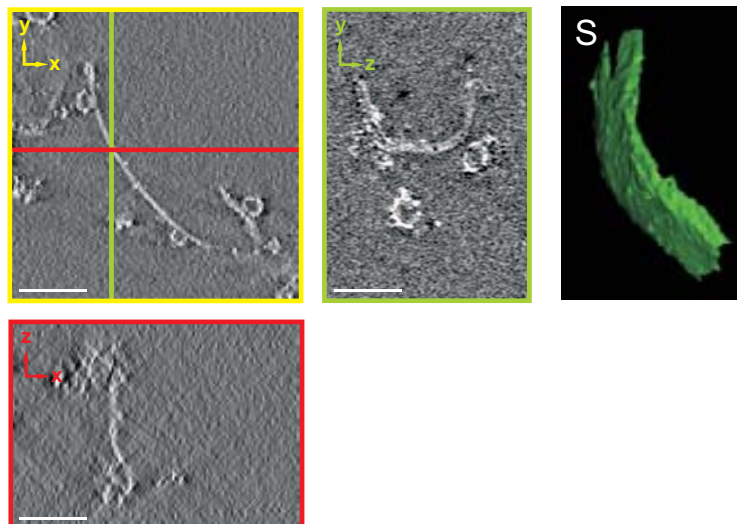


Figura 15.28: Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina. **S** muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 300 nm; la placa ocupa prácticamente todo el grosor. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

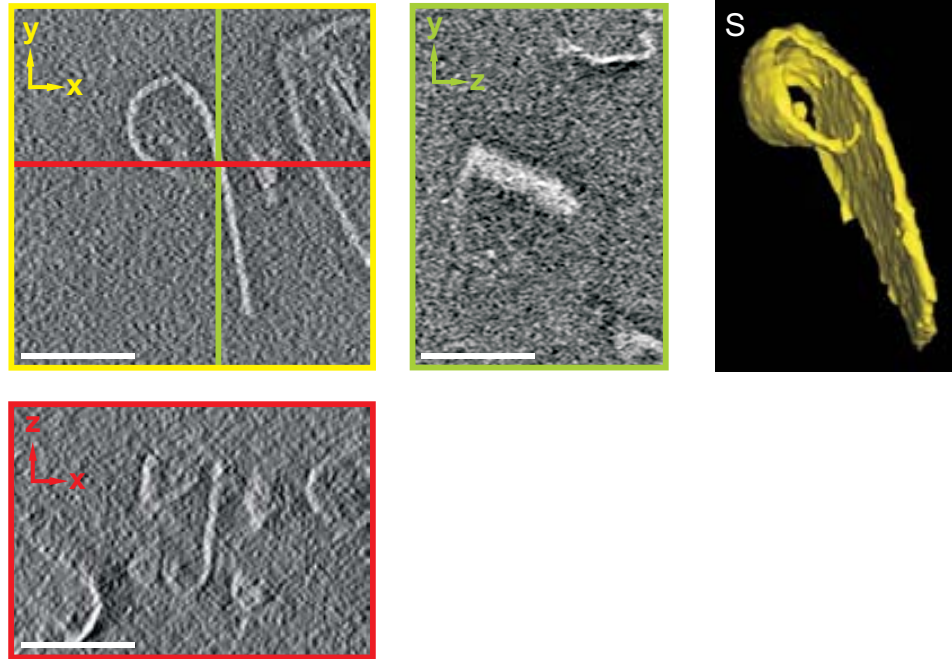


Figura 15.29: Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina curvada. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 320 nm; la placa tiene ~ 130 nm en la dirección Z. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

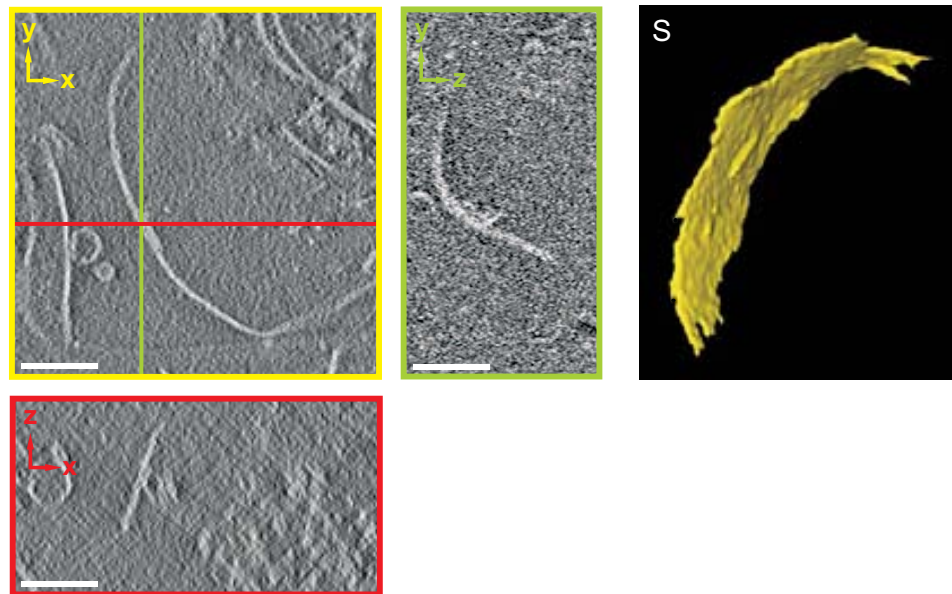


Figura 15.30: Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 400 nm. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

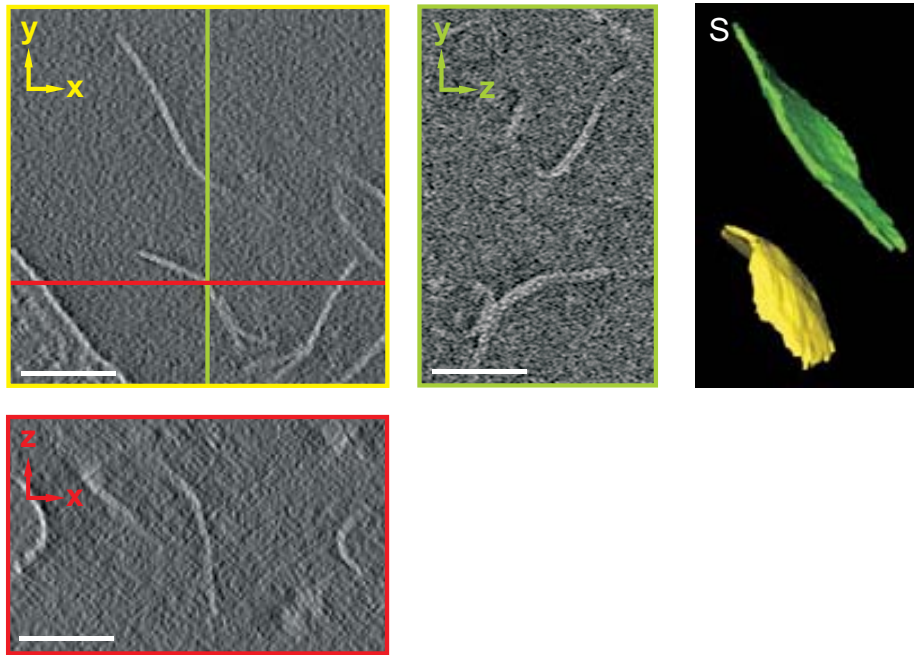


Figura 15.31: Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de dos placas de cromatina. **S** muestra la segmentación de ambas placas, que han sido ampliadas y reorientadas. El grosor del hielo es de ~ 230 nm. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

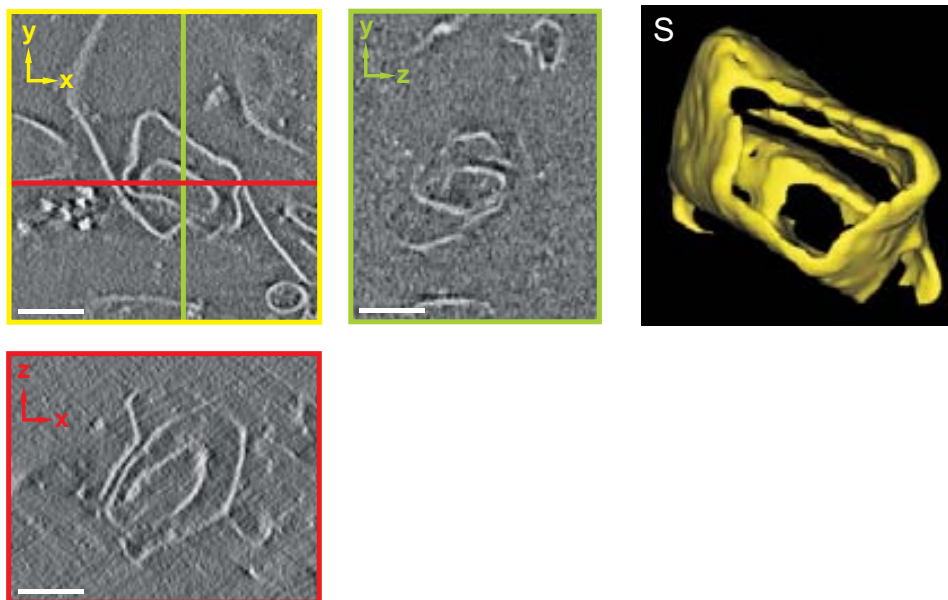


Figura 15.32: Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma compleja. **S** muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 250 nm; la placa se extiende a lo largo de todo el grosor. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

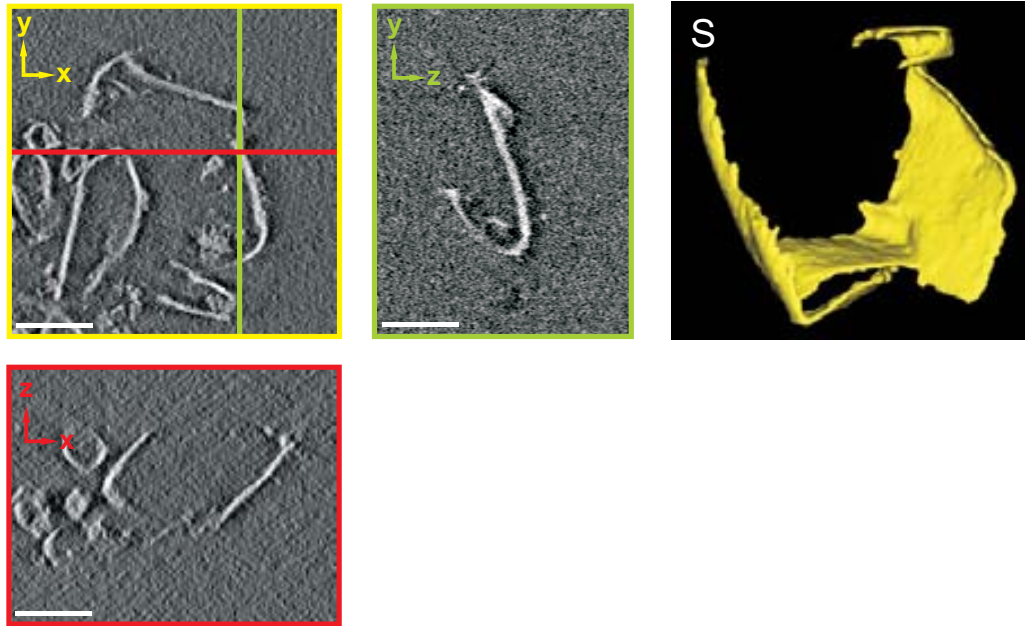


Figura 15.33: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma compleja. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 200 nm; la placa ocupa prácticamente la totalidad del grosor de hielo. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4 \times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

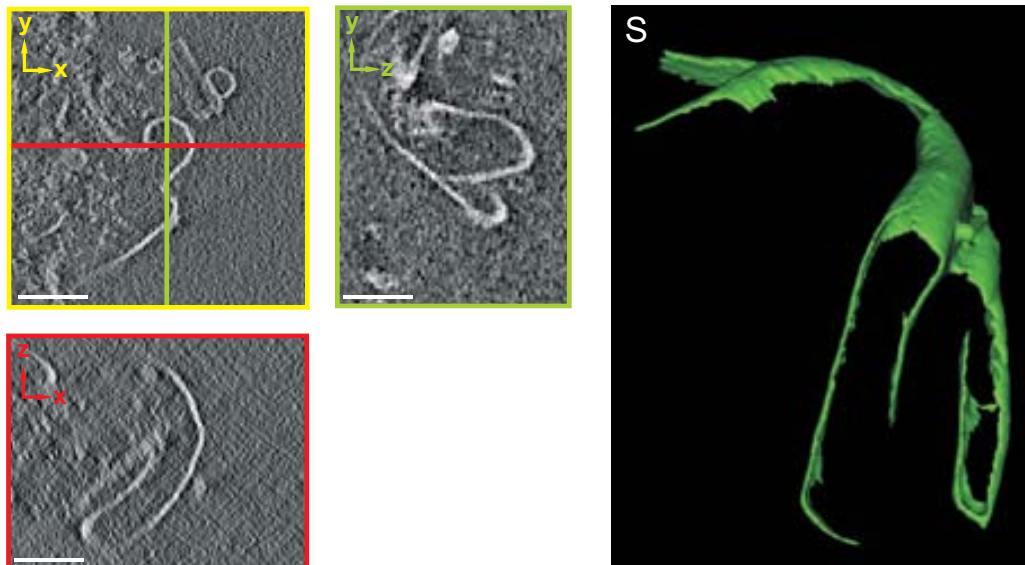


Figura 15.34: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma compleja. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 400 nm, la placa se extiende a lo largo de todo el grosor. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4 \times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

Se han realizado gran cantidad de medidas del espesor de las placas reconstruidas a partir de imágenes de crio-ET adquiridas en presencia de la placa de fase Volta. Se han obtenido más de 400 medidas de placas presentes en tomogramas reconstruidos con un *pixel binning* de $4\times$. El valor promedio es 10.9 ± 1.1 nm. También se han realizado medidas sobre las reconstrucciones que fueron obtenidas sin emplear la placa de fase Volta. En este caso se ha obtenido un valor promedio para el espesor de 10.8 ± 0.8 nm (39 medidas). La Figura 15.35 muestra un ejemplo de la determinación del grosor de una placa, así como el histograma correspondiente a las medidas realizadas.

El grosor de las placas en estas reconstrucciones es similar al determinado a partir de tomogramas adquiridos a $27000\times$ sin placa de fase Volta (9.8 ± 1.6 nm, $n > 400$) y es significativamente superior al determinado previamente mediante TEM (7.4 ± 2.5 nm, $n = 77$), AFM (4.0 ± 0.9 nm, $n = 100$) y tomografía electrónica de muestras deshidratadas y platinadas (7.8 ± 0.5 nm, $n = 18$) (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010). Posiblemente, la cantidad de cromatina que rodea las placas (sobre carbono o mica) en preparaciones de TEM y AFM provoca que el grosor detectado sea menor al que realmente presentan las placas.

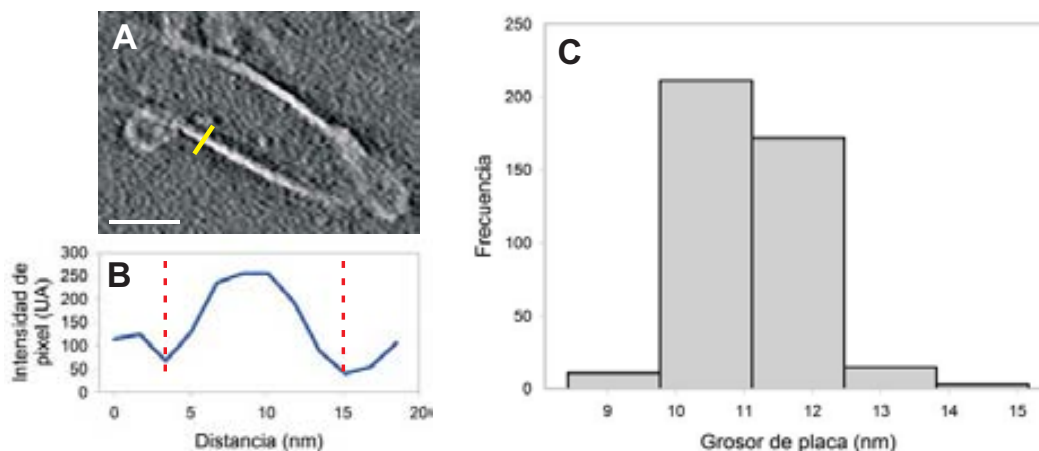


Figura 15.35: Medidas de grosor de placas de cromatina metafásica reconstruidas a partir de criotomogramas adquiridos utilizando placa de fase Volta. A muestra una micrografía que contiene una placa. La línea amarilla muestra la zona aproximada de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, que se muestra en el gráfico B; las líneas rojas delimitan el grosor de la placa (UA: unidades arbitrarias). C Histograma obtenido a partir de más de 400 medidas. Todas las medidas se han extraído de tomogramas reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.427 nm. Barra: 50 nm.

Muchas de las placas estudiadas presentan contactos internos entre diferentes zonas de una misma placa. Estos contactos, cuando se producen entre bordes de placas, provocan que las placas se cierren sobre sí mismas, dando lugar a zonas cilíndricas de diversos tamaños. La Figura 15.36 muestra un ejemplo de una placa con forma de espiral, la zona superior de la cual se cierra sobre sí misma generando un pequeño cilindro. Las Figuras 15.37-15.40 muestran ejemplos de placas cerradas sobre sí mismas de formas diversas. Algunas de estas estructuras podrían estar com-

pletamente cerradas, pero el efecto del “missing wedge” no permite asegurar esta posibilidad.

