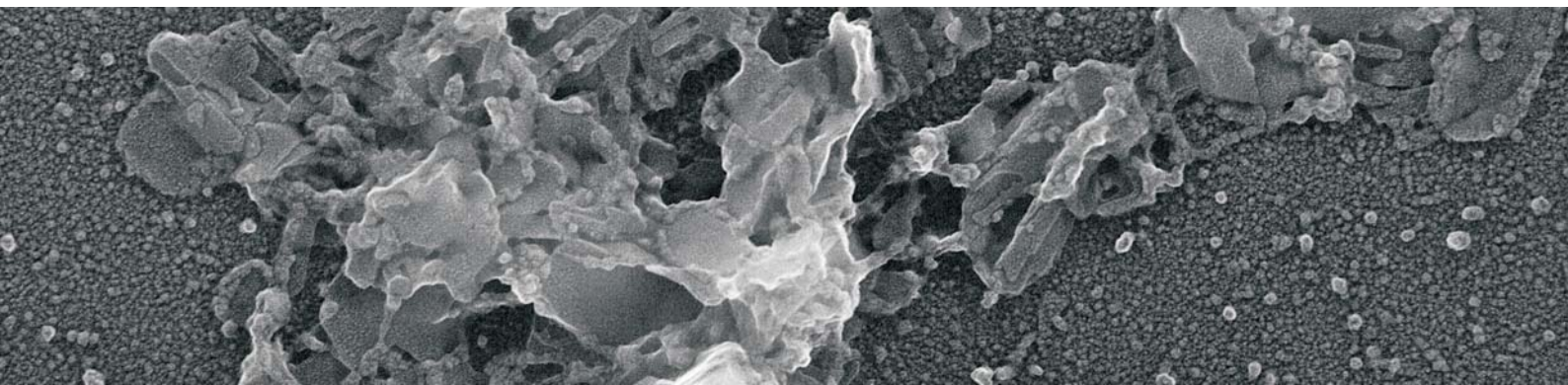

Plaques de cromatina dels cromosomes metafàsics: estructura i autoassociació

Maria Milla Astals





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

**PLAQUES DE CROMATINA
DELS CROMOSOMES METAFÀSICS:
ESTRUCTURA I AUTOASSOCIACIÓ**

Memòria presentada per adquirir el grau de Doctor en
Bioquímica i Biologia Molecular per Maria Milla Astals.

Treball realitzat a la Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció del Dr. Joan-Ramon Daban.

Maria Milla Astals

Dr. Joan-Ramon Daban

Bellaterra, 18 de novembre de 2011.

Índex general

1. Introducció.	1
1.1. DNA i proteïnes de la cromatina.	3
1.1.1. DNA.	3
1.1.2. Histones.	3
1.1.3. Proteïnes no histones.	4
1.1.3.a. <i>High Mobility Group (HMG).</i>	5
1.1.3.b. <i>Topoisomerasa II.</i>	6
1.1.3.c. <i>Structural Maintenance of Chromosome Proteins (SMC).</i>	7
1.2. Nucleosoma.	8
1.2.1. Estructura.	8
1.2.2. Dinàmica nucleosomal.	9
1.2.2.a. <i>Formació de nucleosomes.</i>	9
1.2.2.b. <i>Transcripció de la cromatina.</i>	10
1.3. Propietats autoassociatives de les partícules nucli.	11
1.4. La fibra de cromatina.	13
1.4.1. Tècniques d'elevada resolució per l'estudi de la cromatina.	13
1.4.2. Models estructurals per la fibra de cromatina	13
1.4.2.a. <i>El solenoide.</i>	13
1.4.2.b. <i>Models amb el DNA d'unió paral·lel a l'eix de la fibra i de doble origen.</i>	14
1.4.2.c. <i>Models amb el DNA d'unió creuat (zig-zag).</i>	15
1.4.2.d. <i>Models de densitat elevada.</i>	16
1.4.2.d.1. El solenoide interdigitat compacte.	16
1.4.2.d.2. El tetranucleosoma.	18
1.4.2.d.3. Models recents.	19
1.5. El cromosoma metafàsic.	21
1.5.1. El cicle cel·lular.	21
1.5.2. Organització del nucli interfàsic.	22
1.5.3. Condicions iòniques del nucli cel·lular i dels cromosomes metafàsics.	22
1.5.4. Models estructurals pel cromosoma metafàsic.	23
1.5.4.a. <i>Models basats en llaços de cromatina ancorats a un eix proteic.</i>	23
1.5.4.b. <i>Models basats en el plegament helicoidal.</i>	24
1.5.4.c. <i>Models recents heterogenis.</i>	24
1.5.4.c.1. Model basat en cromòmers.	24
1.5.4.c.2. Model de plegament jeràrquic.	26
1.5.4.c.3. Models dinàmics.	26