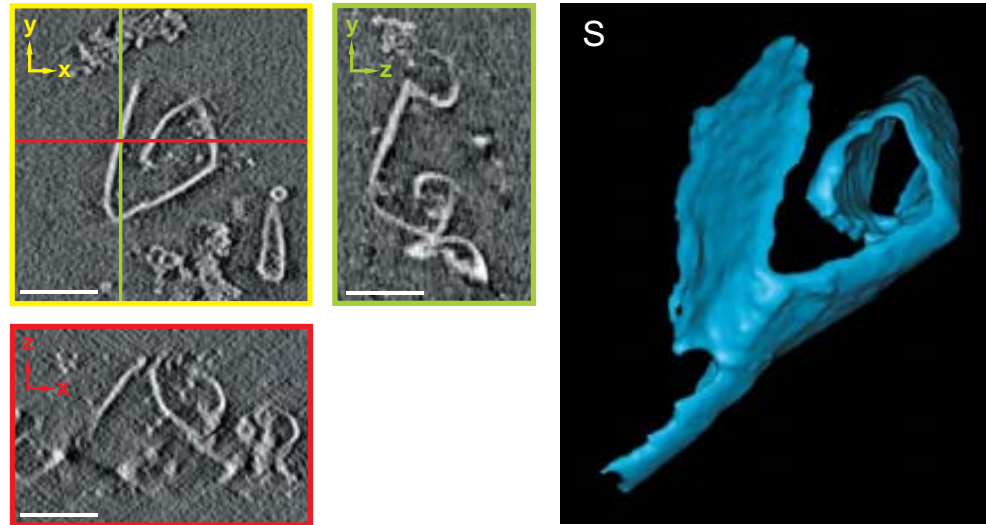


Figura 15.36: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma de espiral. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 200 nm. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

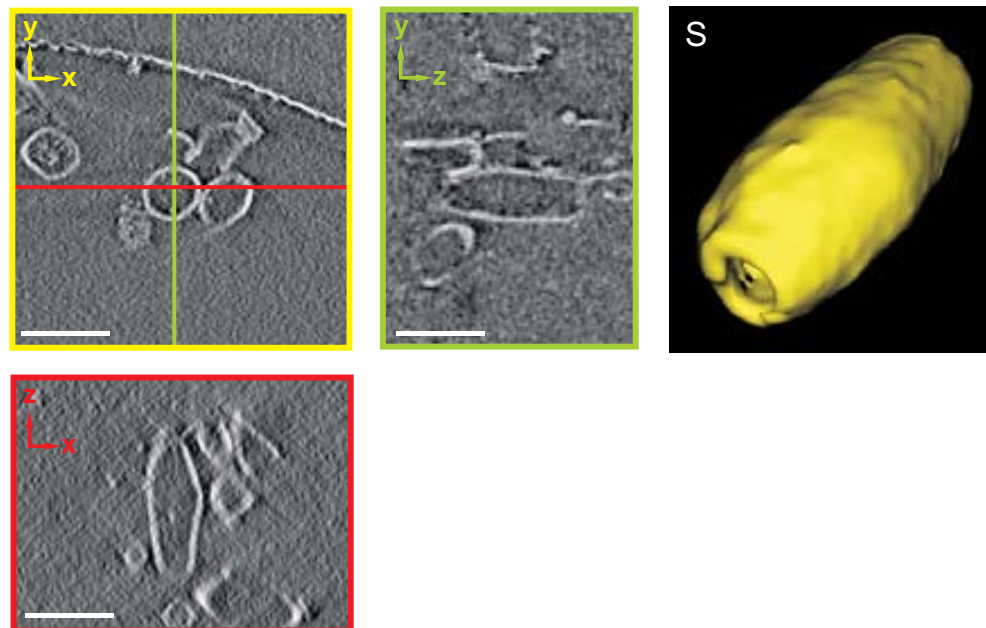


Figura 15.37: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma cilíndrica. S muestra la segmentación de la placa, que ha sido ampliada y reorientada. El grosor del hielo es de ~ 300 nm. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

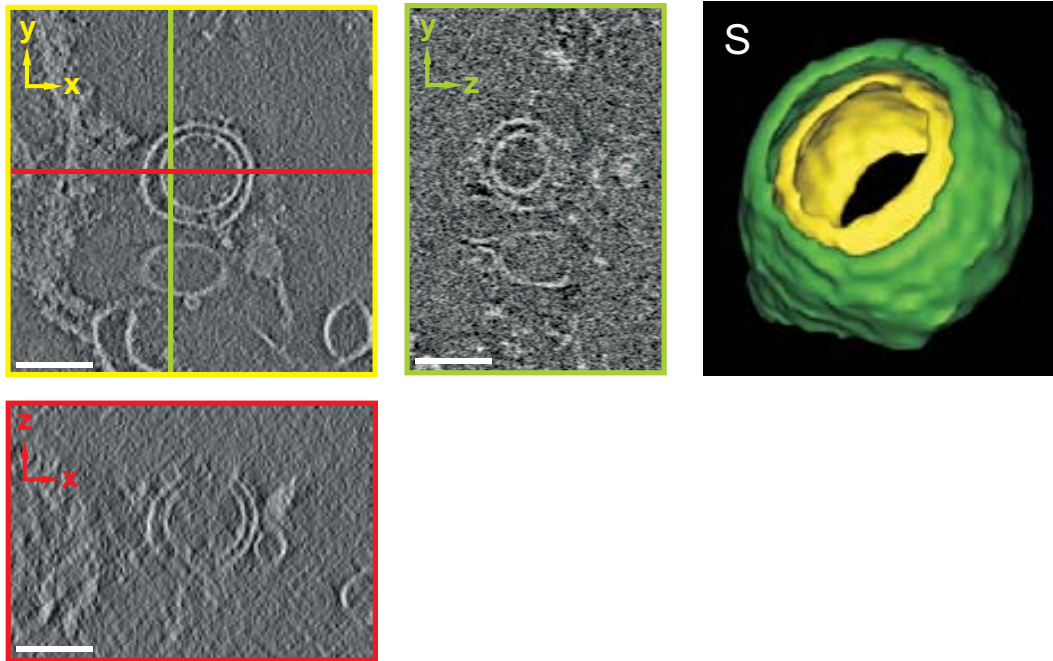


Figura 15.38: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de dos placas de cromatina con forma cilíndrica. S muestra la segmentación de las secciones 1-50 de las 85 en las que se extienden las placas, que han sido ampliadas y reorientadas. El grosor del hielo es de ~ 300 nm. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4 \times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

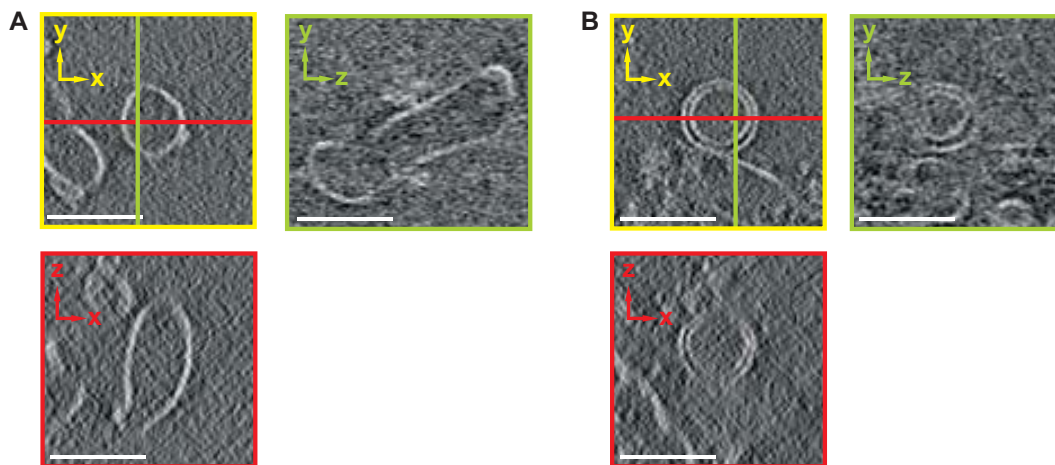


Figura 15.39: Reconstrucciones tridimensionales de dos placas cerradas sobre sí mismas que adoptan diversas formas. A Proyecciones XY, XZ e YZ de una placa cerrada sobre sí mismas adoptando forma cilíndrica. **B** Proyecciones XY, XZ e YZ de dos placas concéntricas cerradas sobre sí mismas adoptando forma esférica. Los tomogramas han sido reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4 \times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

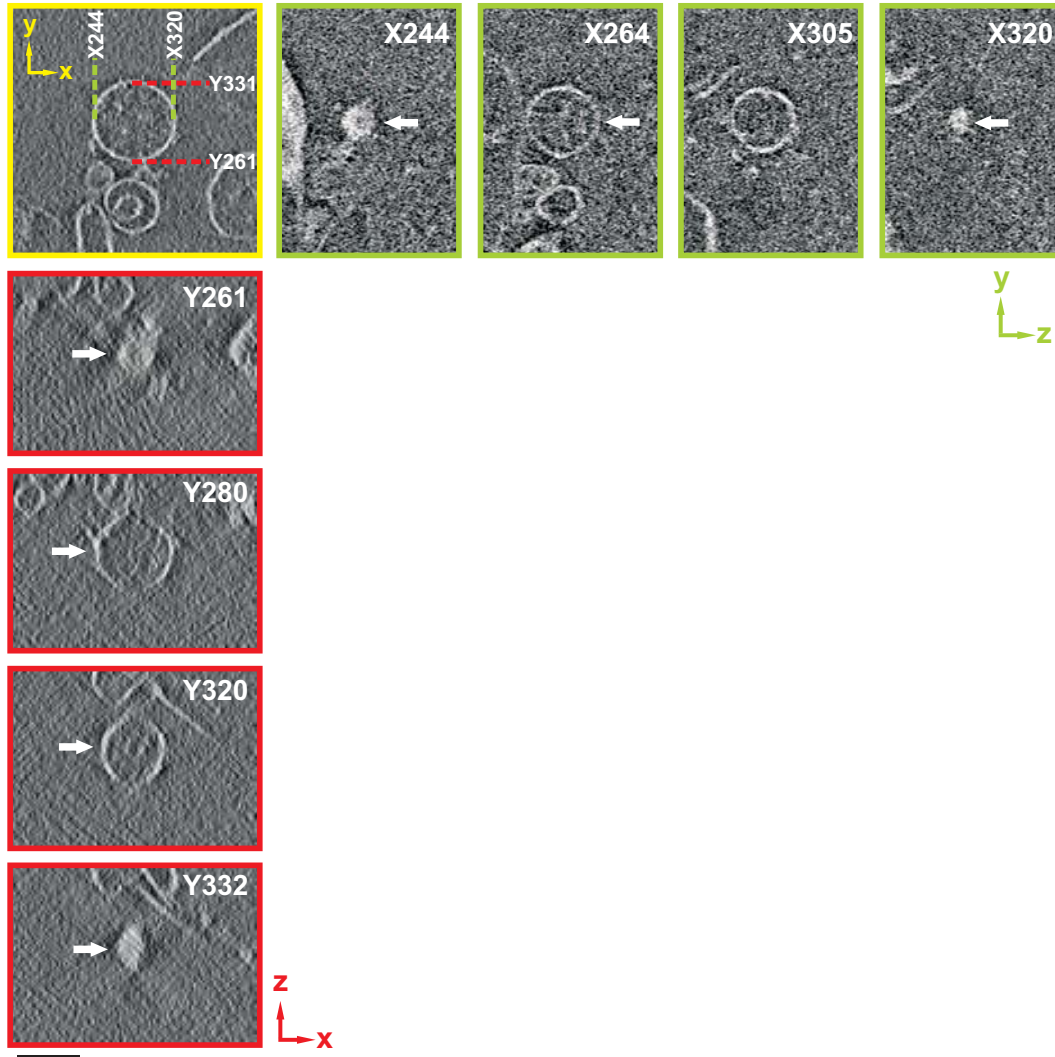


Figura 15.40: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina cerrada sobre sí misma. X244-X320 e Y261-Y332 corresponden a secciones a lo largo de los ejes X e Y, respectivamente. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

No es de extrañar que se encuentren placas cerradas en nuestras reconstrucciones. En experimentos de autoasociación se ha observado que las placas de cromatina depositadas sobre una superficie de carbono, son capaces de absorber fragmentos de cromatina próximos a sus bordes (Milla y Daban, 2012). Teniendo en cuenta que en experimentos de crio-ET, antes de que se produzca la vitrificación, las placas se encuentran suspendidas libremente en medio acuoso, es posible que acaben formando estructuras como las que se han mostrado anteriormente, de forma que se minimice el contacto de los nucleosomas con el solvente.

También se han observado numerosas zonas de contacto lateral entre placas, que dan lugar a bicapas como las que se muestran en las Figuras 15.41-15.47. Algunos de estos contactos se muestran acompañados de la correspondiente zona segmentada. Estas interacciones laterales también reducen el contacto de los nucleosomas con el solvente.

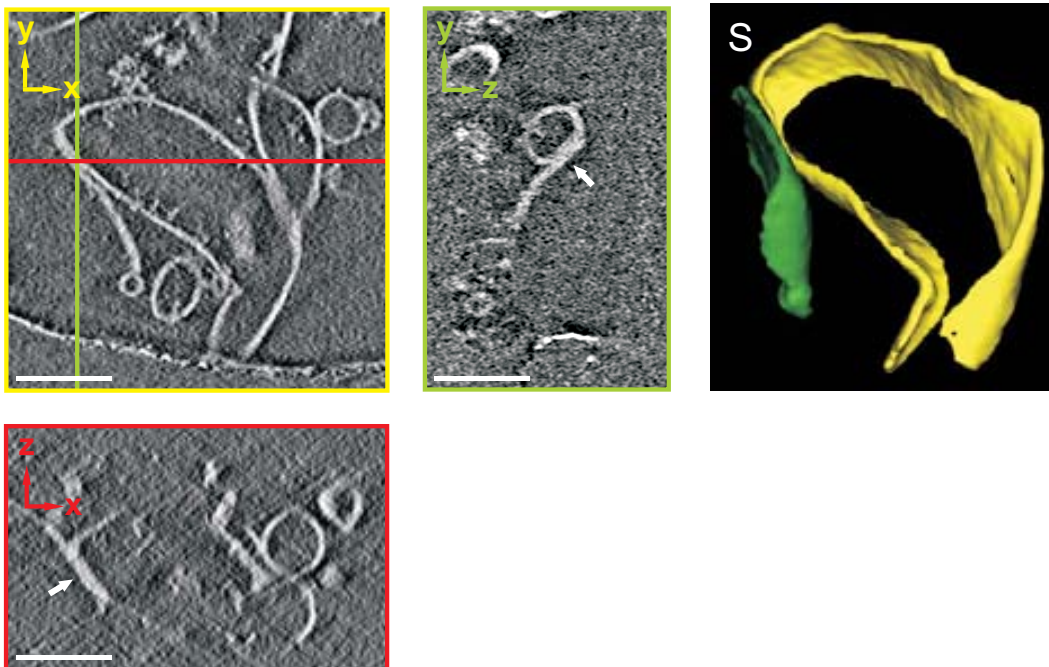


Figura 15.41: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional del contacto entre dos placas de cromatina. S muestra la segmentación de ambas placas, que han sido ampliadas y reorientadas. El grosor del hielo es de ~ 200 nm. Las flechas señalan las zonas de contacto lateral en las proyecciones XZ e YZ. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

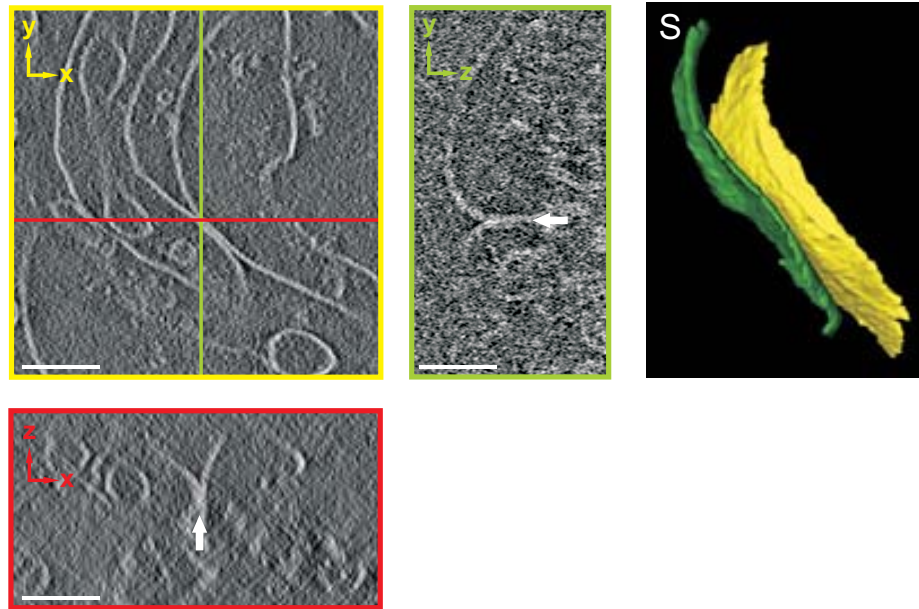


Figura 15.42: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional del contacto entre dos placas de cromatina. S muestra la segmentación de ambas placas, que han sido ampliadas y reorientadas. El grosor del hielo es de ~ 400 nm. Las flechas señalan zonas de contacto lateral en las proyecciones XZ e YZ. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

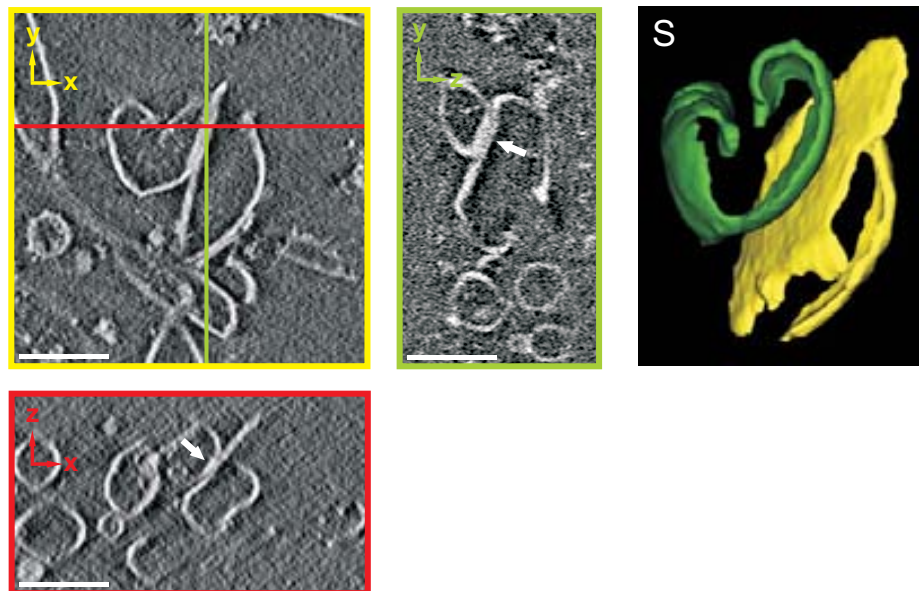


Figura 15.43: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional del contacto entre dos placas de cromatina. S muestra la segmentación de ambas placas, que han sido ampliadas y reorientadas. El grosor del hielo es de ~ 200 nm. Las flechas señalan zonas de contacto lateral en las proyecciones XZ e YZ. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

De los contactos estudiados, algunos se prolongan durante un número importante de secciones (ver por ejemplo el contacto de la Figura 15.42, que se prolonga ~ 50 nm). Otros se extienden escasas secciones a lo largo del eje Z, por lo que deben implicar pocos nucleosomas. Este es el caso de los ejemplos de la Figura 15.44, donde el contacto a se prolonga únicamente a lo largo de 9 secciones (~ 15 nm) y el contacto b lo hace a lo largo de 15 secciones (~ 25 nm).

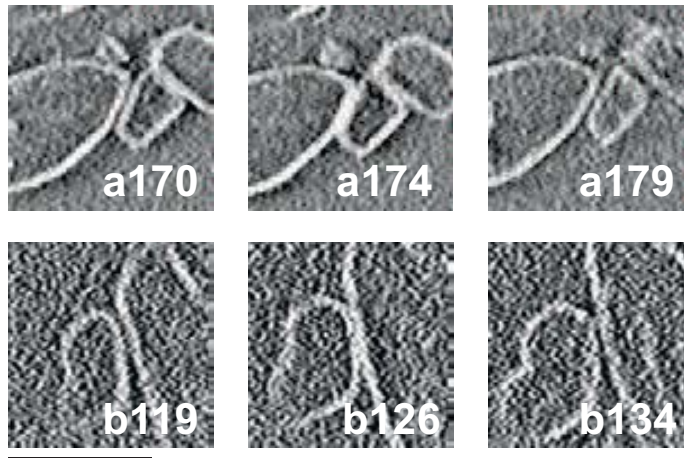


Figura 15.44: Seguimiento de dos contactos entre placas de cromatina a lo largo de diversas secciones de un volumen reconstruido a partir de un crio-tomograma obtenido a $33000\times$. a170-a179 son secciones de una misma zona de contacto y b119-b134 pertenecen a otra zona de contacto. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 50 nm.

Las siguientes figuras muestran algunos ejemplos más de contactos entre placas encontrados a lo largo del análisis de todas las reconstrucciones realizadas.