1.5.4.d. <i>Model de les plaques primes de cromatina.</i>	28
1.6. Objectius.	31
2. Materials i mètodes.	33
2.1. Procediments generals.	35
2.1.1. Preparació de sacs de diàlisi.	35
2.1.2. Purificació de medis i condicions de treball en els experiments de microscòpia electrònica.	35
2.2. Cultius cel·lulars. Preparació de cromosomes de HeLa.	36
2.2.1. Establiment i manteniment d'un cultiu cel·lular.	36
2.2.2. Sincronització de les cèl·lules per bloqueig a la fase M.	37
2.2.3. Obtenció i extracció de cèl·lules metafàsiques.	37
2.2.4. Recompte cel·lular.	38
2.3. Millora del procés d'obtenció de cromosomes metafàsics	39
2.3.1. Estudi del bloqueig en metafase a diferents temps.	39
2.3.2. Estudi de l'efecte del pH i altres tractaments en l'alliberació de cromosomes.	39
2.3.2.a. <i>Tractaments amb medis hipotònics.</i>	39
2.3.2.b. <i>Altres tractaments.</i>	39
2.4. Obtenció de controls per a mostres de microscòpia electrònica.	41
2.4.1. Boles de làtex.	41
2.4.2. <i>E. Coli.</i>	41
2.4.3. Mescla.	41
2.5. Obtenció de fragments de cromatina.	42
2.5.1. Obtenció de cromosomes metafàsics.	42
2.5.2. Purificació de cromosomes en gradients esglaonats de sacarosa.	42
2.5.3. Digestió amb nucleasa micrococcal.	42
2.5.4. Rentat de les mostres digerides: diàlisi amb condicions de baixa força iònica.	43
2.6. Purificació de fragments de cromatina per electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzants.	44
2.6.1. Electroforesi no desnaturalitzant en gels d'agarosa 0.5%-TBx1.	44
2.6.2. Tinció i fotografia dels gels d'agarosa.	44
2.6.3. Retallada de bandes dels gels d'agarosa preparatius.	45
2.6.5. Extracció de cromatina de longitud coneguda procedent d'electroforesi d'agarosa.	45
2.7. Aplicació de diferents tractaments per l'autoassociació.	46
2.7.1. Diàlisi en condicions fisiològiques.	46

2.7.2. Associació dels fragments de cromatina a diferents condicions.	47
2.8. Anàlisi electroforètic de les mostres: electroforesi de proteïnes.	48
2.8.1. Concentració dels fragments de cromatina.	48
2.8.2. Preparació de les mostres.	48
2.8.3. Electroforesi en gels d'acrilamida.	48
2.8.4. Tinció de gels convencionals.	49
2.8.4.a. Tinció amb el colorant Coomassie Blue.	49
2.8.4.b. Tinció amb el fluoròfor Nile Red.	49
2.8.4.c. Tinció amb Oriole.	50
2.9. Anàlisi electroforètic de les mostres: electroforesi de DNA.	51
2.9.1. Determinació del pes molecular en gels d'agarosa	51
2.10. Processament i observació de la mostra per microscòpia òptica.	52
2.10.1. Microscòpia de fluorescència.	52
2.10.2. Microscòpia de camp clar.	52
2.10.2.a. Fixació de la mostra.	52
2.10.2.b. Tinció Giemsa i observació al microscopi.	52
2.11. Microscòpia de polarització.	53
2.11.1. Fonaments.	53
2.11.2. Tractaments previs a l'observació de la mostra.	53
2.11.3. Observació per microscòpia de polarització.	54
2.12. Microscòpia electrònica.	55
2.12.1. Evaporador de carbó i carbó-platí.	55
2.12.2. Film de carbó.	56
2.12.3. Activació del film de carbó.	56
2.12.4. Extensió de la mostra sobre reixetes.	57
2.12.4.a. Extensió directa sobre reixeta.	57
2.12.4.b. Extensió de la mostra per centrifugació.	57
2.12.5. Condicions de fixació de la mostra.	58
2.12.5.a. Fragments de cromatina.	58
2.12.5.b. Cromosomes metafàsics i material procedent de diàlisi.	58
2.12.6. Contrast de la mostra: platinació.	59
2.12.6.a. Unidireccional.	59
2.12.6.b. Rotacional.	59
2.12.7. Observació de la mostra al microscopi electrònica.	59
2.13. Mesura i anàlisi de la distribució d'alçades d'una mostra.	60
3. Resultats i discussió.	63
3.1. Resultats obtinguts en la preparació de mostres.	65

3.1.1. Millora del rendiment d'obtenció de cromosomes.	65
3.1.1.a. Estudi de l'efecte del bloqueig en metafase a diferents temps.	65
3.1.1.b. Efecte de pH àcid en el procés d'extracció de cromosomes.	66
3.1.1.c. Efecte de tractaments mecànics.	66
3.1.1.d. Efecte de la fixació amb metanol – àcid acètic.	67
3.1.2. Visualització de cromosomes en condicions iòniques properes a la metafase mitjançant SEM i TEM.	68
3.1.3. Observació de controls per TEM: boles de làtex i <i>E. Coli</i> .	71
3.2. Estudi de l'estructura interna del cromosoma amb microscòpia de polarització.	73
3.2.1. Ús de sacs cel·lulars.	73
3.2.2. Tria de controls.	74
3.2.3. Incubacions amb diferents medis.	75
3.2.3.a. Medi poliamines.	75
3.2.3.b. 5 mM MgCl ₂ .	77
3.2.3.c. 20 mM MgCl ₂ .	78
3.3. Estudi d'autoassociació de fragments de cromatina purificats.	82
3.3.1. Anàlisi dels materials emprats en els experiments d'autoassociació.	82
3.3.2. Formació de plaques per autoassociació en condicions iòniques properes a la metafase.	85
3.3.3. Formació de plaques en presència de MgCl ₂ i CaCl ₂ .	101
3.3.4. Associació de fragments de cromatina de longitud definida.	111
3.3.5. Estudi cinètic de la formació de plaques per autoassociació en condicions properes a la metafase.	115
3.3.7. Estudi de les característiques de les plaques formades per autoassociació: distribució d'alçades.	128
3.3.8. Estudi de plaques de gruix inferior.	129
3.3.9. Estudi de plaques de gruix superior.	132
3.3.10. Extensió de l'estudi d'autoassociació realitzat en aquesta tesi.	135
4. Discussió general	141
4.1. Estudi de l'estructura interna del cromosoma metafàsic mitjançant microscòpia de polarització.	143
4.2. Autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics.	145
4.2.1. Condensació de fragments de cromatina: formació de cossos circulars compactes.	145

4.2.2. Associació de fragments de cromatina: formació d'estructures laminars.	145
4.3. Implicacions estructurals i funcionals del model de plaques primes de cromatina	146
5. Conclusions	149
6. Bibliografia	153
Annex	163
I. Abreviatures utilitzades	165
II. Publicacions científiques derivades de la tesi	167
III. Agraïments	169

*"El aprendizaje es experiencia,
el resto es información"*

A.Einstein

Als meus pares
A la meva germana

1. INTRODUCCIÓ

1.1. DNA i proteïnes de la cromatina

1.1.1. DNA

El DNA és una molècula formada per dos polinucleòtids antiparal·lels disposats helicoïdalment. Cadascun d'ells està format a la vegada per un fosfat i una pentosa, a la qual s'uneix una base nitrogenada: adenina (A), timina (T), citosina (C) i guanina (G). La interacció de les bases, a través de ponts d'hidrogen, és la responsable de la formació de doble hèlix (Watson i Crick, 1953).