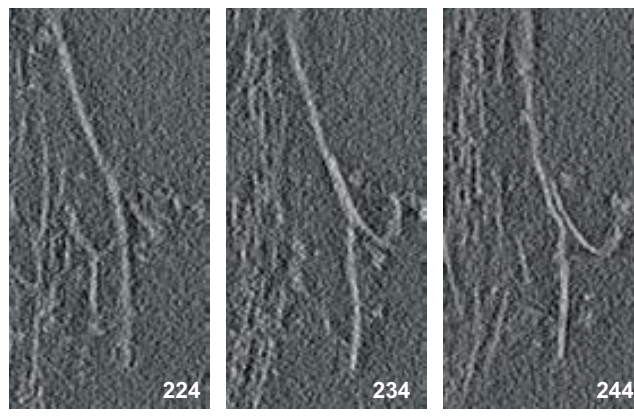


Figura 15.45: Seguimiento de un contacto entre dos placas de cromatina a lo largo de 20 secciones de un volumen reconstruido. Se muestran las secciones 224, 234 y 244 del volumen, en el plano XY. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

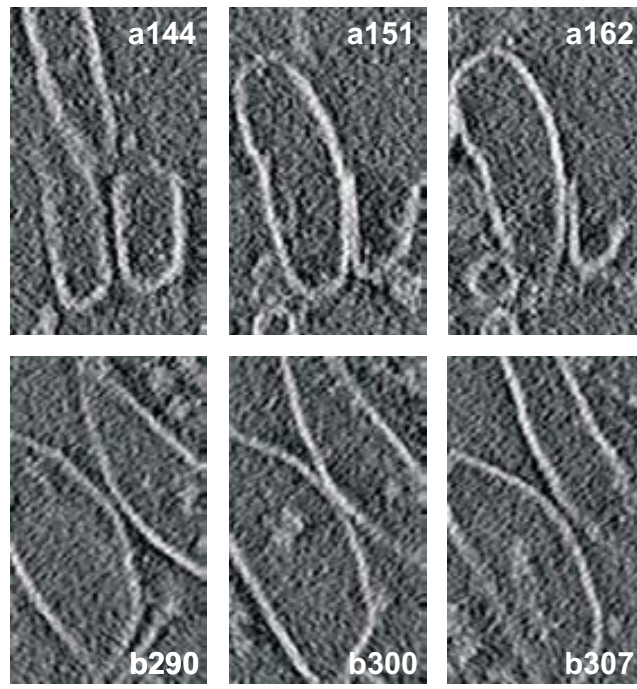


Figura 15.46: Seguimiento de dos contactos entre dos placas de cromatina a lo largo de diversas secciones de un volumen reconstruido. a144, a151 y a162 son secciones de una misma zona de contacto y b290, b300 y b307 pertenecen a otra zona de contacto. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

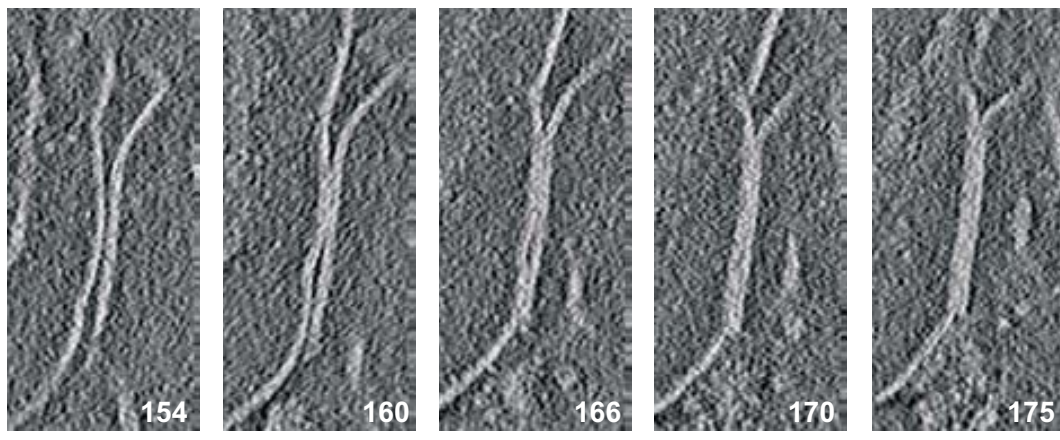


Figura 15.47: Seguimiento de un contacto entre dos placas de cromatina a lo largo de 25 secciones de un volumen reconstruido. Se muestran las secciones 154, 160, 166, 170 y 175 del volumen. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

Se ha determinado el grosor de estas zonas de contacto lateral entre placas de cromatina presentes en las reconstrucciones de tomogramas obtenidos utilizando la placa de fase Volta. Se ha obtenido un valor promedio de 16.1 ± 1.6 nm a partir

de 215 medidas realizadas sobre tomogramas reconstruidos con un *pixel binning* de $4\times$ (tamaño de píxel original: 0.421 nm). La Figura 15.48 A-B muestra un ejemplo de determinación del grosor de un contacto. El histograma correspondiente a todas las medidas realizadas en estas condiciones se muestra en la gráfica C. También se han realizado medidas de contactos sobre reconstrucciones obtenidas a partir de crio-tomogramas adquiridos sin placa de fase. En este caso se ha obtenido un valor promedio de 16.0 ± 1.3 nm a partir del análisis de 33 contactos. Estos valores son muy similares a los que se han obtenido de las reconstrucciones obtenidas a partir de adquisiciones a $27000\times$ (ver Figura 15.16).

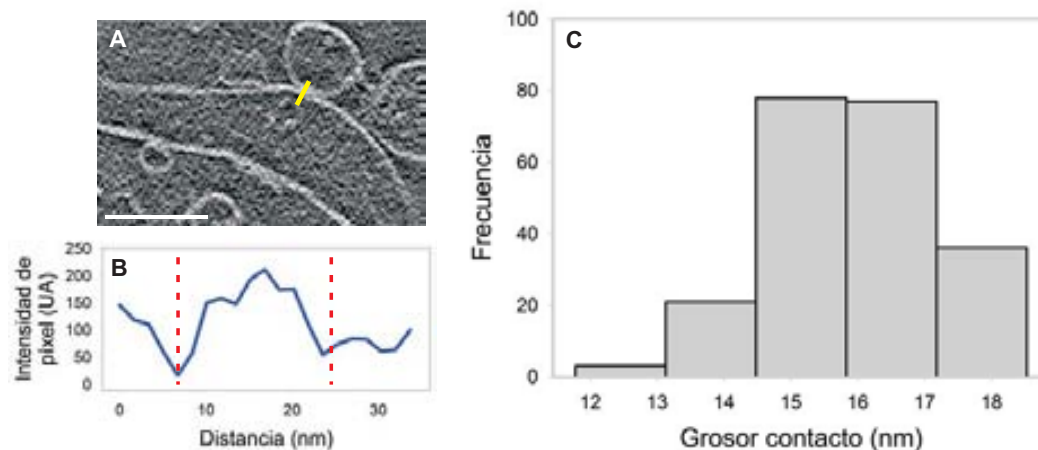


Figura 15.48: Medidas de grosor de contactos entre placas de cromatina metafásica. A muestra una sección de un tomograma con dos placas en contacto. La línea amarilla muestra la zona aproximada de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, que se muestra en el gráfico B; las líneas rojas delimitan el grosor del contacto (UA: unidades arbitrarias). C Histograma obtenido a partir de más de 200 medidas de contactos entre placas. Todas las medidas se han extraído de tomogramas reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de $4\times$. Tamaño de píxel original: 0.427 nm. Barra: 100 nm.

El análisis de las reconstrucciones tridimensionales (obtenidas a partir de tomogramas adquiridos a $33000\times$ con placa de fase Volta) ha mostrado también numerosos agregados multilaminares que presentan líneas paralelas en su interior. Estas estructuras también se observaron en reconstrucciones realizadas a partir de imágenes obtenidas a $27000\times$ y sin placa de fase (ver sección 15.2.1). Este tipo de agregados presentan unas dimensiones importantes, muchos de ellos tienen longitudes (en XY) de más de $1\ \mu\text{m}$ y grosores que se extienden a lo largo de gran parte del espesor de hielo. Prácticamente todos los agregados de este tipo tienen un par de placas externas, que se extienden a lo largo de todo el espesor del hielo y producen imágenes muy contrastadas. El resto de placas que quedan entre las dos placas externas sufren deformaciones y presentan trayectorias complejas que dificultan su seguimiento a lo largo del eje Z. El grosor de las placas en agregados multilaminares es de 9.6 ± 2.8 nm; se han realizado un total de 310 medidas (ver Figura 15.49). Este valor es similar al grosor de placas individuales (ver Figura 15.35). Las siguientes figuras muestran algunos ejemplos de agregados multilaminares.

Las Figuras 15.50 y 15.51 pertenecen al mismo agregado multilaminar. En la primera de estas figuras se muestra un seguimiento del agregado a través de 50 secciones donde puede verse que las placas interiores siguen trayectorias aproximadamente paralelas entre sí. En este caso, las placas interiores se han separado entre ellas, pudiéndolas observar individualmente a lo largo de todo el agregado. La segunda de las figuras presenta secciones XY, XZ e YZ en dos regiones de dicho agregado. El hecho de poder visualizar las placas en el plano YZ como líneas paralelas al eje Y nos indica que siguen una trayectoria inclinada en la dirección Z.

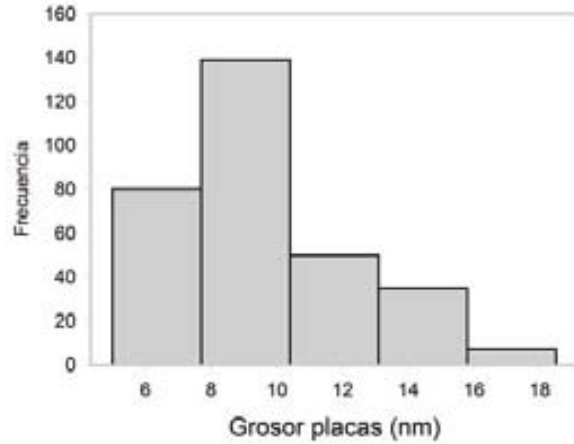


Figura 15.49: Histograma correspondiente a las medidas del grosor de placas presentes en agregados multilaminares en reconstrucciones tridimensionales realizadas mediante crio-ET.

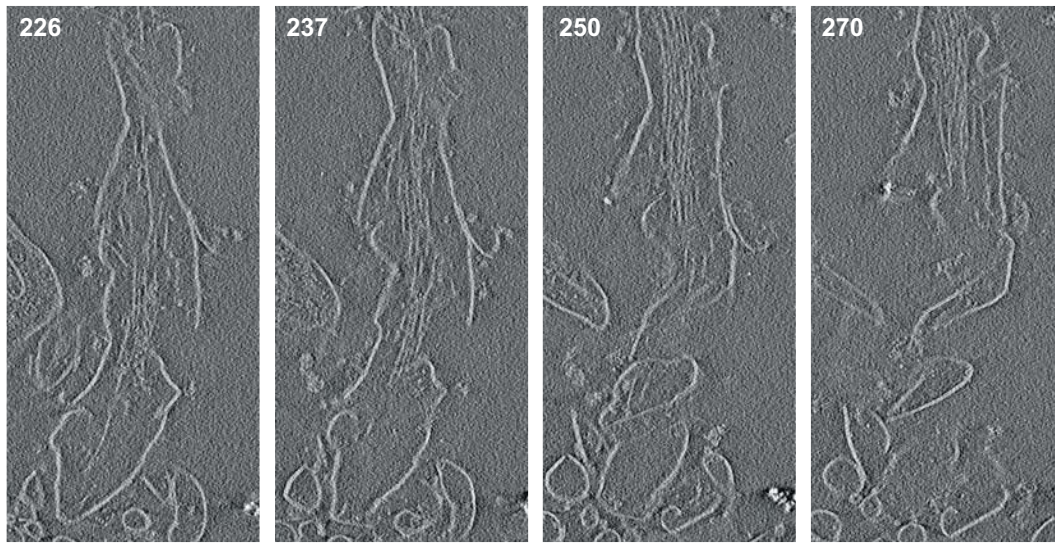


Figura 15.50: Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina. Se muestran diversas secciones del volumen. El agregado se extiende 120 nm a lo largo del eje Z. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 200 nm.

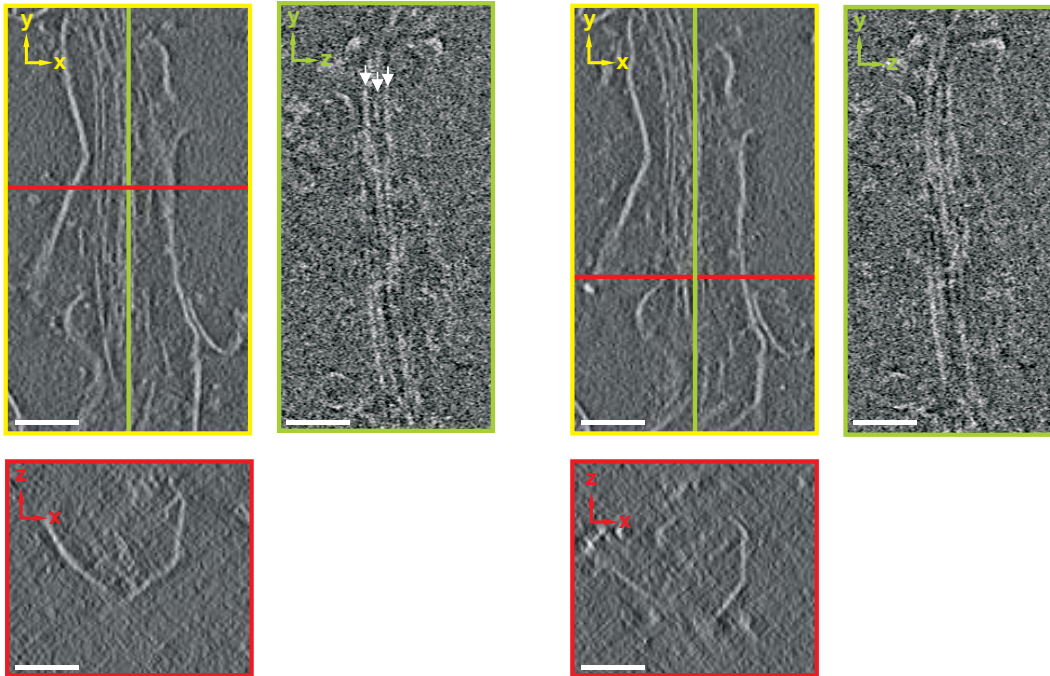


Figura 15.51: Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional del agregado multilaminar presentado en la Figura 15.50. Se muestran secciones en dos zonas del agregado. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

En ocasiones, las placas internas de estos agregados multilaminares contactan. En la Figura 15.52 se muestra otro ejemplo de agregado multilaminar en el cual hay contraste entre placas. Las líneas internas de este agregado están muy juntas entre sí, lo que dificulta su seguimiento a través del eje Z.

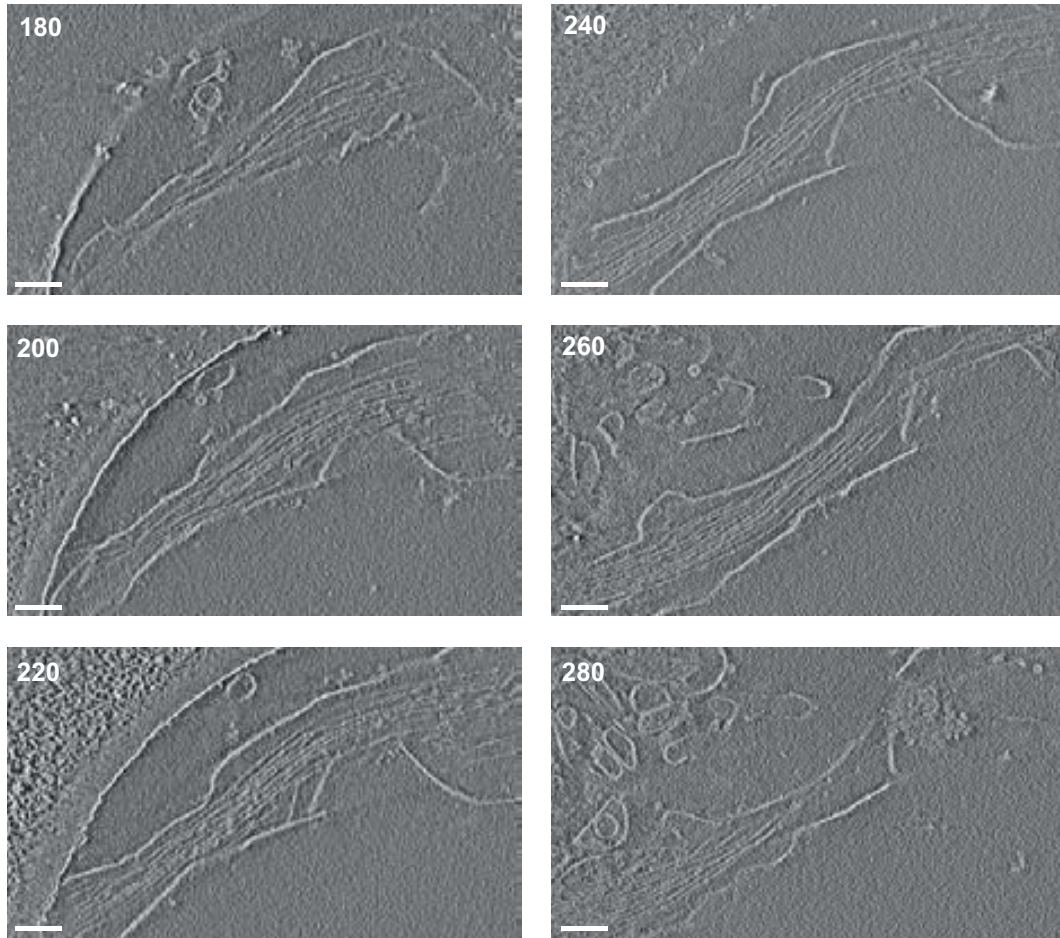


Figura 15.52: Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina. El agregado se sigue a lo largo de 100 secciones, en intervalos de 20. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

La Figura 15.53 corresponde a otro ejemplo cuyas líneas interiores también describen trayectorias complicadas que impiden su seguimiento a lo largo del eje Z.

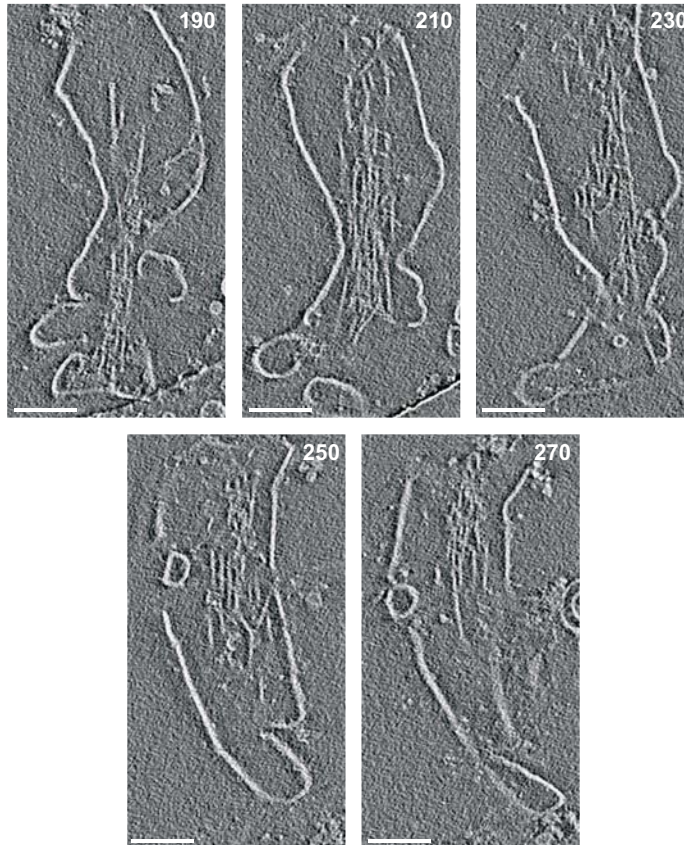


Figura 15.53: Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina. El agregado se sigue a lo largo de 80 secciones, en intervalos de 20. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

A lo largo de los ejemplos mostrados anteriormente se ha podido observar que las dimensiones que generalmente presentan los agregados multilaminares son realmente grandes: 800-1300 nm en el plano XY y hasta 300 nm en el eje Z. En la Figura 15.54 se muestra el agregado más grande que se ha encontrado. Sus dimensiones son similares a las que se esperan para un cromosoma metafásico (2 cromátidas de aproximadamente 600 nm cada una). Las regiones nombradas como zona1 y zona2 en la Figura 15.54 podrían corresponder a una parte de las dos cromátidas de un cromosoma desestructurado. Puede observarse que las líneas internas son visibles a lo largo de toda su extensión. El contacto entre estas líneas es íntimo en algunas regiones, de tal manera que prácticamente dejan de verse como placas individuales.

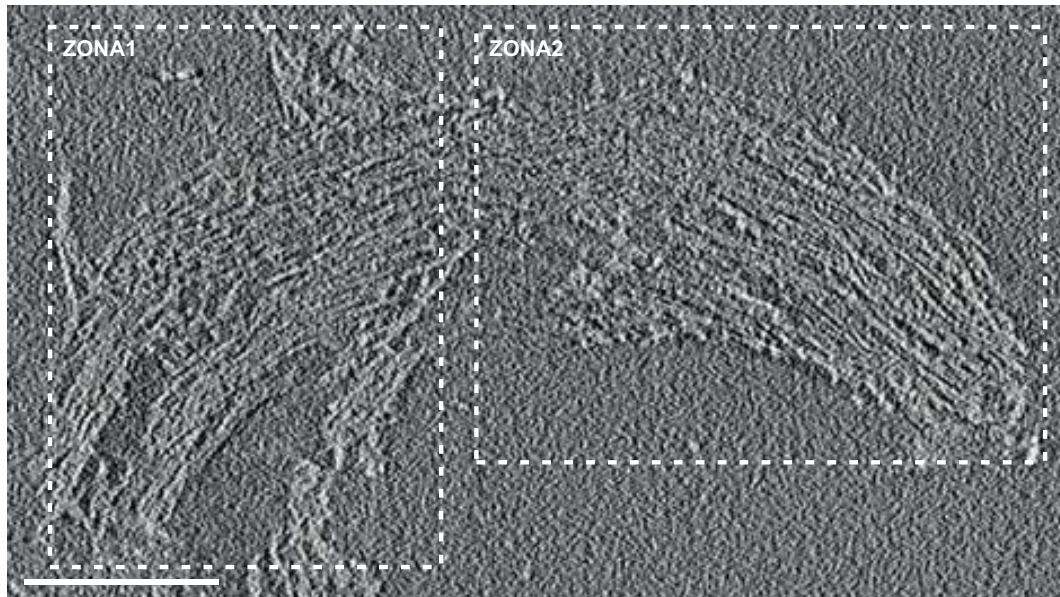


Figura 15.54: Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina de grandes dimensiones. El agregado ocupa prácticamente todo el grosor de hielo (300 nm) y tiene una longitud máxima de 1300 nm. **Zona1** y **Zona2** se presentan más detalladamente en las Figuras 15.55 y 15.56. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 200 nm.

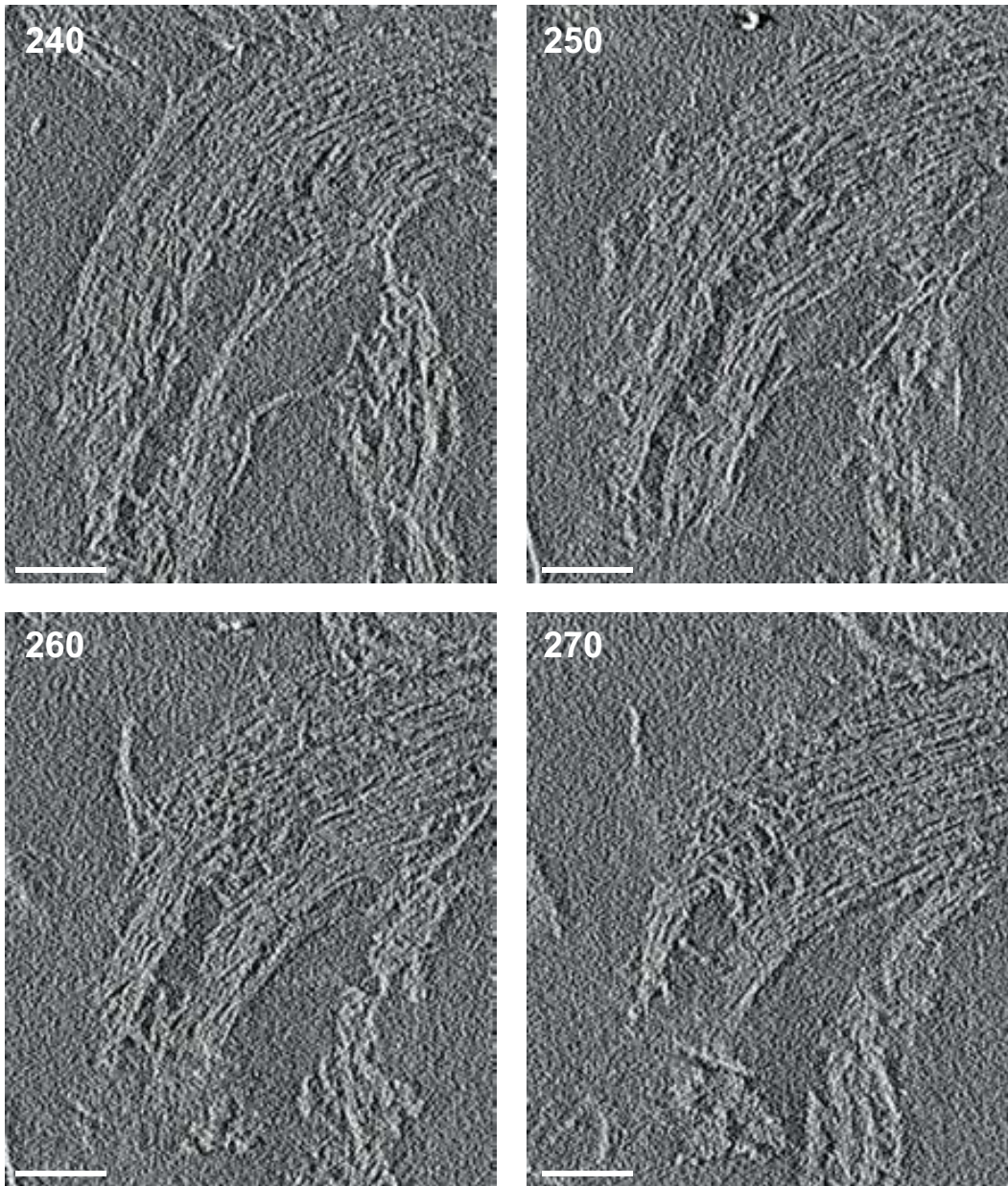


Figura 15.55: Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina de grandes dimensiones. Seguimiento de la Zona1 a través de 40 secciones, en intervalos de 10. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

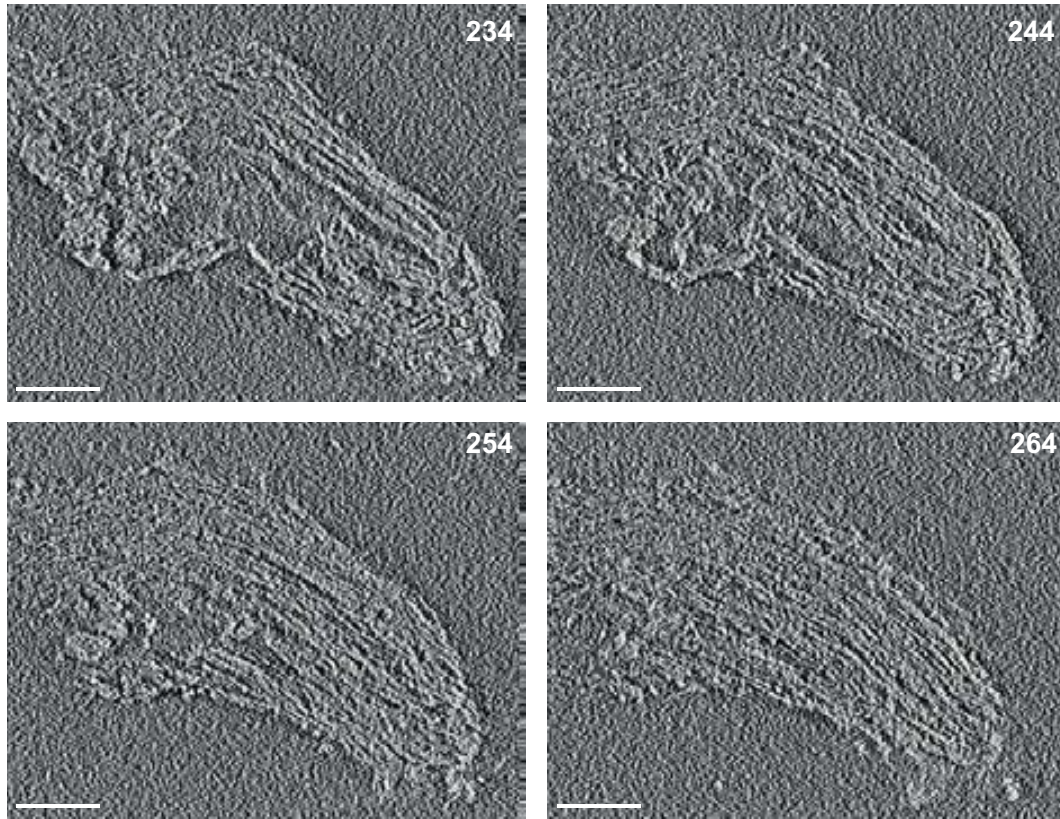


Figura 15.56: Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina de grandes dimensiones. Seguimiento de la Zona2 a través de 40 secciones, en intervalos de 10. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 100 nm.

A lo largo del análisis de todas las reconstrucciones se ha observado la presencia de pequeñas líneas aproximadamente paralelas entre sí y perpendiculares a las líneas de placa. La Figura 15.57 muestra algunos ejemplos a mayor ampliación de placas y agregados multilaminares que presentan este tipo de líneas.

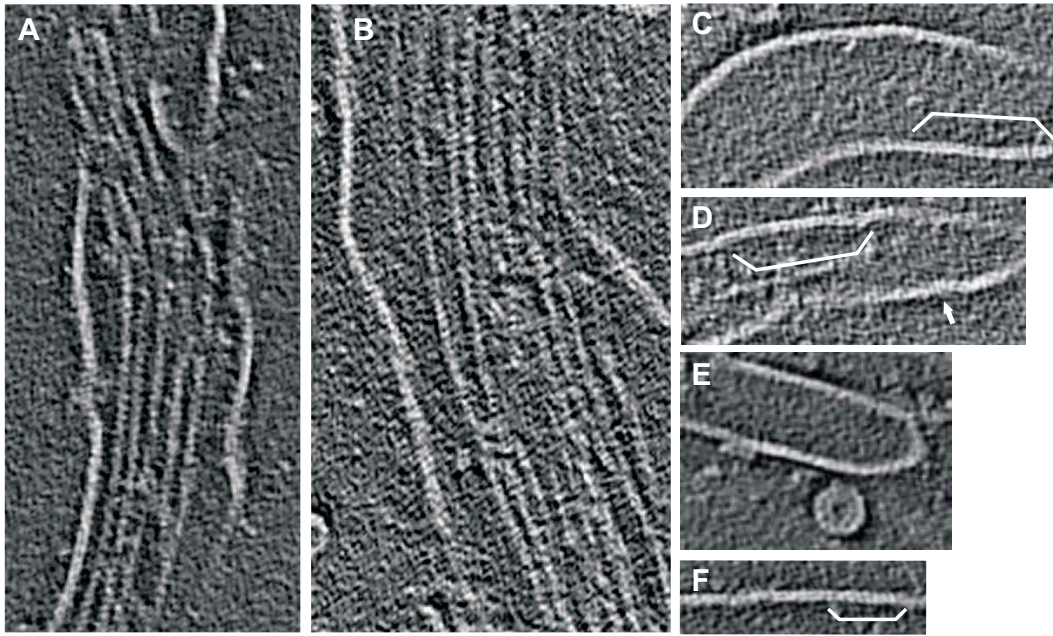


Figura 15.57: Ejemplos de placas que presentan pequeñas líneas perpendiculares a la línea de placa. A y B muestran agregados multilaminares; C-F muestran placas individuales. Todos los tomogramas han sido reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 50 nm.

Se ha determinado el distanciado entre dichas líneas, encontrándose un promedio de 5.3 ± 1.1 nm a partir de un total de 266 medidas (Figura 15.58). Este distanciado es equivalente al encontrado en las placas reconstruidas a partir de crio-tomogramas adquiridos a $27500\times$ (5.2 ± 1.6 nm). Como se indicó en el apartado 15.2.1, el distanciado entre líneas es superior a la distancia entre vueltas de DNA en las columnas de nucleosomas apilados de forma regular a través de sus caras laterales (~ 2.8 nm; Finch et al., 1977; Uberbacher y Bunick, 1985; Leforestier et al., 1999). Posiblemente, debido a la orientación irregular de los nucleosomas en la placa, la orientación de las vueltas de DNA también es variable, y esto se traduce en un aumento de la distancia entre líneas en las placas.

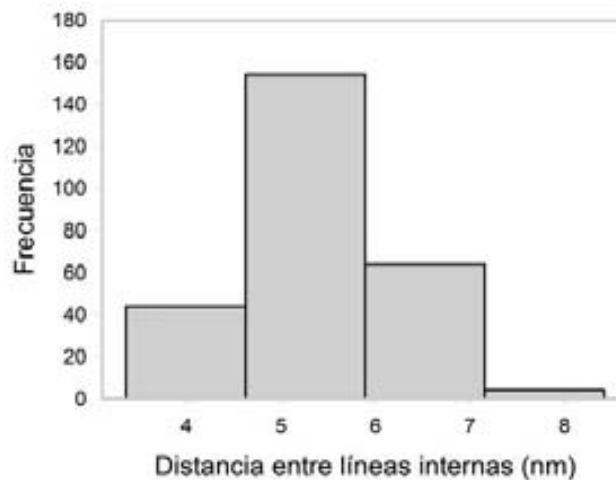


Figura 15.58: Histograma correspondiente a la distancia entre líneas internas de las placas. Reconstrucciones tridimensionales realizadas a partir de crio-tomogramas adquiridos a $33000\times$ con placa de fase Volta. En la reconstrucción se ha empleado un *pixel binning* de 4×.

La Figura 15.59 muestra una vista general de un tomograma que presenta placas parcialmente desestructuradas. La Figura 15.60 muestra el seguimiento a través de diversas secciones de la zona 1, donde se observan detalladamente las estructuras encontradas.

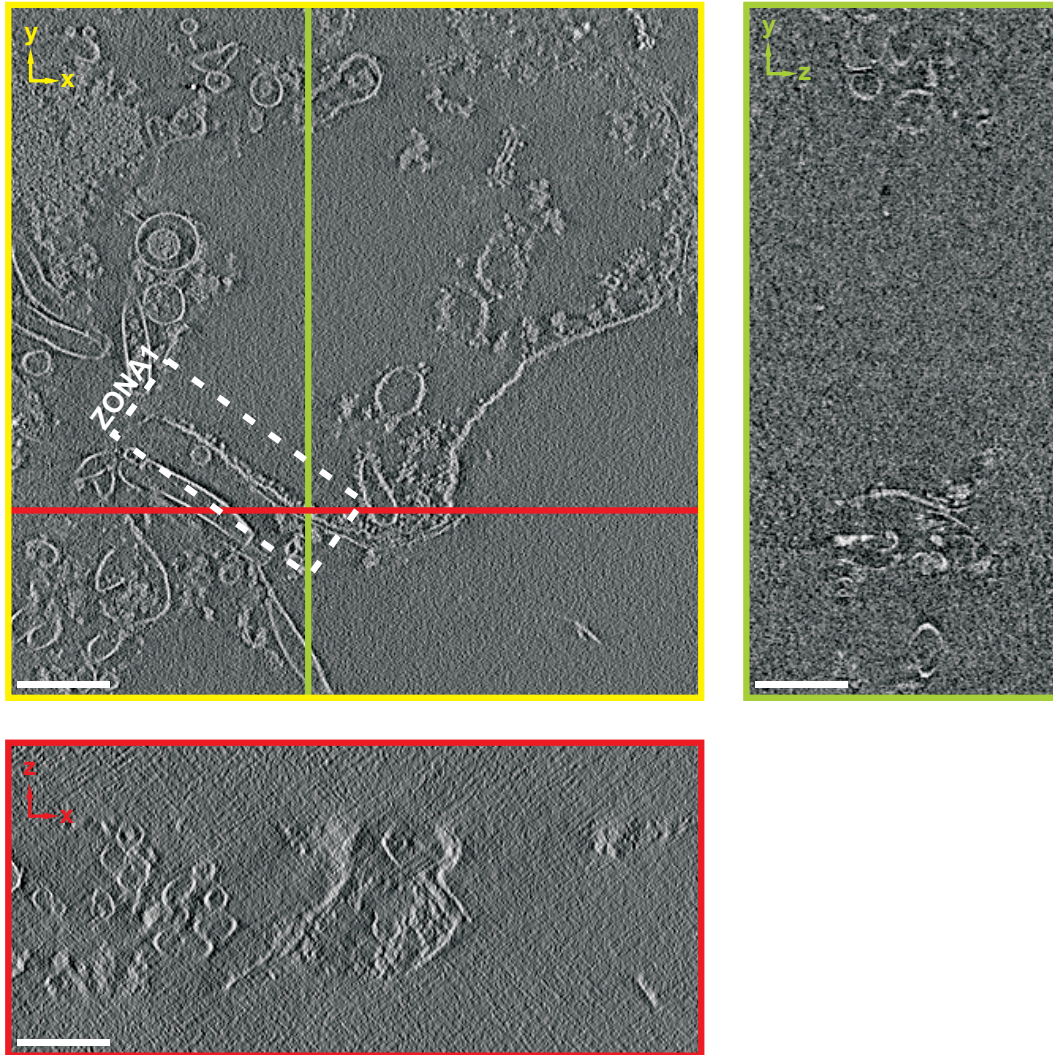


Figura 15.59: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de placas de cromatina parcialmente desestructuradas. Estas placas ocupan prácticamente todo el grosor de hielo. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 200 nm.

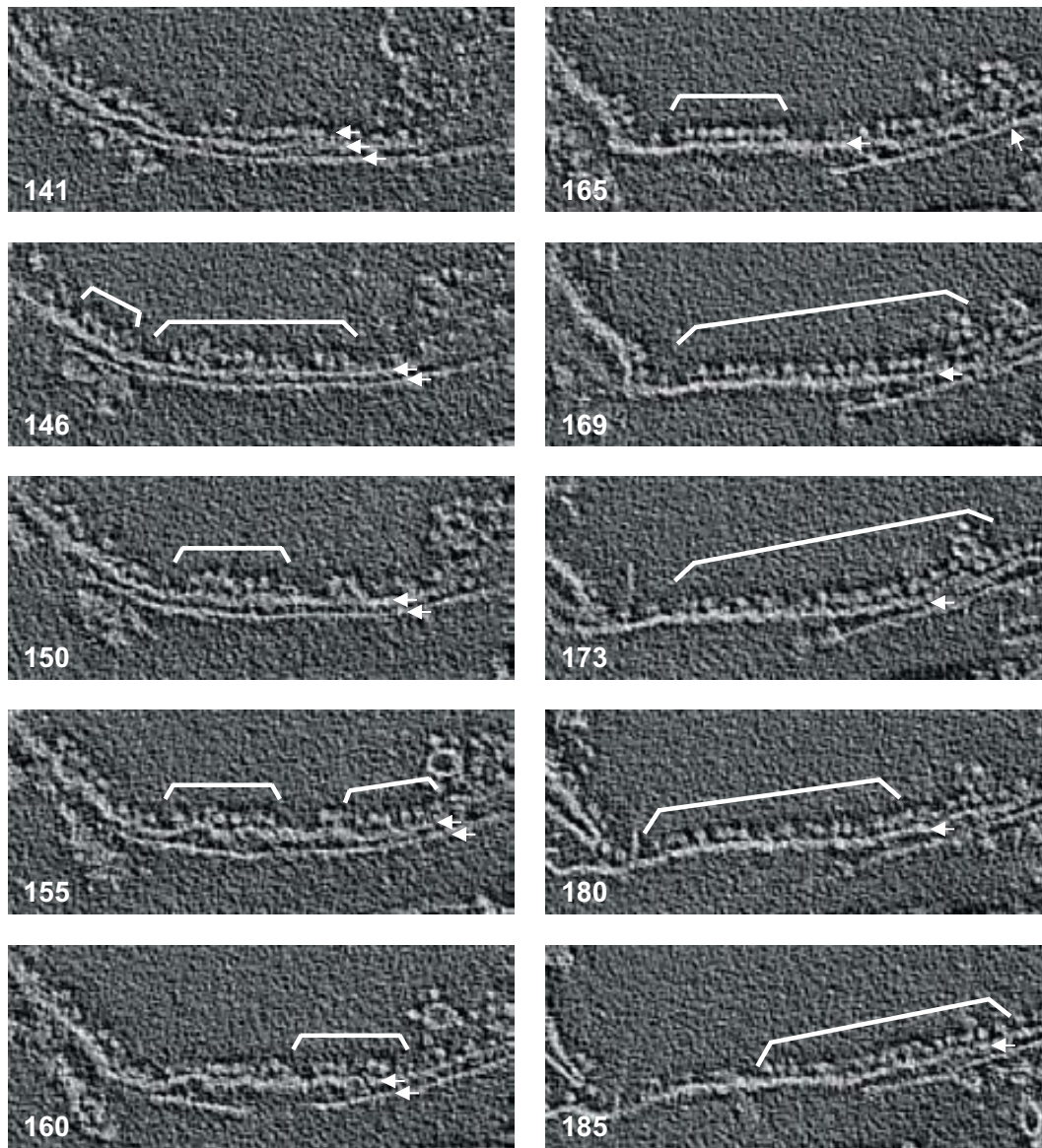


Figura 15.60: Seguimiento a través de diversas secciones en el plano XY de placas con zonas parcialmente desestructuradas. Las flechas señalan placas compactas y los corchetes indican placas desestructuradas donde se observa la presencia de pequeñas partículas. Estas placas ocupan prácticamente todo el grosor de hielo. Se muestran ampliaciones de la **Zona 1** del tomograma correspondiente a la Figura 15.59, que ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

Las ampliaciones de la Zona 1 de la Figura 15.59 se muestran en la Figura 15.60. Las flechas señalan placas compactas, similares a las que se han mostrado a lo largo de este capítulo. En la sección 141, pueden verse 3 líneas de placa paralelas, suficientemente separadas como para apreciarlas individualmente. Esta estructura trilaminar presenta a su vez pequeñas líneas aproximadamente paralelas entre sí y perpendiculares a la línea de placa. A medida que se recorren las secciones sucesivas,

puede observarse como la placa superior se desestructura parcialmente. Al desestructurarse, se hacen visibles pequeñas partículas más o menos circulares (señaladas mediante corchetes), cuyo tamaño se corresponde con el del nucleosoma (ver Figura 15.64). La Figura 15.61 muestra otro tomograma donde se han observado el mismo tipo de estructuras. En las Figuras 15.62 y 15.63 se presentan ampliaciones de las zonas 1 y 2, donde pueden verse estas estructuras circulares con mayor detalle.