Un gran problema estructural apareix quan s'intenta explicar com es pot introduir el DNA a l'interior del nucli cel·lular. El genoma humà conté aproximadament $3 \cdot 10^9$ bp. En el cas que tot aquest DNA es trobés estès, mesuraria fins a 1 m de longitud. Malgrat això, a les cèl·lules eucariotes, el DNA es troba a l'interior del nucli cel·lular que fa aproximadament 5 μ m de diàmetre (Wolffe, 1998). Aquest fet implica que el DNA estigui altament empaquetat: el material genètic anirà adquirint diferents graus d'empaquetament al llarg del cicle cel·lular, cosa que li permetrà la realització de processos com la transcripció i la divisió cel·lular.

Generalment, el nivell de compactació del DNA es mesura mitjançant el grau d'empaquetament lineal, que relaciona la longitud del fragment de DNA estirat i la longitud de l'estructura que el conté. Malgrat això, és més adequat utilitzar la concentració local de DNA per determinar el nivell de compactació i poder establir models de condensació (Daban, 2000). La concentració de DNA va variant al llarg del cicle cel·lular, passant de 0.10 g/ml (nucli interfàsic) fins a 0.17 g/ml (cromosoma metafàsic).

1.1.2. Histones.

Clàssicament, les proteïnes cromosòmiques es divideixen en dos grans grups: histones i no histones. Les histones i les seves modificacions post-traduccionals han estat àmpliament estudiades. Malgrat això, les estructures d'ordre superior en el plegament dels cromosomes metafàsics encara no són prou conegudes i encara no està clar quines proteïnes són les que participen en el plegament de la fibra de cromatina als cromosomes metafàsics.

Inicialment es pensava que el paper de les histones era tan sols estructural. No obstant això, s'ha observat que aquestes proteïnes tenen un paper molt important en els processos de regulació de la transcripció. Les histones són proteïnes petites i molt bàsiques, que consten d'una regió central altament estructurada, anomenada domini de plegament d'histona, i de cues N i C terminals sense estructura secundària (figura 1.1).

La modificació de la regió N-terminal provoca efectes importants en l'estructura i en la funció de la cromatina; les modificacions més freqüents són l'acetilació, fosforilació, metilació, ADP-ribosilació i ubiquitinació. Malgrat això, les histones són proteïnes molt conservades a l'evolució, especialment H3 i H4.

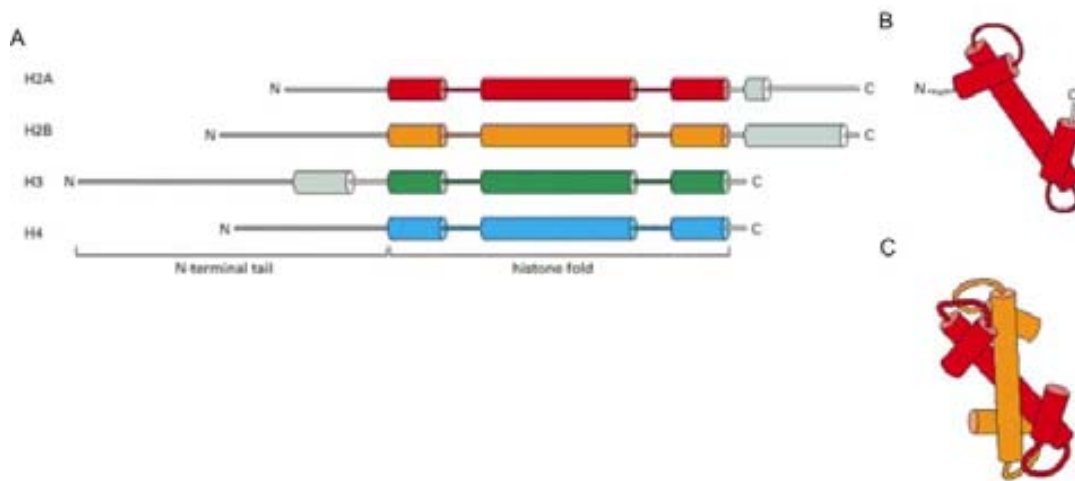


Figura 1.1 (A) Esquema de l'estructura de les histones de la partícula nucli. (B) Estructura del plegament de les histones. (C) Dímer de H2A i H2B. Figura adaptada de Alberts et al. (2002).