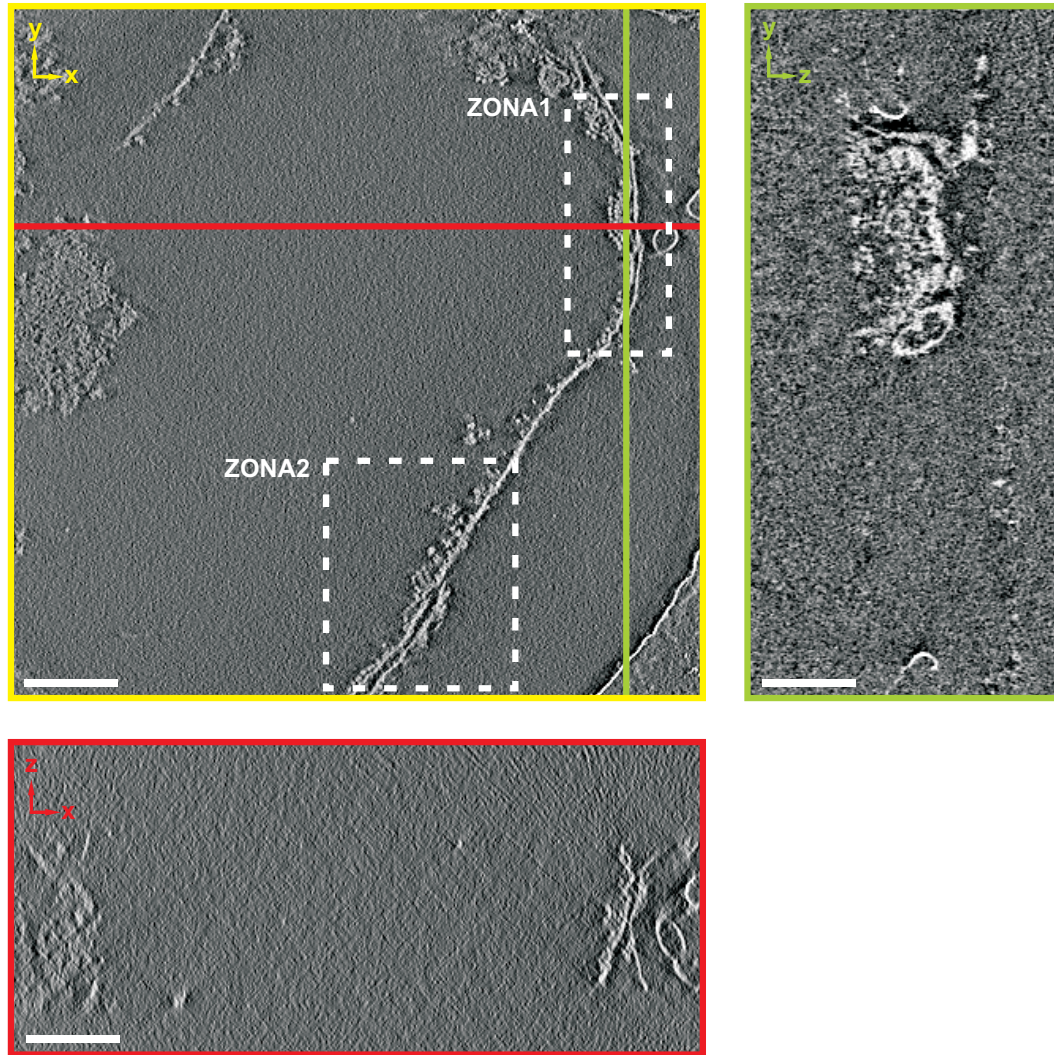


Figura 15.61: Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de placas de cromatina parcialmente desestructuradas. Estas placas ocupan prácticamente todo el grosor de hielo. El tomograma ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4 \times . Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barras: 200 nm.

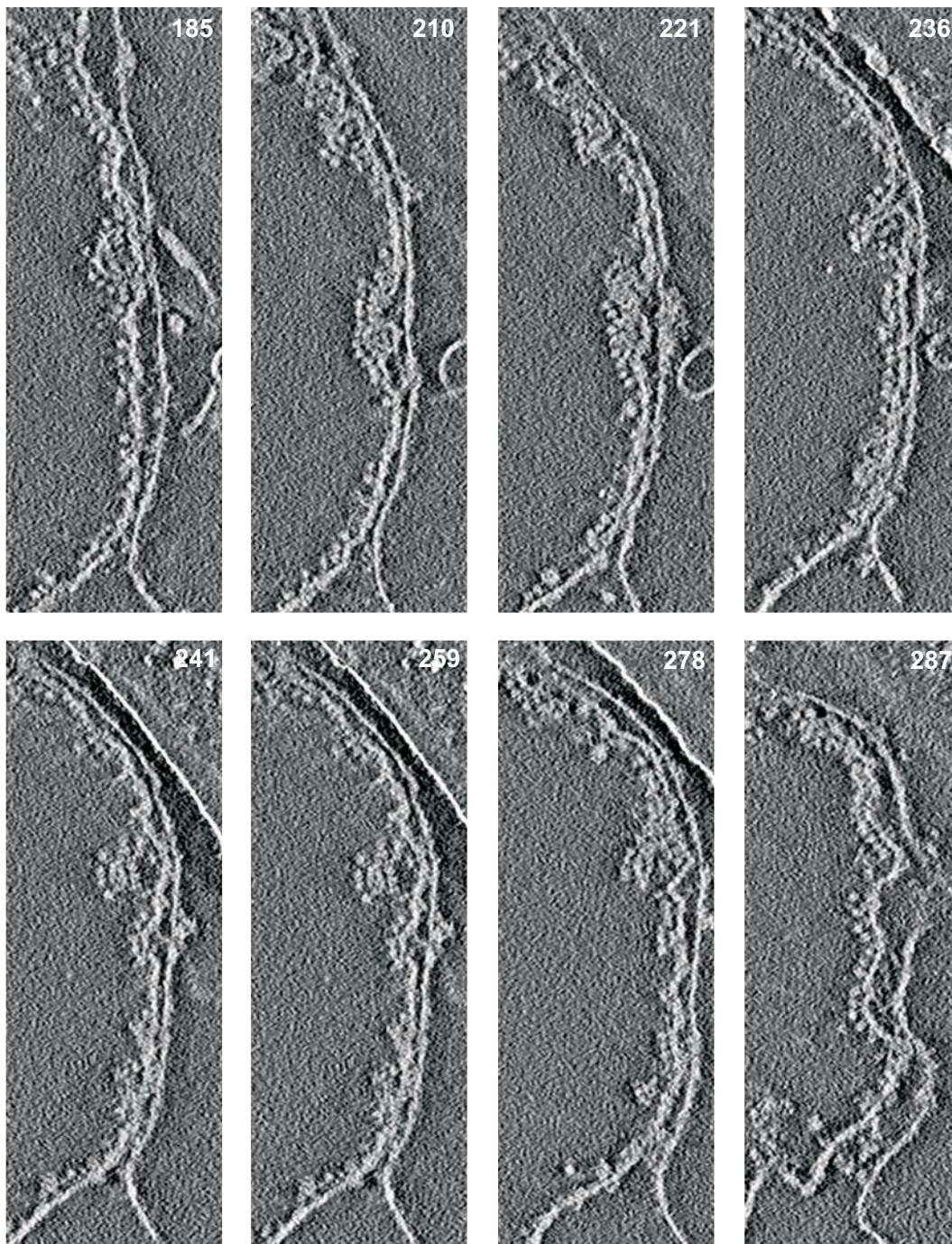


Figura 15.62: Seguimiento a través de diversas secciones de placas con zonas parcialmente desestructuradas. Estas placas ocupan prácticamente todo el grosor de hielo. Se muestran ampliaciones de la **Zona 1** del tomograma correspondiente a la Figura 15.61, que ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

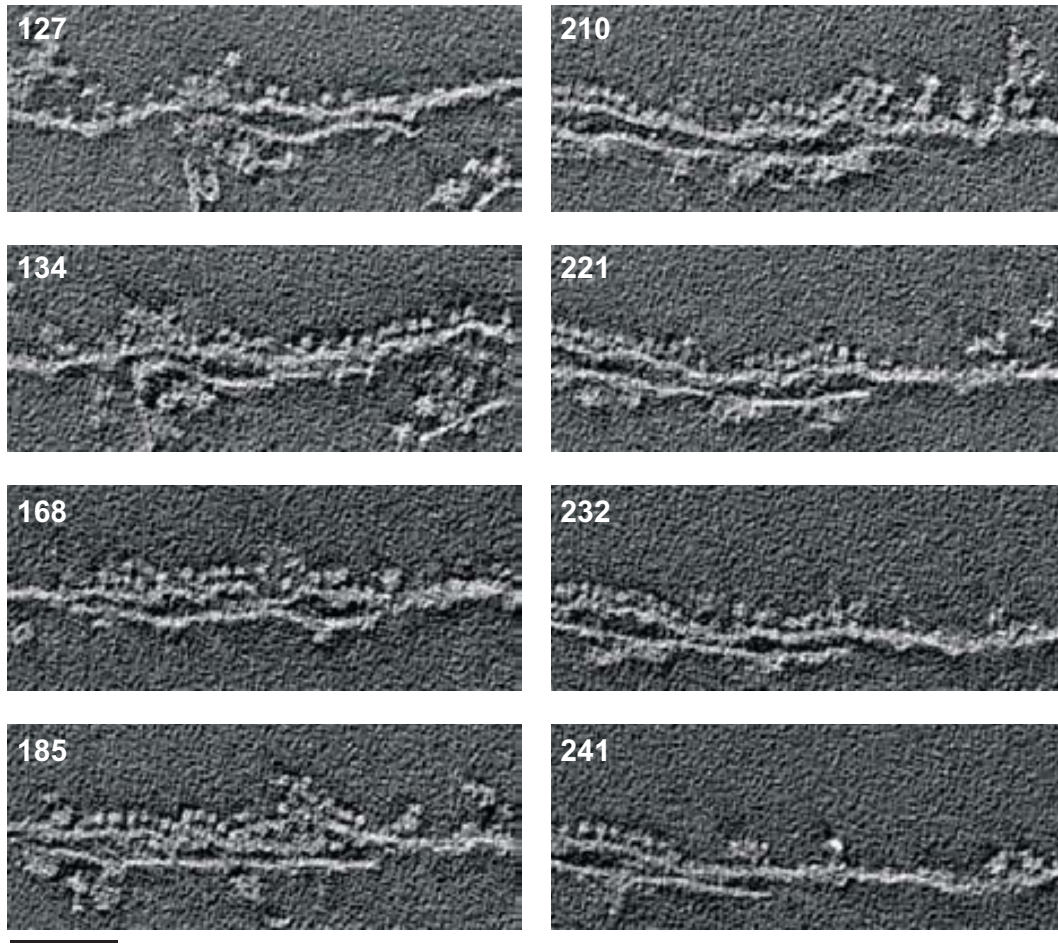


Figura 15.63: Seguimiento a través de diversas secciones de placas con zonas parcialmente desestructuradas. Se muestran ampliaciones de la **Zona 2** del tomograma correspondiente a la Figura 15.61, que ha sido reconstruido mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

Se ha determinado el tamaño de las estructuras circulares. Se ha obtenido un valor promedio de 12.0 ± 1.7 nm, a partir del análisis de 209 partículas; todas las medias se han realizado sobre reconstrucciones con *binning* 4× de tomogramas adquiridos con placa de fase. La Figura 15.64 muestra el histograma correspondiente a estas medidas. El valor encontrado es similar al diámetro del nucleosoma. De las secciones analizadas se desprende que los nucleosomas presentan orientaciones variables, no sólo cuando se observan individualmente, sino también cuando se observan como líneas en el interior de las líneas de placa.

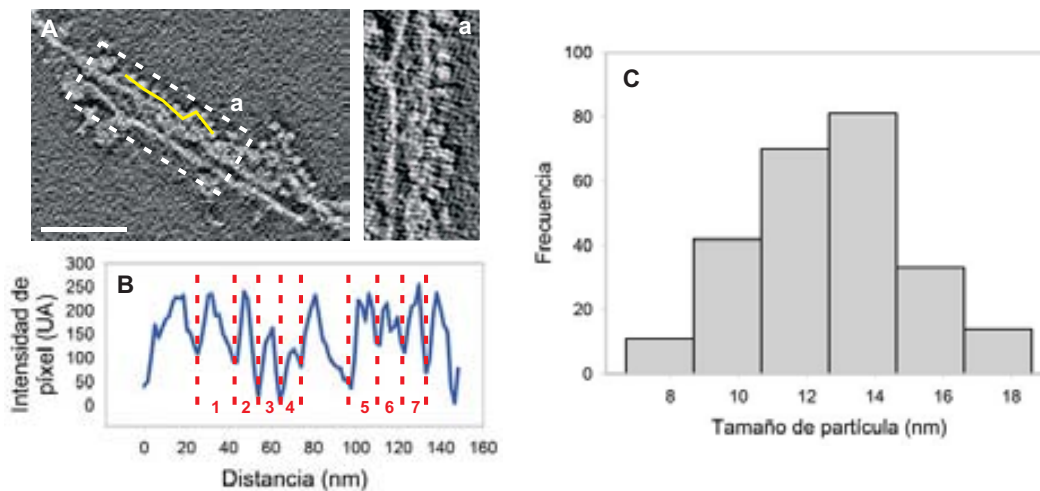


Figura 15.64: Tamaño de las partículas circulares encontradas en placas parcialmente desestructuradas. **A** muestra una sección de un tomograma en la que se observan dos líneas correspondientes a placas compactas junto a otra parcialmente desestructurada donde pueden apreciarse pequeñas partículas. La línea amarilla muestra la zona de la que se ha obtenido la intensidad de cada píxel, que se muestra en el gráfico **B**; UA: unidades arbitrarias. **C** Histograma obtenido a partir de 209 medidas de partículas. Todas las medidas se han extraído de tomogramas reconstruidos mediante el algoritmo *Weighted Back Projection* (IMOD) aplicando un *pixel binning* de 4×. Tamaño de píxel original: 0.421 nm. Barra: 100 nm.

La observación detallada de estas pequeñas partículas ha permitido discernir, en algunos casos, un par de líneas más o menos paralelas de elevada intensidad. También los densitogramas indican la presencia de estas líneas. En la Figura 15.64 B las flechas indican aumentos de intensidad dentro de una misma partícula. Se han realizado medidas de la distancia entre estos dos picos de intensidad dentro de una partícula; el valor obtenido a partir del análisis de 58 partículas es 5.2 ± 1.0 nm (todos los datos se han extraído de reconstrucciones de tomogramas adquiridos con placa de fase). Esta distancia es similar a la encontrada al determinar el espaciado entre las líneas internas de las placas (ver Figura 15.58), lo cual indica que las dos líneas internas de los nucleosomas individuales son equivalentes a las líneas transversales observadas en el interior de las placas.

La Tabla 15.1 muestra un resumen de todas las medidas realizadas a partir de las reconstrucciones tridimensionales analizadas en esta parte de la tesis.

Estructura	Microscopio ¹	Phase Plate	Pixel Binning	Distancia ² (nm)	
Solenoides interdigitados	Diámetro	TK	+	4x	32.1 ± 4.0 (n= 177)
		TK	-	4x	26.4 ± 4.0 (n= 34)
	Altura	TK	+	4x	29.9 ± 3.0 (n= 168)
		TK	-	4x	22.0 ± 2.8 (n= 34)
Grosor de placa individual	T	-	no	9.8 ± 1.6 (n=493)	
	T	-	4x	10.2 ± 1.9 (n=96)	
	TK	+	4x	10.9 ± 1.1 (n=411)	
	TK	-	4x	10.8 ± 0.8 (n=39)	
Grosor de placa en agregados multilaminares	TK	+	4x	9.6 ± 2.8 (n=310)	
Distancia entre líneas internas en placas	T	-	no	5.2 ± 1.6 (n=724)	
	TK	+	4x	5.3 ± 1.1 (n=266)	
Grosor de dos placas en contacto	T	-	no	16.0 ± 1.3 (n=27)	
	TK	+	4x	16.1 ± 1.6 (n=215)	
	TK	-	4x	16.0 ± 1.3 (n= 33)	
Nucleosomas individuales	TK	+	4x	12.0 ± 1.7 (n=209)	
Distancia entre líneas internas en nucleosomas	TK	+	4x	5.2 ± 1.0 (n=58)	

Tabla 15.1: Resumen de las medidas realizadas. ¹T: Tecnai G2 Polara, 27000×, tamaño de píxel: 4.27 Å. TK: Titan Krios, 33000×, tamaño de píxel: 4.21 Å. ²Se indica la distancia promedio ± desviación estándar y, entre paréntesis, el número de medidas.

Parte IV

DISCUSIÓN GENERAL

Capítulo 16

Estructura de la cromatina en el núcleo interfásico

16.1. Estructura de la cromatina interfásica

Se ha realizado un extenso estudio mediante TEM de la estructura de la cromatina en el interior del núcleo interfásico en presencia de diversas condiciones iónicas. Las micrografías obtenidas únicamente muestran fibras cuando los núcleos son incubados en presencia de EDTA (Figura 11.3). Estas fibras recuerdan a los primeros estudios de microscopía, obtenidos con cromosomas en medios de baja fuerza iónica, que mostraban gran cantidad de lazos de cromatina (Paulson y Laemmli, 1977; Marsden y Laemmli, 1979; Earnshaw y Laemmli, 1983). Sin embargo, las condiciones de baja fuerza iónica distan enormemente de las que se encuentran en el núcleo interfásico. Está descrito que los cationes divalentes juegan un papel importante en el mantenimiento de estructuras de orden superior de la cromatina. De acuerdo con los resultados de Strick et al. (2001), la concentración de iones divalentes aumenta considerablemente a lo largo del ciclo celular, alcanzando un máximo de concentración durante la metafase. Los autores detectan una concentración de Mg^{2+} de 2-4 mM en el interior del núcleo interfásico. Por esta razón, los experimentos de esta parte de la tesis han sido llevados a cabo en condiciones iónicas similares a las observadas en interfase.

En términos generales, las emanaciones de cromatina desde núcleos interfásicos desestructurados parcialmente por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en condiciones iónicas próximas a la interfase presentan una textura entre amorfa y laminar (ver Figuras 11.7-11.12). Los resultados evidencian un aumento en la compactación de la cromatina a medida que aumenta la concentración de Mg^{2+} . Además, el estudio de la estructura de la cromatina emanada a partir de núcleos en diferentes estadios de la interfase, muestra también placas en G_1 , S y G_2 para todas las condiciones ensayadas (ver Figuras 12.1-12.8). Asumiendo la estructuración del cromosoma metafásico según el modelo de placas finas de cromatina (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010), es de esperar que los estadios previo (G_2) y posterior (G_1) a la formación del cromosoma condensado presenten una morfología laminar. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las placas

de cromatina están presentes a lo largo de todo el ciclo celular, incluso en la fase S, durante la cual tiene lugar la síntesis de DNA. A pesar de ello, se detectan sutiles diferencias estructurales al estudiar con detenimiento la cromatina procedente de núcleos separados en función de la fase celular en la que se encuentran. Las placas de cromatina en las fases G_1 (Figura 12.3) y S (Figura 12.4) presentan una superficie rugosa que indica una menor compactación del material en su interior, mientras que las placas procedentes de núcleos en fase G_2 presentan una superficie bastante más lisa y compacta (Figura 12.7).

Las placas interfásicas observadas, en comparación con las metafásicas, tienen un tamaño significativamente menor y en general no presentan tendencia al apilamiento. Además, mientras que la textura de las placas metafásicas es muy lisa, las placas interfásicas muestran rugosidades en la superficie, que recuerdan a las rugosidades observadas en algunas placas de cromatina formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina procedentes de cromosomas metafásicos (Milla y Daban, 2012). La apariencia rugosa de las capas superiores de estas placas formadas por autoasociación sugirió que se trataba de placas que se encontraban aún en proceso de formación. El hecho de que las placas de cromatina interfásica presenten una textura similar a dichas placas en formación, indica que la compactación de las placas interfásicas es considerablemente menor. La menor compactación de la cromatina interfásica podría estar relacionada con la accesibilidad que el material genético debe tener para permitir la transcripción y replicación del DNA.

El hecho de que la morfología de la cromatina interfásica sea laminar no descarta que en el interior del núcleo tenga una organización macroscópica. Dehghani et al. (2005) proponen que la cromatina en el núcleo interfásico se organiza en territorios cromosomales formados por una red de fibras de 10-30 nm de diámetro que permitiría la difusión de factores de transcripción y otras proteínas. Los resultados obtenidos en esta tesis no descartan la posibilidad de que existan territorios cromosomales. Sin embargo, la ausencia de fibras en condiciones iónicas propias de la interfase descarta la organización fibrilar. Por el contrario, cada territorio cromosomal podría estar formado por agrupaciones laminares de cromatina. Como se ha podido observar, la cohesión entre las placas interfásicas es significativamente menor que durante la metafase, lo que permitiría la libre difusión de factores de transcripción y otras proteínas en el interior de dichos territorios. El estudio reciente de Ricci et al. (2015) empleando técnicas de microscopía de fluorescencia de alta resolución, sugiere que en el interior de los núcleos, la cromatina interfásica está muy diluida y forma agregados de diversos tamaños, separados por zonas carentes de nucleosomas. Efectivamente, estas técnicas basadas en fluorescencia de alta resolución permiten detectar la posición de estos agregados nucleosomales, pero no tienen suficiente resolución como para poder estudiar la organización interna de dichos agregados. Por otro lado, el estudio de la estructura de la cromatina en secciones vítreas de núcleos interfásicos muestra que la cromatina es muy densa y presenta una textura básicamente granular y homogénea, que descarta la presencia de fibras (Bouchet-Marquis et al., 2006). La textura que los núcleos interfásicos muestran, es muy similar a la textura granular, sin fibras visibles, que presentan las secciones vítreas de cromoso-

mas (McDowall et al., 1986; Eltsov et al., 2008; Maeshima et al., 2010). La textura homogénea de las placas interfásicas, es compatible con la textura de las secciones vítreas de los núcleos. Todos estos resultados son incompatibles con la presencia dominante de fibras de cromatina durante la interfase.

16.2. Estudio de la capacidad autoasociativa de la cromatina interfásica

En vista de la elevada tendencia de los fragmentos de cromatina metafásica a autoasociarse para formar placas cuando se incuban en condiciones iónicas metafásicas (Milla y Daban, 2012), en esta tesis se ha investigado si la cromatina interfásica presenta también dicha capacidad. Tras digerir la cromatina de núcleos interfásicos, someter los fragmentos a condiciones de baja fuerza iónica y posteriormente a condiciones semejantes a las observadas en el núcleo interfásico, se han observado placas. Los resultados que se muestran en este trabajo (ver sección 13.2, Figuras 13.3-13.12) indican que los filamentos de cromatina interfásica tienen la capacidad intrínseca de asociarse formando estructuras laminares, y que no es necesaria la continuidad del DNA para el ensamblamiento de estas estructuras de orden superior. Las placas formadas por autoasociación presentan las mismas características estructurales que las observadas en torno a los núcleos interfásicos parcialmente desnaturalizados. A menudo, presentan una morfología alargada y contienen gran cantidad de cuerpos circulares de tamaño variable en la superficie de las placas. Se ha evaluado también el efecto que el aumento de la concentración de Mg^{2+} ejerce sobre la estructura de las placas y, de nuevo, se ha observado un aumento en la compactación del material analizado. Incluso cuando los filamentos de cromatina interfásica se someten a concentraciones de Mg^{2+} próximas a la metafase (10 y 17 mM), las placas mantienen la morfología alargada y los cuerpos circulares siguen siendo visibles en la superficie de las placas. Estos resultados indican que, a pesar de que en todos los casos se obtienen placas por autoasociación, la morfología de las placas formadas a partir de cromatina interfásica es menos compacta que la que presentan las placas generadas a partir de fragmentos de cromatina metafásica.

También se ha evaluado la capacidad de autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica procedente de núcleos en diferentes fases del ciclo celular. Los resultados muestran placas de diversos tamaños en cualquiera de las condiciones ensayadas (ver sección 13.3, Figuras 13.14-13.25). También se ha observado un aumento en la compactación de las placas a medida que avanza el ciclo celular. Las placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina procedentes de núcleos en fase G_1 presentan una textura laxa y rugosa (Figura 13.16), mientras que si el material proviene de núcleos en fase S (Figura 13.19) o G_2 (Figura 13.25) se observan placas mucho más compactas. Las placas obtenidas a partir de cromatina en fase G_2 presentan un tamaño mayor y generalmente una superficie más lisa que recuerda a las placas metafásicas, sobre todo en presencia de Mg^{2+} de 5 mM. En todas las condiciones se pueden apreciar gran cantidad de cuerpos circulares en la superficie de las placas. Tal como se ha indicado en la sección anterior, la presencia de estas estructuras sobre la superficie de las placas sugiere que se trata de agrupaciones de

nucleosomas en proceso de integración a las placas. La formación espontánea de placas también en el caso de la cromatina interfásica, observada en esta tesis, expande las observaciones previas sobre las placas de cromatina metafásicas al resto del ciclo celular y abre nuevos horizontes para el conocimiento de la estructura y la función de la cromatina.

Capítulo 17

Estructura de la cromatina en el cromosoma metafásico

17.1. Estructura interna del cromosoma condensado

Se ha realizado un análisis de dispersión de rayos X de sincrotrón de cromosomas metafásicos preparados en presencia de diversas condiciones iónicas (ver sección 10.3). Independientemente de las condiciones iónicas empleadas, los perfiles de SAXS muestran señales típicas (3.7 y 2.8 nm) correspondientes a distancias internas del nucleosoma (ver resultados en la sección 14.2). Nuestros resultados muestran que los picos a 11 nm y 30 nm muestran baja intensidad y están ausentes cuando se emplean condiciones iónicas metafásicas. Estas señales corresponden, respectivamente, a las distancias repetidas entre columnas paralelas de nucleosomas y fibras de 30 nm (Widom y Klug, 1985). El estudio reciente sobre la estructura de cromosomas metafásicos realizado por Nishino et al. (2012), ha demostrado que la señal correspondiente a 30 nm procede de ribosomas asociados al cromosoma. Estos autores observaron que después de eliminar los agregados de ribosomas, los cromosomas, en presencia de 5 mM de Mg^{2+} no presentan el pico a 30 nm. Por el contrario, presentan un pico dominante a 6 nm aproximadamente. Nuestros resultados indican que en presencia de condiciones iónicas propias de la metafase (17 mM Mg^{2+} , 120 mM K^+ , 20 mM Na^+) la señal más importante corresponde a una distancia de aproximadamente 6 nm. Este resultado está de acuerdo con los resultados de Nishino et al. (2012). La distancia de 6 nm corresponde a nucleosomas que interaccionan lateralmente. Además, tal como se indica en la siguiente sección, esta distancia también corresponde a la separación entre placas apiladas.

17.2. Ultraestructura de las placas de cromatina metafásica

Se ha estudiado mediante crio-ET, la estructura de la cromatina emanada de cromosomas metafásicos en soluciones acuosas en presencia de Mg^{2+} 5 mM, bajo temperaturas criogénicas (ver resultados en el capítulo 15).

Las reconstrucciones tridimensionales muestran ocasionalmente pequeños agregados circulares de aproximadamente 30 nm de diámetro (ver Figura 15.25 y Tabla 15.1). Estos agregados circulares han sido ampliamente descritos en estudios previos en nuestro laboratorio y corresponden a pequeños fragmentos de cromatina que adquieren un plegamiento en forma de solenoide compacto que permite la interdigitación de nucleosomas entre vueltas sucesivas (Bartolomé et al., 1994; Bartolomé et al., 1995; Caño, 2007). La estructura que muestran estas pequeñas fibras analizadas mediante crio-TE es igual que la observada en el caso de fragmentos de cromatina procedentes de eritrocito de pollo analizados mediante TEM (Bartolomé et al., 1994; Bartolomé et al., 1995). También son equivalentes a las estructuras formadas por *arrays* de nucleosomas analizados mediante crio-TEM (ver Figura 3.7; Robinson et al., 2006). Se ha podido observar cómo estas estructuras ocasionalmente deshacen su plegamiento helicoidal para incorporarse a las placas (Figura 15.26). Se ha observado que la altura de estas estructuras es pequeña (22-30 nm; ver Tabla 15.1). Los resultados obtenidos indican que en la cromatina metafásica no existen fibras largas de 30 nm. En los resultados mostrados en el presente trabajo, tan sólo aparecen muy ocasionalmente fibras cortas de 30 nm. Las placas de cromatina son la estructura dominante observada en las muestras preparadas a partir de cromosomas metafásicos.

Las reconstrucciones tridimensionales muestran una enorme cantidad de placas individuales (Figuras 15.10-15.11 y 15.28-15.34). El grosor de las placas es de aproximadamente 10-11 nm (ver Tabla 15.1). En estudios previos en nuestro grupo de investigación se ha determinado la altura de las placas individuales mediante TEM (7.4 nm), AFM (4.0 nm) y tomografía electrónica de muestras deshidratadas (7.8 nm) (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010). El grosor de las placas analizadas mediante estas técnicas es considerablemente menor que el valor observado mediante crio-ET. Esta diferencia puede ser debida al hecho que las placas individuales sobre las rejillas para TEM o sobre mica en experimentos de AFM, se encuentran parcialmente inmersas en un fondo de cromatina que cubre la superficie del sustrato, lo que reduce su grosor aparente. Por otro lado, las placas estudiadas mediante crio-TE no han sido fijadas y se encuentran hidratadas. La presencia de agua podría ser la razón del aumento del grosor. El grosor de placas analizadas mediante crio-TE es muy próximo al diámetro del nucleosoma (~11 nm). Las medidas corresponden a placas individuales en solución acuosa vitrificada, y no existe ningún soporte que enmascare su tamaño. El hecho de que se haya detectado un grosor ligeramente inferior al diámetro del nucleosoma, puede explicarse si los nucleosomas están inclinados y presentan una orientación irregular en el interior de la placa, tal como ha sido sugerido previamente a partir del análisis de los bordes de las placas en reconstrucciones tomográficas de muestras deshidratadas y platinadas (Castro-Hartmann et al., 2010).

A menudo, se ha observado que las placas individuales contenidas en medio acuoso son capaces de adoptar estructuras cilíndricas (Figuras 15.13 y 15.36-15.40). Este hecho se explica por la elevada tendencia de las placas de cromatina a incorporar nucleosomas en su estructura (Milla y Daban, 2012). En términos energéticos, resulta

mucho más estable para los nucleosomas, colocarse uno junto al otro en el interior de una placa, minimizando así la desestabilización debida al contacto con el medio acuoso (Daban, 2014).

También se ha observado que las placas interaccionan entre ellas formando bicapas (Figuras 15.14-15.15 y 15.41-15.47). Las medidas realizadas en estas zonas de contacto íntimo entre dos placas individuales revelan un grosor de aproximadamente 16 nm (ver Tabla 15.1). Este valor es inferior a la suma del grosor de dos placas individuales, lo que indica que existe interdigitación entre nucleosomas de ambas placas. Del resultado se deduce que el grosor aparente de cada placa individual es de 8 nm aproximadamente.

Este valor es superior al grosor de placas en agregados multilaminares determinado mediante TEM (5.3 nm) y tomografía electrónica de muestras deshidratadas (6.1 nm) (Gállego et al., 2009;

Castro-Hartmann et al., 2010). Posiblemente, la diferencia se debe a la presencia de agua en las preparaciones de crio-ET. Estos resultados obtenidos con muestras en medio acuoso vitrificado y sin ningún tipo de fijación ni contraste son importantes porque confirman que existe interdigitación entre las capas de cromatina multilaminar, tal como se había propuesto en el modelo de las placas delgadas para el cromosoma metafásico (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann et al., 2010, ; ver Figura 17.1).

Además, de acuerdo con las medidas obtenidas, la distancia entre los planos centrales de dos placas interdigitadas es de aproximadamente 6 nm. También la distancia entre nucleosomas que interaccionan a través de sus caras laterales en la estructura interdigitada es de 6 nm aproximadamente. Estas distancias repetidas son coherentes con la difracción dominante a 6 nm observada en los experimentos de SAXS realizados en el sincrotrón ALBA (apartado 14.2).

También se han observado grandes agregados que presentan placas en su interior (Figuras 15.17-15.18 y 15.50-15.53). El análisis de estas estructuras indica que se trata de agregados multilaminares, formados por varias capas dispuestas de forma aproximadamente paralela entre ellas. El grosor de estas placas es de ~ 10 nm. Este valor es similar al que corresponde a placas individuales, lo que indica que no existe interdigitación entre estas placas. En las zonas de estos agregados en las que existe interdigitación resulta imposible realizar las medidas de grosor de placas individuales porque la estructura es demasiado compacta y no se distinguen las líneas correspondientes a placas independientes (ver Figura 15.54).

Al analizar las secciones de placas presentes en los tomogramas adquiridos a $27000\times$ y sin emplear placa de fase, puede observarse la presencia de líneas transversales relativamente intensas (Figura 15.19). La distancia entre estas líneas es de 5.2 nm (ver Tabla 15.1). Cuando se analizan las líneas de placa en tomogramas adquiridos a $33000\times$ y empleando la placa de fase (Figura 15.57), se obtiene un promedio



Figura 17.1: Interdigitación entre nucleosomas de capas adyacentes según el modelo de placas para el cromosoma metafásico. Fuente: Castro-Hartmann et al. (2010), Figura 6.

semejante (5.3 nm, ver Tabla 15.1). Estas medidas son superiores al espaciado entre líneas transversales observado en estudios previos de muestras deshidratadas mediante tomografía electrónica (4.0 nm; Castro-Hartmann et al., 2010). De nuevo, la deshidratación podría explicar estas diferencias entre ambas medidas. La distancia entre líneas en las placas y en los nucleosomas individuales con orientaciones aleatorias es la misma (aproximadamente 5 nm), sin embargo, es superior a la distancia entre vueltas de DNA en las columnas de nucleosomas apilados de forma regular a través de sus caras laterales (2.8 nm; Finch et al., 1977; Uberbacher y Bunick, 1985; Leforestier et al., 1999); lo cual indica que los nucleosomas en las placas están dispuestos de manera irregular. También estos resultados, obtenidos con cromatina metafásica en medio acuoso vitrificado y sin ningún tipo de sustrato, son coherentes con la estructura interna del cromosoma metafásico propuesto en el modelo de las placas delgadas.

Parte V

CONCLUSIÓN FINAL

Capítulo 18

Conclusiones

1. Los resultados obtenidos mediante microscopía TEM sobre la estructura de la cromatina emanada de núcleos interfásicos, muestran que las fibras de cromatina sólo son visibles en condiciones de muy baja concentración iónica, en presencia de EDTA. En condiciones iónicas interfásicas se observan estructuras amorfas y placas de cromatina.
2. El análisis de la estructura de la cromatina en las fases G_1 , S y G_2 indica que las placas están presentes a lo largo de toda la interfase. A medida que el ciclo celular avanza, la compactación de las placas aumenta.
3. Los resultados obtenidos indican que, en comparación con las placas procedentes de cromosomas metafásicos, las placas interfásicas generalmente son de dimensiones más reducidas, a menudo tienen una morfología alargada y presentan poca tendencia al apilamiento. La falta de cohesión entre placas podría estar relacionada con el aumento de accesibilidad del DNA que se requiere durante los procesos de transcripción y replicación.
4. Los experimentos realizados con fragmentos de cromatina interfásica indican que existe una clara tendencia de la cromatina a autoasociarse para formar estructuras laminares. Utilizando fragmentos de cromatina procedentes de núcleos en las fases G_1 , S y G_2 también se observa que, en todos los casos, se forman placas por autoasociación. Las placas formadas en la interfase temprana son pequeñas y laxas; las placas en la interfase tardía presentan tamaños mayores y un aumento en la compactación.
5. Se ha realizado un análisis mediante crio-ET de la cromatina emanada de cromosomas metafásicos de células humanas. Los resultados obtenidos demuestran que en medio acuoso vitrificado, en ausencia de sustratos y en condiciones iónicas próximas a la metafase, la cromatina presenta estructura laminar.
6. En estas preparaciones no se han observado fibras largas de cromatina. Ocasionalmente, se han detectado cuerpos cilíndricos de aproximadamente 30 nm de diámetro. La reconstrucción tridimensional indica que son fibras cortas de cromatina (longitud 20-30 nm) que, aparentemente, tienen la misma estructura que

los solenoides interdigitados compactos que habían sido descritos en estudios previos en nuestro laboratorio. También se ha observado que estas pequeñas fibras pueden ser desestructuradas y absorbidas por las placas de cromatina.

7. Las reconstrucciones tridimensionales de muchos crio-tomogramas han permitido analizar gran cantidad de placas. Algunas de ellas tienen dimensiones superiores a $1 \mu\text{m}$ y una anchura tan grande como todo el espesor del hielo en las crio-preparaciones (200-400 nm). El grosor de las placas es de ~ 10 nm. Esta medida corresponde aproximadamente al diámetro del nucleosoma.
8. En las placas desestructuradas pueden visualizarse claramente nucleosomas bien separados, pero en las placas compactas sólo se observan líneas transversales que tienen un mayor contraste, que corresponden al DNA nucleosomal. La distancia entre estas líneas (~ 5 nm) es la misma que se observa, en estas preparaciones, entre las líneas visibles en el interior de nucleosomas individuales con diversas orientaciones. Por lo tanto, estos resultados indican que los nucleosomas en las placas están dispuestos irregularmente.
9. Se ha observado frecuentemente que las placas pueden interactuar a través de sus bordes, dando lugar a estructuras cilíndricas. También se ha observado frecuentemente que las placas interactúan lateralmente formando bicapas y, en algunas ocasiones, multicapas que pueden llegar a tener las dimensiones de una cromátida ($\sim 0.6 \mu\text{m}$). Tanto los contactos entre bordes, como los contactos laterales, se justifican por el aumento de estabilidad que se genera cuando disminuye el número de nucleosomas expuestos al medio.
10. El grosor de dos placas en contacto es ~ 16 nm. Este valor es significativamente menor que el esperado para dos placas individuales (~ 20 nm). De acuerdo con observaciones anteriores realizadas en nuestro laboratorio, estos resultados indican que los nucleosomas de ambas placas se interdigitan. En estas estructuras, la distancia entre los centros de dos placas adyacentes es de ~ 6 nm.
11. En una estructura multilaminar interdigitada, los nucleosomas pueden interactuar lateralmente. La distancia entre nucleosomas con interacción lateral es ~ 6 nm. Esta distancia repetida, y la distancia entre placas apiladas, coincide con la difracción dominante a ~ 6 nm observada en los experimentos de SAXS para cromosomas en presencia de cationes a la concentración correspondiente a la metafase.
12. En conjunto, todos estos resultados refuerzan el modelo de las capas finas de cromatina para la estructura del cromosoma metafásico. La existencia de placas en interfase sugiere que, además de proteger el DNA, estas estructuras laminares deben participar en las diversas funciones de la cromatina a lo largo del ciclo celular.