Trobem diferents tipus d'histones: H3, H4, H2A, H2B i H1 (H5 en eritròcits d'aus, rèptils, amfibis i peixos). Existeixen subtipus i variants d'aquestes histones segons la funció del teixit on la puguem trobar o de l'estat de desenvolupament de l'individu, entre d'altres. Les histones H3, H4, H2A i H2B conformen la partícula nucli, mentre que les histones H1/H5 estan relacionades amb la unió entre nucleosomes.

A diferència de les anteriors, les histones H1 i H5 són més riques en Lys i tenen una mida superior a la resta. A més, interaccionen amb el DNA amb menys afinitat que la resta i es poden dissociar fàcilment en presència de solucions de força iònica intermitja. Contenen un domini globular central resistent a la digestió amb tripsina, rodejat per dos braços C i N terminal (Avilés et al., 1978). El domini globular està altament conservat i és essencial per la interacció amb la partícula nucli.

1.1.3. Proteïnes no histones

S'han fet múltiples estudis en relació al proteoma del cromosoma metafàsic per tal de poder estudiar les proteïnes importants en l'estructuració de la cromatina. Recentment, Uchiyama i col·laboradors (2005) van identificar entre 107 i 158 proteïnes en el proteoma del cromosoma metafàsic (figura 1.2). Van trobar des de proteïnes mitocondrials que s'associaven amb el cromosoma durant la metafase fins a proteïnes HMG (High Mobility Group). Entre els principals grups de proteïnes no-histones trobem enzims units a cromatina, les proteïnes reguladores de la transcripció, receptors hormonals proteics, HMG i les proteïnes associades a l'esquelet cromosòmic. No està clar si totes aquestes proteïnes estan presents en els cromosomes nadius o són contaminacions, de la mateixa manera que tampoc està clara la seva funció.

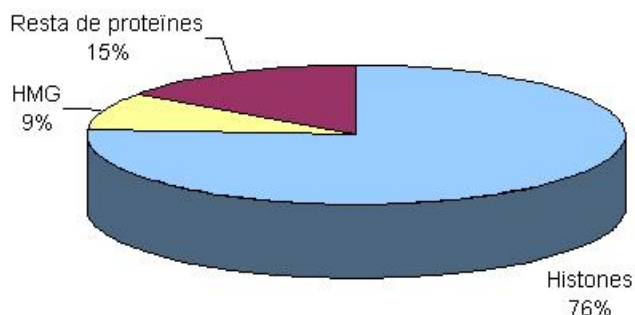


Figura 1.2 Proporció (en mols) de les proteïnes histones i no-histones de cromosomes purificats en gradient de Percoll (Uchiyama et al., 2005). La resta de les proteïnes correspon a 91 proteïnes diferents. La més abundant representa el 1.6%. La condensina representa el 0.36% i la topoisomerasa II el 0.11%. Figura adaptada de Gállego, 2010.

1.1.3.a. High Mobility Group (HMG).

Les HMG corresponen a les proteïnes més abundants en el cromosoma després de les histones. Aquestes proteïnes van ser descobertes a partir de l'extracció de la cromatina en medis àcids (Goodwin et al., 1973). Les HMG són proteïnes bàsiques en algunes regions que poden interaccionar amb el DNA gràcies al domini HMG (Wolffe, 1998). A diferència de les histones, aquestes proteïnes contenen una proporció important d'aminoàcids àcids.