Parte VI

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. y Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7):36–42.
- Agulleiro, J. I. y Fernández, J. J. (2012). Fast tomographic reconstruction on multicore computers. *Bioinformatics*, 27(4):582–583.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 5ª edición.
- 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 U S A*, 88(22):10148–10152.
- Arents, G. y Moudrianakis, E. (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22):10489–10493.
- Bárcena, M. y Koster, A. J. (2009). Electron tomography in life science. *Semin Cell Dev Biol*, 20(8):920–930.
- Bartolomé, S., Bermúdez, A. y Daban, J.-R. (1994). Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. *J Cell Sci*, 107(11):2983–2992.
- Bartolomé, S., Bermúdez, A. y Daban, J.-R. (1995). Electrophoresis of chromatin on non-denaturing agarose gels containing Mg²⁺. Self-assembly of small chromatin fragments and folding of the 30 nm fiber. *J Biol Chem*, 270(38):22514–22521.
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J. y Woodcock, C. L. (1998). Nucleosome, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24):14173–14178.
- Benov, L. y Al-Ibraheem, J. (2002). Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. *J Biochem Mol Biol*, 35(4):428–431.
- 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(12):1707–1715.
- Bianchi, M. E. y Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 15(5):496–506.
- Bordas, J., Perez-Grau, L., Koch, M. H. J., Vega, M. C. y Nave, C. (1986). The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. II. Theoretical analysis of the X-ray scattering patterns and model calculations. *Eur Biophys J*, 13(3):175–185.
- Bouchet-Marquis, C., Dubochet, J. y Fakan, S. (2006). Cryoelectron microscopy of vitrified sections: a new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. *Histochem Cell Biol*, 125(1–2):43–51.
- Boulé, J.-B., Mozziconacci, J. y Lavelle, C. (2015). The polymorphisms of the chromatin fiber. *J Phys: Condens Matter*, 27(3):033101.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 26(3):152–153.
- Bustin, M. y Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 54:35–100.
- Caño, S. (2003). Estudio de las condiciones de formación y de la estructura de los agregados de cromatina. Trabajo experimental de tercer ciclo, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Caño, S. (2007). *Estructura de la cromatina condensada*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Caño, S., Caravaca, J. M., Martín, M. y Daban, J.-R. (2006). Highly compact folding of chromatin induced by cellular cation concentration. Evidence from atomic force microscopy studies in aqueous solution. *Eur Biophys J*, 35(6):495–501.
- Caravaca, J. M. (2004). *Elementos estructurales de la cromatina en los cromosomas mitóticos*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Caravaca, J. M., Caño, S., Gállego, I. y Daban, J.-R. (2005). Structural elements of bulk chromatin within metaphase chromosomes. *Chromosome Res*, 13(7):725–743.

- Castaña-Díez, D., Kudryashev, M., Arbeit, M. y Stahlberg, H. (2012). Dynamo: A flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments. *J Struct Biol*, 178(2):139–151.
- Castro-Hartmann, P., Milla, M. y Daban, J.-R. (2010). Irregular orientation of nucleosomes in the well-defined chromatin plates of metaphase chromosomes. *Biochemistry*, 49(19):4043–4050.
- Catez, F. y Hock, R. (2010). Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: Lessons from live cell imaging. *Biochim Biophys Acta*, 1799(1-2):15–27.
- 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(1):31–44.
- Coggins, L. W. (1987). *Electron microscopy in molecular biology: A practical approach*, capítulo: Preparation of nucleic acids for electron microscopy, páginas 1–29. IRL Press, Oxford.
- Collepardo-Guevara, R. y Schlick, T. (2014). Chromatin fiber polymorphism triggered by variation of DNA linker lengths. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(22):8061–8066.
- Collins, T. R., Hammes, G. G. y Hsieh, T. S. (2009). Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective. *Nucleic Acids Res*, 37(3):712–720.
- Craig, J. (1999). *Chromosome structural analysis*, capítulo: Isolation of vertebrate metaphase chromosomes and their analysis by FISH (protocolo 3), páginas 59–80. W. A. Bickmore, editor. The practical approach series. Oxford University press, Oxford, New York.
- 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(14):3861–3866.
- Daban, J.-R. (2003). High concentration of DNA in condensed chromatin. *Biochem Cell Biol*, 81(3):91–99.
- Daban, J.-R. (2011). Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and metaphase chromosome structure. *Micron*, 42(8):733–750.
- Daban, J.-R. (2014). The energy components of stacked chromatin layers explain the morphology, dimensions and mechanical properties of metaphase chromosomes. *J R Soc Interface*, 11(92):20131043.
- Daban, J.-R. y Bermúdez, A. (1998). Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry*, 37(13):4299–4304.
- Daban, J.-R. y Cantor, C. R. (1982a). Role of histone pairs H2A,H2B and H3,H4 in the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 156(4):771–789.
- Daban, J.-R. y Cantor, C. R. (1982b). Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 156(4):749–769.
- Danev, R., Buijsse, B., Khoshouei, M., Plitzko, J. M. y Baumeister, W. (2014). Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(44):15635–15640.
- Dehghani, H., Dellaire, G. y Bazett-Jones, D. P. (2005). Organization of chromatin in the interphase mammalian cell. *Micron*, 36(2):95–108.
- Dekker, J. (2008). Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggest an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *J Biol Chem*, 283(50):34532–34540.
- Depken, M. y Schiessel, H. (2009). Nucleosome shape dictates chromatin fiber structure. *Biophys J*, 96(3):777–784.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R. y Richmond, T. J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, 306(5701):1571–1573.
- Dubochet, J. y Noll, M. (1978). Nucleosome arcs and helices. *Science*, 202(4365):280–286.
- Dunn, B. y Wobbe, C. R. (2001). *Preparation of Protein Extracts from Yeast*, volumen 23 en *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo: 13.13. John Wiley & Sons, Inc.
- DuPraw, E. J. (1966). Evidence for a “folded-fibre” organization in human chromosomes. *Nature*, 209(5023):577–581.
- 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(5):1706–1715.
- Earnshaw, W. C. y Heck, M. M. (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J Cell Biol*, 100(5):1716–1725.
- Earnshaw, W. C. y Laemmli, U. K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J Cell Biol*, 96(1):84–93.
- Eltsov, M., Maclellan, K. M., Frangakis, A. S. y Dubochet, J. (2008). Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of

- 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50):19732–19737.
- Fernández, J. J. (2009). TOMOBFLOW: feature-preserving noise filtering for electron tomography. *BMC Bioinformatics*, 10:178.
- Finch, J. T. y Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(6):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(5623):29–36.
- Fonfría-Subirós, E., Acosta-Reyes, F., Saperas, N., Pous, J., Subirana, J. y Campos, J. (2012). Crystal structure of a complex of DNA with one AT-Hook of HMGA1. *PLoS ONE*, 7(5):e37120.
- Gállego, I. (2010). *Estructura y propiedades de las placas de cromatina de los cromosomas metafásicos: Estudio mediante técnicas de microscopía TEM, AFM y espectroscopía de fuerza atómica*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Biociències.
- Gállego, I., Castro-Hartmann, P., Caravaca, J. M., Caño, S. y Daban, J.-R. (2009). Dense chromatin plates in metaphase chromosomes. *Eur Biophys J*, 38(4):503–522.
- Gállego, I., Sisquella, X., Fernández-Busquets, X. y Daban, J.-R. (2010). Nanotribology results show that DNA forms a mechanically resistant 2D network in metaphase chromatin plates. *Biophys J*, 99(12):3951–3958.
- 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(4):613–629.
- Hammersley, A. P. (1997). FIT2D: An introduction and overview. In *ESRF Internal Report*, number ESRF97HA02T, ESRF: Grenoble, France.
- Hammersley, A. P. (1998). FIT2D V9.129 Reference Manual V3.1. In *ESRF Internal Report*, number ESRF98HA01T, ESRF: Grenoble, France.
- Hang, H. y Fox, M. H. (2004). Analysis of the mammalian cell cycle by flow cytometry. En Lieberman, H., editor, *Cell Cycle Checkpoint Control Protocols*, volumen 241 de *Methods in Molecular Biology*, páginas 23–35. Humana Press.
- Harp, J. M., Hanson, B. L., Timm, D. E. y Bunick, G. J. (2000). Assymetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(12):1513–1534.
- Harris, J. R. (2015). Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey. *Arch Biochem Biophys*, 581:3–18.
- Heymann, J. B. (2001). Bsoft: Image and molecular processing in electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 133(2-3):156–169.
- Hirano, T. y Mitchinson, T. J. (1991). Cell cycle control of higher-order chromatin assembly around naked DNA in vitro. *J Cell Biol*, 115(6):1479–1489.
- Horowitz-Scherer, R. A. y Woodcock, C. L. (2006). Organization of interphase chromatin. *Chromosoma*, 115(1):1–14.
- Hrabe, T., Chen, Y., Pfeffer, S., Cuellas, L. K., Mangold, A. V. y Förster, F. (2012). PyTom: a python-based tool for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis. *J Struct Biol*, 178(2):177–188.
- Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G. y Schwarzenberger, K. (2012). Flow cytometry. *J Invest Dermatol*, 132(10):e1.
- Jepsson, K., Kanno, T., Shirahige, K. y Sjögren, C. (2014). The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(9):601–614.
- Kawamura, R., Pope, L. H., Christensen, M. O., Sun, M., Terekhova, K., Boege, F., Mielke, C., Andersen, A. H. y Marko, J. F. (2010). Mitotic chromosomes are constrained by topoisomerase II-sensitive DNA entanglements. *J Cell Biol*, 188(5):653–663.
- Kepper, N., Foethke, D., Stehr, R., Wedemann, G. y Rippe, K. (2008). Nucleosome geometry and internucleosomal interaction control the chromatin fiber formation. *Biophysical Journal*, 95(8):3692–3705.
- Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T. y Belmont, A. S. (2004). Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol*, 166(6):775–785.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. y Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr*, 36:1277–1282.
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., y McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using imod. *J Struct Biol*, 116(1):71–76.
- Laitinen, J., Stenius, K., Eloranta, T. O. y Hoölttä, E. (1998). Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic changes of chromatin during the cell cycle. *J Cell Biochem*, 68(2):200–212.
- Leforestier, A., Dubochet, J. y Livolant, F. (2001). Bilayers of nucleosome core particles. *Biophys J*, 81(4):2414–2421.

- Leforestier, A., Fudaley, S. y Livolant, F. (1999). Spermidine-induced aggregation of nucleosome core particles: evidence for multiple liquid crystalline phases. *J Mol Biol*, 290(2):481–494.
- Leforestier, A. y Livolant, F. (1997). Liquid crystalline ordering of nucleosome core particles under macromolecular crowding conditions: evidence for a discotic columnar hexagonal phase. *Biophys J*, 73(4):1771–1776.
- Leuba, S. H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K. y Zlatanova, J. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(24):11621–11625.
- Losada, A. y Hirano, T. (2001). Intermolecular DNA interactions stimulated by the cohesin complex in vitro: implications for sister chromatid cohesion. *Curr Biol*, 11(4):268–272.
- Lučić, V., Rigort, A. y Baumeister, W. (2013). Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ. *J Cell Biol*, 202(3):407–419.
- 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(6648):251–260.
- Maeshima, K., Hihara, S. y Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol*, 22(3):291–297.
- Mangenot, S., Leforestier, A., Durand, D. y Livolant, F. (2003). Phase diagram of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 333(5):907–916.
- Marsden, M. P. F. y Laemmli, U. K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, 17(4):849–858.
- Mastronarde, D. N. (2005). Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol*, 152(1):36–51.
- McDowall, A. W., Smith, J. M. y Dubochet, J. (1986). Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *EMBO J*, 5(6):1395–1402.
- McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D. y Henderson, R. (2014). Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 147:156–163.
- Milla, M. (2011). *Plaques de cromatina dels cromosomes metafàsics: estructura i autoassociació*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Milla, M. y Daban, J.-R. (2012). Self-assembly of thin plates from micrococcal nuclease-digested chromatin of metaphase chromosomes. *Biophys J*, 103(3):567–575.
- Milne, J. L. S., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Tran, E. E. H., Earl, L. A., Schauder, D. M., Lengyel, J., Pierson, J., Patwardhan, A. y Subramaniam, S. (2013). Cryo-electron microscopy: A primer for the non-microscopist. *FEBS J*, 280(1):28–45.
- Moser, S. C. y Swedlow, J. R. (2011). How to be a mitotic chromosome. *Chromosome Res*, 19(3):307–319.
- Narayanswamy, S. y Hamkalo, B. A. (1987). *Electron microscopy in molecular biology. A practical approach*, capítulo: Hibridization to chromatin and whole chromosome mounts, páginas 215–232. J. Somerville and U. Scheers, editores. The practical approach series. IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis, A. S., Imamoto, N., Ishikawa, T. y Maeshima, K. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J*, 31(7):1644–1653.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F. y Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, 115(1):109–121.
- Ormerod, M. G., editor (2000). *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Practical Approach Series. Oxford University press, 3ª edición.
- Paulson, J. R. y Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3):817–828.
- Poirier, M. G. y Marko, J. F. (2002). Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24):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(2):422–434.
- Poonperm, R., Takata, H., Hamano, T., Matsuda, A., Uchiyama, S., Hiraoka, Y. y Fukui, K. (2015). Chromosome scaffold is a double-stranded assembly of scaffold proteins. *Scientific reports*, 5:11916.
- Rattner, J. B. y Hamkalo, B. A. (1979). Nucleosome packing in interphase chromatin. *J Cell Biol*, 81(2):453–457.

- Rattner, J. B. y Lin, C. C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell*, 42(1):291–296.
- Reeves, R. (2010). Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1799(1-2):3–14.
- Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M. y Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell*, 160(6):1145–1158.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. y Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, 311(5986):532–537.
- Rill, R. L., Shaw, B. R. y van Holde, K. E. (1978). *Methods in Cell Biology*, volumen 18, capítulo: Isolation and characterization of chromatin subunits, páginas 69–103. Academic Press, Inc.
- Robinson, P. J. J., Fairall, L., Huynh, V. A. T. y Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17):6506–6511.
- 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(4):609–622.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D. F. y Richmond, T. J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, 436(7047):138–141.
- Schnablegger, H. y Singh, Y. (2013). *The SAXS Guide*. Anton Paar GmbH, 3ª edición.
- Schröder, R. R. (2015). Advances in electron microscopy: A qualitative view of instrumentation development for macromolecular imaging and tomography. *Arch Biochem Biophys*, 581:25–38.
- Sogo, J. M., Stahl, H., Koller, T. y Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J Mol Biol*, 189(1):189–204.
- Song, F., Chen, P., Sun, D., Wang, M., Dong, L., Liang, D., Xi, R.-M., Zhu, P. y Li, G. (2014). Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science*, 344(6182):376–380.
- Sorzano, C. O. S., Marabini, R., Velázquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J. R., Scheres, S. H. W., Carazo, J. M. y Pascual-Montano, A. (2004). XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol*, 148(2):194–204.
- Strour, E. F. y Jordan, C. T. (2002). Isolation and characterization of primitive hematopoietic cells based on their position in the cell cycle. En *Hematopoietic Stem Cell Protocols*, volumen 63 de *Methods in Molecular Medicine*, páginas 93–111. Humana Press.
- Stehr, R., Schöpfflin, R., Ettig, R., Kepper, N., Rippe, K. y Wedemann, G. (2010). Exploring the conformational space of chromatin fibers and their stability by numerical dynamic phase diagrams. *Biophys J*, 98(6):1028–1037.
- 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(6):899–910.
- Subirana, J. A., Muñoz-Guerra, S., Aymamí, J., Radermacher, M. y Frank, J. (1985). The layered organization of nucleosomes in 30 nm chromatin fibers. *Chromosoma*, 91(5):377–390.
- Tanaka, T., Fuchs, J., Loidl, J. y Nasmyth, K. (2000). Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol*, 2(8):492–499.
- Tatchell, K. y van Holde, K. E. (1978). Compact oligomers and nucleosome phasing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(8):3583–3587.
- Tavormina, P. A., Côme, M. G., Hudson, J. R., Mo, Y. Y. y Beck, W. T. (2002). Rapid exchange of mammalian topoisomerase II α at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J Cell Biol*, 158(1):23–29.
- Thoma, F., Koller, T. 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(2):403–427.
- Tremethick, D. J. (2007). Higher-order structure of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128(4):651–654.
- Uberbacher, E. C. y Bunick, G. J. (1985). X-ray structure of the nucleosome core particle. *J Biomol Struct Dyn*, 2(6):1033–1055.
- Uberbacher, E. C. y Bunick, G. J. (1989). Structure of nucleosome core particle at 8 Å resolution. *J Biomol Struct Dyn*, 7(1):1–18.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K. y Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell*, 50(6):917–925.
- van Holde, K. (1989). *Chromatin*. Springer series in Molecular Biology. Springer-Verlag, New York.
- van Holde, K. y Zlatanova, J. (2007). Chromatin fiber structure: Where is the problem now? *Semin Cell Dev Biol*, 18(5):651–658.

- Vanhecke, D., Asano, S., Kochovski, Z., Fernandez-Busnadiego, R., Schrod, N., Baumeister, W. y Lučić, V. (2011). Cryo-electron tomography: methodology, development and biological applications. *J Microsc*, 242(3):221–227.
- Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H. y Berger, J. M. (2011). All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(12):827–841.
- Watanabe, S.-I., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H. y Igarashi, K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem*, 266(31):20803–20809.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2003). *Molecular Biology of the Gene*. Pearson Education, 5^a edición.
- Watson, J. y Crick, F. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738.
- White, C. L., Suto, R. K. y Luger, K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interaction. *EMBO J*, 20(18):5207–5218.
- 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(3):411–424.
- 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(1):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(1):233–248.
- Wolf, F. I. y Cittadini, A. (1999). Magnesium in cell proliferation and differentiation. *Front Biosci*, 4:d607–617.
- Wolffe, A. (1998). *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press, London, San Diego, 3^a edición.
- Wood, E. R. y Earnshaw, W. C. (1990). Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. *J Cell Biol*, 111(6):2839–2850.
- Woodcock, C., Frado, L. y Rattner, J. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol*, 99:42–52.
- Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A. y Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19):9021–9025.
- Zlatanova, J., Bishop, T. C., Victor, J.-M., Jackson, V. y van Holde, K. (2009). The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure*, 17(2):160–171.
- Zlatanova, J., Leuba, S. H., Yang, G., Bustamante, C. y van Holde, K. (1994). Linker DNA accessibility in chromatin fibers of different conformations: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12):5277–5280.