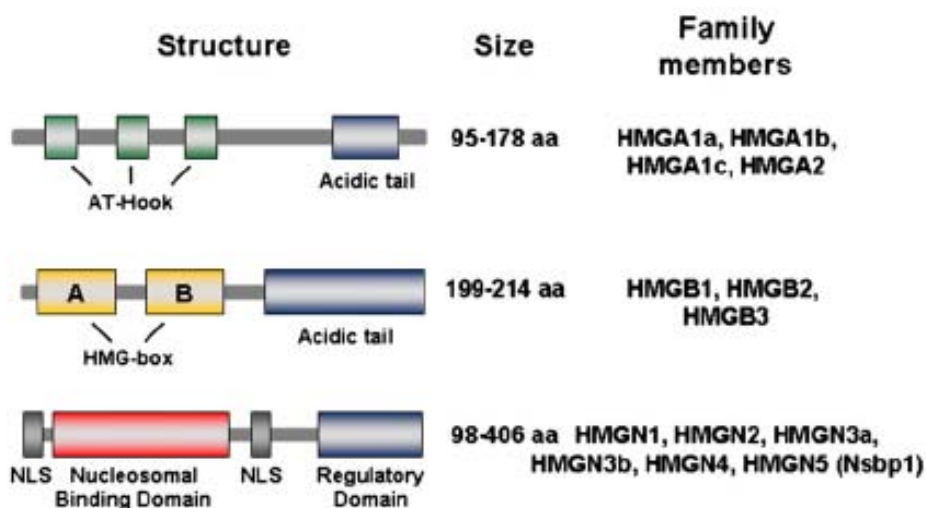


Figura 1.3. Els membres de les diferents famílies de HMG presenten una estructura modular, que conté un mòdul d'unió al DNA (en vermell, groc i blau), amb motius d'unió conservats i una cua àcida. Figura adaptada de Catez et al. (2010).

Existeixen tres famílies diferents de proteïnes HMG (figura 1.3), que reben el seu nom a partir de l'estructura encarregada d'unir-la al DNA, així com segons la seva especificitat d'unió al substrat (Bustin, 2001). D'aquesta manera, podem trobar: HMG-AT-hook (HMGA), HMG-box (HMGB) i HMG-nucleosome binding (d'unió a nucleosoma: HMGN).

De la mateixa manera que les histones, les proteïnes HMG poden patir un ampli ventall de modificacions post-traduccionals : acetilació de lisines, metilació, formilació, fosforilació,...(Bianchi i Agresti, 2005; Zhang i Wang, 2010).

Les HMG poden modular l'expressió de gens específics, ja sigui per unió directa als nucleosomes (en el cas de les HMGNs) o a partir de l'organització de complexos de factors i cofactors de transcripció (com seria per les HMGAs), o fent les dues accions a la vegada (HMGBs).

1.1.3.b. Topoisomerasa II.

Per altra banda, al cromosoma també trobem en una proporció bastant elevada la topoisomerasa II (figura 1.4).

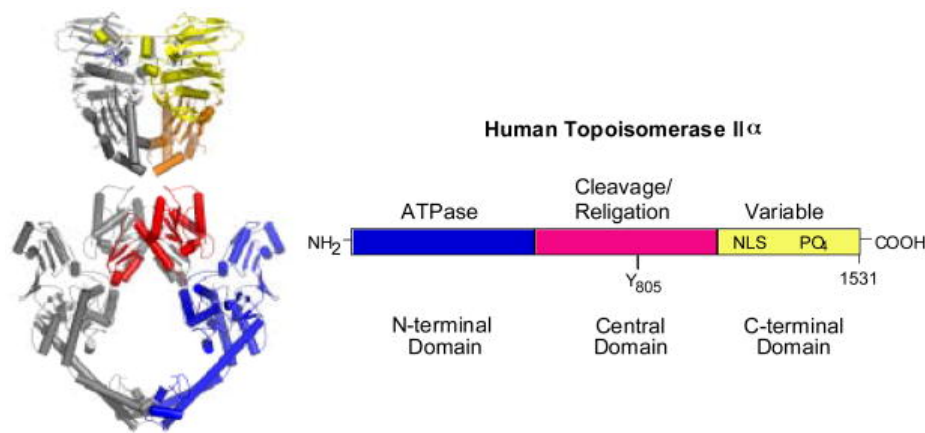


Figura 1.4. A l'esquerra, s'observa un cristall de l'estructura dels dominis N-terminal i central d'un homodímer de topoisomerasa II de llevat. A la dreta, es pot observar la representació de l'estructura de la topoisomerasa II a humana. Aquesta conté dominis homòlegs amb la DNA girasa (com GyrB a N-terminal i GyrA al domini central). El domini N-terminal conté el punt d'unió i hidròlisi d'ATP. El domini central presenta el punt d'unió i tall del DNA. Finalment, trobem el domini C-terminal, variable entre espècies, que conté seqüències de localització nuclear (NLS) i de fosforilació. Figura adaptada de McClendon et al. (2007).