Parte VII
APÉNDICES

Apéndice A

Índice de Figuras

1.1.	Representación esquemática de la estructura de las proteínas histona	4
1.2.	Familias de proteínas HMG	6
1.3.	Mecanismo de relajación del DNA por parte de la topoisomerasa II	7
1.4.	Composición y estructura de los complejos SMC	8
2.1.	Estructura de la partícula núcleo del nucleosoma	10
2.2.	Interacción entre partículas núcleo	12
3.1.	Micrografías de TEM de fibras de cromatina	16
3.2.	Modelos estructurales para la fibra de cromatina de 30 nm	17
3.3.	Modelo de solenoide para la fibra de cromatina	18
3.4.	Modelo de doble hélice con DNA <i>linker</i> cruzado para la fibra de cromatina	19
3.5.	Modelo teórico de hélice de doble origen con DNA <i>linker</i> cruzado para la fibra de cromatina	20
3.6.	Modelo de solenoide interdigitado compacto para la fibra de cromatina	21
3.7.	Modelo helicoidal interdigitado compacto para la fibra de cromatina	22
4.1.	Fases del ciclo celular	24
4.2.	Modelo de polímero fundido para la cromatina	26
4.3.	Modelos estructurales para el cromosoma metafásico	29
4.4.	Placas de cromatina en torno a cromosomas metafásicos parcialmente desnaturalizados	30
4.5.	Modelo de láminas finas de cromatina para el cromosoma metafásico	31
4.6.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina procedente de cromosomas metafásicos	32

5.1.	Representación esquemática del proceso de separación celular mediante citometría de flujo	35
5.2.	El ciclo celular analizado mediante citometría de flujo	36
5.3.	Esquema del proceso de observación de muestras mediante crio-EM y obtención de tomogramas	40
7.1.	Cámara para la diálisis de muestra sobre rejilla	48
7.2.	Deposición del film de carbono sobre rejillas	52
7.3.	Activación del film de carbono de las rejillas para microscopía	53
7.4.	Esquema del sistema empleado para la extensión de muestras sobre rejillas mediante centrifugación	54
7.5.	Sistema de criofijación de muestras Leica EM CPC	56
8.1.	Esquema del gradiente bifásico empleado para la purificación de núcleos	60
9.1.	Análisis del ciclo celular de núcleos interfásicos mediante citometría de flujo	66
10.1.	Esquema del gradiente escalonado empleado para la purificación de cromosomas	73
10.2.	Estación experimental de la línea NCD en ALBA	74
10.3.	Ejemplo de la representación gráfica obtenida utilizando el programa ATSAS Primus	76
10.4.	Sistema de criofijación de muestras Vitrobot Mark III (FEI)	78
11.1.	Núcleos interfásicos incubados en presencia de Mg^{2+} 1 y 2 mM	86
11.2.	Núcleos interfásicos incubados en presencia de Mg^{2+} 3, 4 y 5 mM	86
11.3.	Núcleos interfásicos incubados en presencia de EDTA 10 mM	89
11.4.	Núcleos interfásicos incubados en presencia de tampón PM	90
11.5.	Núcleos interfásicos desestructurados por paso a través de aguja a presión	92
11.6.	Núcleos interfásicos desestructurados mediante ultrasonidos	93
11.7.	Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio	94
11.8.	Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio y dializados con tampón PMKN	96
11.9.	Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN con Mg^{2+} 2.5 mM	97
11.10.	Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN con Mg^{2+} 2.5 mM (2)	98

11.11. Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN con Mg^{2+} 5 mM	98
11.12. Núcleos interfásicos desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN con Mg^{2+} 5 mM (2)	99
12.1. Núcleos interfásicos en fase G_1 desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN	102
12.2. Núcleos interfásicos en fase G_1 desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en tubo con tampón PMKN	103
12.3. Núcleos interfásicos en fase G_1 desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en cámara con tampón PMKN (2)	103
12.4. Núcleos interfásicos en fase S desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN	105
12.5. Núcleos interfásicos en fase S desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en tubo con tampón PMKN	106
12.6. Núcleos interfásicos en fase G_2 desestructurados por agitación en presencia de bolas de vidrio e incubados en cámara con tampón PMKN	107
12.7. Núcleos interfásicos en fase G_2 desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en cámara con tampón PMKN	108
12.8. Núcleos interfásicos en fase G_2 desestructurados por paso a través de aguja a presión e incubados en cámara con tampón PMKN (2)	109
13.1. Micrografías de TEM de cromatina interfásica digerida con nucleasa micrococal	112
13.2. Análisis del resultado de la digestión con nucleasa micrococal mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa	113
13.3. Agregados de cromatina interfásica formados por autoasociación de fragmentos dializados en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	114
13.4. Agregados de cromatina formados por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica dializados en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM (2)	115
13.5. Agregado del que emanan placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 5 mM	116

13.6.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 5 mM	116
13.7.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 5 mM (2)	117
13.8.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 10 mM	118
13.9.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 10 mM (2)	119
13.10.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 10 mM (3)	120
13.11.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 17 mM	121
13.12.	Placas formadas por autoasociación de fragmentos de cromatina interfásica en presencia de Mg^{2+} 17 mM (2)	122
13.13.	Agregados y placas de cromatina junto a gran cantidad de cuerpos de 30 nm	124
13.14.	Agregado del que emanan placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 y en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	125
13.15.	Placas de diversos tamaños obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 y en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	126
13.16.	Placas en formación obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 y en presencia de Mg^{2+} 5 mM	126
13.17.	Más ejemplos de placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_1 y en presencia de Mg^{2+} 5 mM	127
13.18.	Placas en formación por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S y en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	127
13.19.	Agregados laminares obtenidos por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S y en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	128
13.20.	Placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S y en presencia de Mg^{2+} 5 mM	129
13.21.	Más ejemplos de placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase S y en presencia de Mg^{2+} 5 mM	129
13.22.	Placas en formación obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_2 y en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	130
13.23.	Placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_2 y en presencia de Mg^{2+} 2.5 mM	131
13.24.	Más ejemplos de placas obtenidas por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G_2 y en presencia de Mg^{2+} 5 mM	131

13.25.	Grandes agregados laminares obtenidos por autoasociación de fragmentos de cromatina en fase G ₂ y en presencia de Mg ²⁺ 5 mM	132
14.1.	Micrografías de cromosomas purificados a través de gradiente escalonado de sacarosa	134
14.2.	Cromosoma con emanaciones laminares	135
14.3.	Pequeños agregados circulares de cromatina metafásica de 30 nm de diámetro	135
14.4.	Perfiles de SAXS de cromosomas metafásicos adquiridos en presencia de diversas condiciones iónicas	137
15.1.	Placas de cromatina obtenidas a partir de cromosomas purificados, desestructurados tras pasar la suspensión de cromosomas 15 veces a través de aguja a presión y dializados en presencia de Mg ²⁺ 17 mM	140
15.2.	Placas de cromatina obtenidas a partir de cromosomas purificados, desestructurados tras pasar la suspensión de cromosomas 20 veces a través de aguja a presión y dializados en presencia de Mg ²⁺ 5 mM	141
15.3.	Placas de cromatina obtenidas a partir de cromosomas purificados, desestructurados tras pasar la suspensión de cromosomas 5 veces a través de aguja a presión y dializados en presencia de Mg ²⁺ 5 mM	142
15.4.	Imágenes de crio-TEM de placas de cromatina metafásica depositadas sobre rejillas para criomicroscopía mediante curación a diversos tiempos	143
15.5.	Micrografías de placas de cromatina metafásica depositadas sobre rejillas para criomicroscopía mediante centrifugación adquiridas en condiciones criogénicas	144
15.6.	Micrografías de placas de cromatina metafásica depositadas sobre rejillas para criomicroscopía mediante centrifugación	144
15.7.	Representación esquemática de la observación de una placa reconstruida mediante crio-ET	145
15.8.	Proyecciones XY, XZ e YZ correspondientes a una vista general de un volumen reconstruido a 27500× mediante crio-ET	146
15.9.	Placa de cromatina sometida a compresión debido a las dimensiones reducidas del hielo vítreo en el eje Z	147
15.10.	Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa obtenida a partir de imágenes de crio-ET adquiridas a 27500×	148
15.11.	Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa obtenida a partir de imágenes de crio-ET adquiridas a 27500×	148

15.12. Medidas de grosor de placas de cromatina metafásica reconstruidas a partir de imágenes de crio-ET adquiridas a $27500\times$	149
15.13. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional correspondiente a una placa cerrada sobre sí misma adoptando una forma cilíndrica	150
15.14. Reconstrucción tridimensional mediante crio-ET del contacto entre dos placas de cromatina	150
15.15. Reconstrucción tridimensional mediante crio-ET del contacto entre dos placas de cromatina	151
15.16. Grosor de contactos entre dos placas de cromatina metafásica en reconstrucciones tridimensionales obtenidas a partir de imágenes de crio-ET adquiridas a $27500\times$	152
15.17. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional correspondiente a un agregado multilaminar	153
15.18. Capturas de secciones sucesivas del agregado multilaminar mostrado en la Figura 15.17	153
15.19. Ejemplos de ampliaciones correspondientes a reconstrucciones de placas donde se aprecia un interlineado interno	154
15.20. Distancia entre las líneas internas encontradas en las placas de cromatina en reconstrucciones tridimensionales obtenidas a partir de imágenes de crio-ET adquiridas a $27500\times$	155
15.21. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de un gran agregado desestructurado	156
15.22. Capturas de secciones sucesivas del agregado desestructurado mostrado en la Figura 15.21	156
15.23. Comparación de dos tomogramas adquiridos con y sin placa de fase Volta	157
15.24. Vista general de un volumen reconstruido mediante crio-ET adquirido a 300 kV empleando placa de fase Volta	158
15.25. Ejemplos de solenoides interdigitados encontrados en reconstrucciones tridimensionales realizadas mediante crio-ET	159
15.26. Ejemplo de solenoide interdigitado incorporado parcialmente a una placa de cromatina. Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de crio-ET a $33000\times$	160
15.27. Tamaño de los agregados de cromatina en forma de solenoide interdigitado encontrados en reconstrucciones obtenidas a partir de tomogramas adquiridos con placa de fase Volta	161
15.28. Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina	161
15.29. Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina curvada	162
15.30. Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina (2)	162
15.31. Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de dos placas de cromatina	163

15.32. Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma compleja	163
15.33. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma compleja (2) . .	164
15.34. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma compleja (3) . .	164
15.35. Medidas de grosor de placas de cromatina metafásica reconstruidas a partir de criotomogramas adquiridos utilizando placa de fase Volta	165
15.36. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma de espiral . . .	166
15.37. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina con forma cilíndrica	166
15.38. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de dos placas de cromatina con forma cilíndrica (2) .	167
15.39. Reconstrucciones tridimensionales de dos placas cerradas sobre sí mismas que adoptan diversas formas	167
15.40. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de una placa de cromatina cerrada sobre sí misma. Seguimiento a través del volumen reconstruido	168
15.41. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional del contacto entre dos placas de cromatina	169
15.42. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional del contacto entre dos placas de cromatina (2)	170
15.43. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional del contacto entre dos placas de cromatina (3)	170
15.44. Seguimiento de dos contactos entre placas de cromatina a lo largo de diversas secciones (plano XY) de un volumen reconstruido a partir de un crio-tomograma obtenido a 33000×171	
15.45. Seguimiento de un contacto entre dos placas de cromatina a lo largo de 20 secciones de un volumen reconstruido . . .	171
15.46. Seguimiento de dos contactos entre dos placas de cromatina a lo largo de diversas secciones de un volumen reconstruido	172
15.47. Seguimiento de un contacto entre dos placas de cromatina a lo largo de 25 secciones de un volumen reconstruido . . .	172
15.48. Medidas de grosor de contactos entre placas de cromatina metafásica	173
15.49. Histograma correspondiente a las medidas del grosor de placas presentes en agregados multilaminares en reconstrucciones tridimensionales realizadas mediante crio-ET	174
15.50. Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina	174
15.51. Proyecciones XY, XZ e YZ de la reconstrucción tridimensional del agregado multilaminar presentado en la Figura 15.50	175

15.52. Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina (2)	176
15.53. Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina (3)	177
15.54. Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina de grandes dimensiones	178
15.55. Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina de grandes dimensiones. Seguimiento de la Zona1 a través del volumen.	179
15.56. Reconstrucción tridimensional de un agregado multilaminar de cromatina de grandes dimensiones. Seguimiento de la Zona2 a través del volumen.	180
15.57. Ejemplos de placas que presentan pequeñas líneas perpendiculares a la línea de placa	181
15.58. Histograma correspondiente a la distancia entre líneas internas de las placas presentes en reconstrucciones tridimensionales realizadas mediante crio-ET a partir de adquisiciones a 33000× y empleando la placa de fase Volta	181
15.59. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de placas de cromatina parcialmente desestructuradas	182
15.60. Seguimiento a través de diversas secciones de placas con zonas parcialmente desestructuradas que muestran nucleosomas	183
15.61. Proyecciones XY, XZ e YZ de una reconstrucción tridimensional de placas de cromatina parcialmente desestructuradas (2)	184
15.62. Seguimiento a través de diversas secciones de placas con zonas parcialmente desestructuradas	185
15.63. Seguimiento a través de diversas secciones de placas con zonas parcialmente desestructuradas (2)	186
15.64. Tamaño de las partículas circulares encontradas en placas parcialmente desestructuradas	187
17.1. Interdigitación entre nucleosomas de capas adyacentes según el modelo de placas para el cromosoma metafásico	197

Apéndice B

Índice de Tablas

2.1. Tipos de nucleosomas en función de la composición del núcleo proteico	11
4.1. Concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} a lo largo del ciclo celular .	25
7.1. Sistemas de filtración	49
7.2. Evaporación Carbono	51
8.1. Frascos de cultivo	59
9.1. Tampones empleados en la purificación de núcleos interfásicos	64
9.2. Tampones utilizados para el estudio de la cromatina interfásica	64
10.1. Tampones para provocar la lisis celular	72
10.2. Tampones estructurantes	72
15.1. Resumen de las medidas extraídas de las reconstrucciones tridimensionales obtenidas mediante crio-ET	188

Apéndice C

Símbolos y abreviaturas

$^{\circ}$	Grado
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
Å	Angstrom
aa	Aminoácidos
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
CCD	Dispositivo de carga acoplada
cm	Centímetro
crio-ET	Crio-tomografía electrónica
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	<i>et alter</i> , y colaboradores
FBS	Suero fetal bovino

FRAP	Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo
g	Gramo
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
h	Hora
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltio
l	Litro
M	Molar
m	Metro
mA	Miliamperio
mbar	Milibar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
nm	Nanómetro
NCP	Partícula núcleo del nucleosoma
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonil
PVS	Policloruro de vinilo
p/v	Peso/volumen
SAXS	Dispersión de rayos X a ángulo bajo
SDS	Dodecilsulfato sódico
Torr	Torricelli
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV	Ultravioleta

V	Voltio
v/v	Volumen/volumen

Apéndice D

Agradecimientos

Y llegó el momento de dar las gracias a todas las personas que, de un modo u otro, me han acompañado durante este viaje. Lo cierto es que hace ya unos años que aterricé en el departamento, donde he tenido la suerte de conocer a grandes científicos y mejores personas, que han contribuido a que me forme, no sólo como científica, sino también a nivel personal. Por eso quiero daros las gracias a cada uno de los que habéis ido llenando mi mochila, que llegó vacía, pero que se va cargada de buenos recuerdos.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias al Dr. Joan-Ramon Daban por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio y por contagiarme su entusiasmo por la ciencia. Por su enorme paciencia y por haber compartido conmigo su conocimiento científico y no tan científico.

A la UAB por concederme una beca PIF y por darme la oportunidad de realizar el doctorado en sus instalaciones.

Al sincrotrón ALBA-CELLS por habernos permitido realizar experimentos en la beamline BL11-NCD. Gracias también al personal técnico de la línea: Agneta, Marc, Cristina y Juan Carlos por la ayuda prestada.

Al programa INSTRUCT de la Unión Europea para Biología Estructural por habernos permitido utilizar la plataforma de crio-tomografía electrónica en el Max-Planck Institut für Biochemie (Martindried, Alemania), así como la plataforma de procesamiento de imágenes en el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid).

A Marco y Gerard, de la Unidad de Citometría del IGTP por ayudarme con la separación nuclear y por implicarse en mejorar el rendimiento de la separación.

A la Unitat de Crio-microscòpia electrònica (CCiT-UB), concretamente a Gema y Carmen por su trabajo impecable en la vitrificación y fractura de muestras. A Carmen, especialmente, por compartir con nosotros su enorme experiencia en la técnica de criofractura.

A Ben, del Max-Planck Institut für Biochemie (Martinsried, München) por su infinita ayuda en la preparación de muestras, en la adquisición de tomogramas y por

enseñarnos “el Titan”. Por su implicación en nuestros experimentos y por habernos ayudado a obtener un gran número de reconstrucciones. Ah! Y sobretodo, por enseñarnos la gastronomía bávara y por hacer que el trabajar a horas intempestivas fuese mucho más divertido.

A la Biocomputing Unit del CNB-CSIC por su ayuda con las reconstrucciones tomográficas. Especialmente a Kino, por su ayuda inestimable y su disponibilidad para responder mis mil y una dudas acerca de instalaciones, paquetes, algoritmos, filtros... Gracias también por haberte tomado la molestia de venir a ver mis reconstrucciones durante tus estancias en el sincrotrón y haberte esforzado en que entendiera conceptos físicos (no te debo una cerveza, te debo un camión cisterna entero!).

Al Servei de Microscòpia de la UAB, a todos y cada uno de sus miembros, por su asistencia en el uso del equipamiento y por haberme hecho sentir una más cada vez que bajaba (que no eran pocas!). A Alex, gracias por contagiarme tu buen rollo y alegrarme las muchas horas que he pasado en el bunker. A Pablo, por tu inmensa ayuda prestada con los microscopios, por salvarme muchas muestras crio y por hacer que las interminables horas de microscopía pasaran más rápido.

Al Servei de Cultius Cel·lulars del MRB (UAB) por proporcionarme células y espacio de trabajo para llevar a cabo los experimentos. Un agradecimiento especial a Fran, Silvia y Olga por hacer que las excursiones a cultivos fuesen divertidísimas y por engancharme para las performances navideñas.

Mil gracias también al *software* libre, sobre todo a las personas que hacen posible que hoy en día dispongamos de programas tan potentes como L^AT_EX. A pesar de todo, tampoco ha sido tan complicado escribir la tesis!! Gracias también a los desarrolladores de IMOD, Xmipp y ImageJ y a las personas suscritas a las *mailing lists* de estos programas, porque de forma altruista me han ayudado enormemente.

Gracias también a la familia cromatínica. En especial a Maria, por haberme iniciado en el mundillo de la cromatina y por haber compartido toda su experiencia conmigo, pero sobre todo por haberme enseñado que no todo es ciencia, y que cualquier momento es bueno para echar unas risas. Gracias también por haber tenido la paciencia de leer toda la tesis y por sus amables consejos (ets un solet amb un somriure que il·lumina el cel sencer!). A Pablo, por compartir conmigo su experiencia con la cromatina y por las birras de los viernes! (como las hecho de menos ahora mismo...) A Isaac, por introducirme en el mundo de L^AT_EX y su ayuda con las figuras (y menos mal! casi entro en estado de pánico!). A Silvia, por aportarme una visión práctica de la vida. Y a Eva, por los experimentos con RockFM de fondo, que eran los mejores de todos y por hacer que las jornadas maratónicas en el sincrotrón fuesen mucho más amenas. ¡Por más quedadas cromatínicas!

Gracias a mis compañeros del departamento, por hacer de mi paso por la torre de bioquímica una experiencia inolvidable; un recuerdo para toda la vida ¡Por esas conversaciones de pasillo (bombitas!), trapicheos de material, comidas, cafés y alguna que otra cerveza! Ha sido un placer trabajar a vuestro lado todo este tiempo y hacéis

que cada día sea un día genial. Gracias a Santi y Magda, por el esfuerzo diario para que todo funcione. Gracias a los vecinos de la cuarta planta! Sobre todo, por darme conversación en esta última etapa que he estado sola en el lab; de no ser por vosotros hubiese acabado hablando con el ordenador. Por los momentos con las plantófilas Mar, Laia y Ele (sois geniales, de verdad!). A los PFs, los que estaban, Marta y Gyo; y los que están, Laia, Gisela y Jofre. Gracias por vuestra amabilidad y simpatía! Gracias als kinàsics, Ton, Jordi y Fani por vuestra sonrisa inconfundible y por ser la alegría de la huerta! Siento haberos producido algún terremoto centrifugando... Als llevats Edu, Eva (pero a medias, eh!). Gracias también a la gran familia ADH: Sergio, Agrin, Julio, Joan, Raquel, Cristina, Iago, Isidre...(espero no dejarme a nadie!), por prestarme LB cuando estaba en apuros (jaja) y por poner buena música en la sala de cultius (eh Joan); siempre ha sido un placer dejarse caer por vuestro laboratorio! A las DNAs (Núria, Alicia, Rita) por los consejos cromatínicos. A PROs (Irantzu, Carla, Francisca, Jordi, Anna, Carla, Virginia...) por distraerme tantas veces he bajado a robaros la Heraeus, y por vuestra amabilidad y simpatía. A RIBO's (Mohammed, Javi, Vivian, Jose Antonio...) por darme conversación alguna que otra vez que he visitado las tierras bajas. Y a las chicas RMNs (Ana Paula, Miriam, Núria, Laura) por tantas prácticas compartidas, y por prestarme ayuda cuando la he necesitado. Un agradecimiento especial a mis compis de desayuno (a los de ahora, a los de antes...) Sergio, Mar, Maria, Laia, Eva, Julio, Fani, Helena, Chari, Irantzu y Salva (¿dónde quedaron los días en que no cabíamos en una mesa de madera del bar?). Por las conversaciones a la hora del café y las comilonas. Por haber compartido conmigo buenos momentos, pero también por apoyarme y aconsejarme en los peores. Gracias Irantzu, Chari y Helena; por aguantar mis neuras y porque de vosotras he aprendido mucho. Gracias Salva por aguantarme tantas veces, por las mil y una conversaciones científicas, y no tan científicas y por animarme cuando más lo he necesitado. Por las clases de spinning y por iniciarme en el running.

A mis amigos, a los que lo son desde hace años, y a los que no hace tanto que conozco pero que se han convertido en amigos para siempre. Por proporcionarme una vía de escape y por las juergas habidas y por haber! Un agradecimiento especial a Mònica y Alberto, por ser los mejores compis de piso que uno puede tener, y unos amigos aún mejores. ¡Mònica, prepárate, que volvemos a las andadas!

También quiero dar las gracias a mi familia, en especial a ama, aita, Digna, amoma, los tíos je y jo y mis pequeñas Paula y Amaia, así como también a los que no están. Gracias por creer en mí, por enseñarme a perseguir mis sueños y por darme las alas para volar hacia ellos. Gracias por ser el bastón donde apoyarme cuando lo he necesitado. Os agradezco, de corazón, todos y cada uno de vuestros gestos para que hoy sea la persona que soy. Sin vosotros este trabajo no hubiese sido posible y por eso, os lo dedico.

I, finalment, gràcies a tu, Víctor, per ser des de fa uns quants anys el meu company de viatge. Gràcies per ser el far que m'assenyala la costa i per estimar-me per sobre de tot. Gràcies per haver tingut la paciència d'aguantar-me durant aquesta darrera etapa i per voler viure'n més al meu costat.