Aquest enzim té múltiples funcions a la cèl·lula: principalment relaxa el DNA, però també està implicat en processos d'expressió gènica i de plegament de la cromatina (Roca, 2009; Wang, 1996). Altres autors (Saitoh i Laemmli, 1994), van proposar que aquesta proteïna era usada com a punt d'ancoratge dels llaços de DNA a través de les regions associades a l'esquelet proteic (scaffold-associated regions, SARs). Estudis posteriors van mostrar que la topoisomerasa II estava localitzada al llarg de tot l'eix longitudinal de la cromàtide. Malgrat això, la localització d'aquest enzim al cromosoma metafàsic va generar força controvèrsia: alguns investigadors van suggerir que es distribuïa de forma uniforme (Christensen et al., 2002). Posteriorment, es va trobar que la proteïna era mòbil i dinàmica, de manera que es podia associar aquesta característica amb la seva funció en la organització de la cromatina, excloent-la així d'un paper exclusivament estructural (Hirano, 2000; Tavormina et al., 2002). Més recentment, Kawamura i col·laboradors (2010) han

proposat que la topoisomerasa II pot tenir un paper important a nivell local al ser capaç de reduir la rigidesa elàstica dels cromosomes.

1.1.3.c. Structural Maintenance of Chromosome Proteins (SMC).

Les proteïnes SMC estan implicades en la separació i condensació dels cromosomes. Aquestes proteïnes estan formades per dominis globulars als extrems N i C terminal, que rodegen un domini central amb tendència al supercoiling (figura 1.5.A). A més, l'extrem C terminal presenta activitat ATPasa.

En eucariotes s'han trobat fins a 6 tipus de SMC diferents, que poden formar 3 heterodímers amb funcions concretes (figura 1.5.B):

- SMC2 i SMC4 constitueixen el nucli de la condensina. Juntament amb aquesta trobem fins a 3 subunitats no-SMC reguladores. Alguns autors han suggerit que aquestes proteïnes tindrien un paper important en el procés de separació de les cromàtides germanes, facilitant el trencament de concatenacions, i en la condensació del cromosoma (Wood et al., 2010).
- SMC1 i SMC3 constitueixen el nucli de la cohesina, que podria estar implicada en la cohesió de les cromàtides germanes des de la seva formació durant la replicació del DNA fins a la seva separació a la transició de metafase a anafase, en presència d'ATP (Arumugam et al., 2003; Kurze et al., 2011).
- SMC5 i SMC6 no tenen un paper ben definit. S'ha trobat que el complex que formen està implicat en processos com la reparació del DNA, la condensació del cromosoma i el manteniment dels telòmers (Murray i Carr, 2008; De Piccoli et al., 2009).

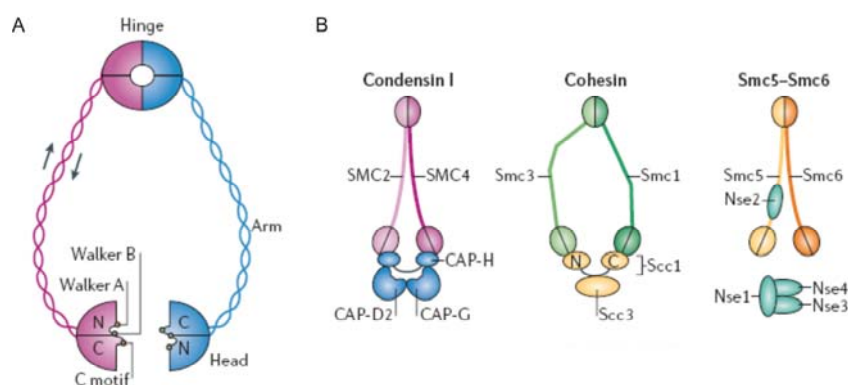


Figura 1.5. (A) Estructura bàsica del dímer de SMC. Cadascuna de les subunitats s'autoacoblen gràcies a les interaccions entre cues antiparaleles, unint l'extrem superior i formant un domini d'unió d'ATP a l'altre. La unió dels extrems superiors de dues subunitats permetrà la dimerització i la creació d'una molècula amb estructura de V. (B) Complexos SMC-proteïna en eucariotes, per cadascuna de les famílies de SMC. Figura adaptada de Hirano (2006).

1.2. Nucleosoma.

1.2.1. Estructura.

El nucleosoma és la unitat fonamental de la cromatina: a partir de l'empaquetament dels nucleosomes es forma la fibra de cromatina de 30 nm de diàmetre, però encara no es coneixen els mecanismes de condensació que donen lloc al cromosoma metafàsic (Van Holde, 1989; Wolffe, 1998).

El nucleosoma té dues parts ben definides: el *core* o partícula nucli (NCP) i el DNA linker o d'unió (Noll i Kornberg, 1977). D'una banda, el core està format per un octàmer d'histones que conté dues molècules de H2A, H2B, H3 i H4, al voltant de les quals s'uneix el DNA (figura 1.6). El DNA dóna 1.75 voltes cap a l'esquerra al voltant de l'octàmer d'histones. Aquests 146 bp són resistents a l'acció de la nucleasa micrococcal. La partícula nucli presenta un eix de simetria binari, perpendicular a l'eix helicoidal del DNA (Arents i Moudrianakis, 1995). Aquest element constitueix la unitat mínima de plegament de la cromatina.

Per altra banda, el DNA d'unió enllaça dues partícules nucli consecutives. La seva llargada és variable (20 – 80 bp) i sol variar entre espècies (Sumner, 2003). Aquests elements s'associen amb les histones d'unió (H1 o H5), donant lloc al nucleosoma complet (Wolffe, 1998). Les histones d'unió es situen a la regió d'entrada i sortida del DNA al nucleosoma (Thomas i Kornberg, 1975). Alguns estudis han determinat que la histona H1/H5 es troba posicionada asimètricament i, per tant, desplaçada respecte l'eix de simetria binari (Crane-Robinson, 1997).

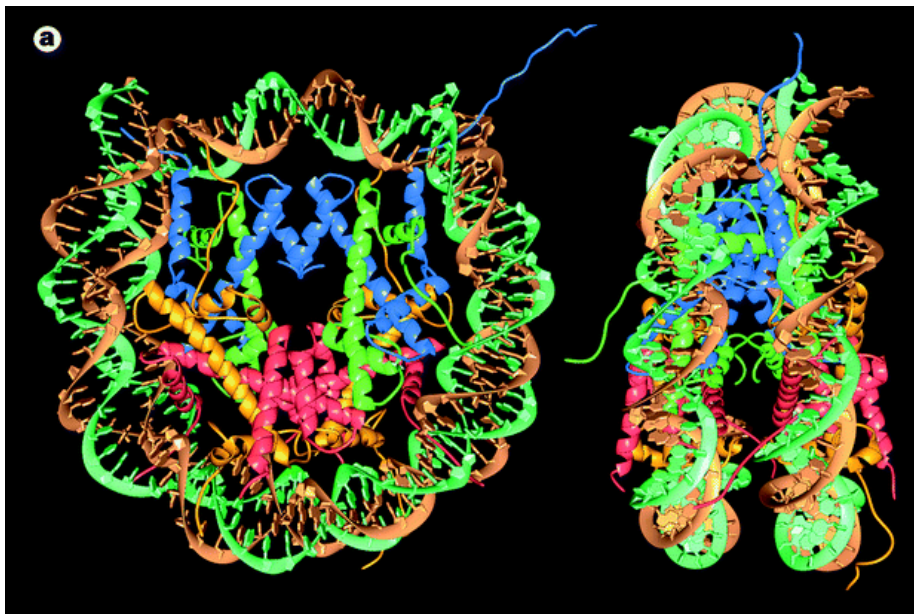


Figura 1.6. Estructura de la partícula nucli del nucleosoma. (A) Vista frontal de la NCP. L'octàmer d'histones està mostrat en groc (H2A), vermell (H2B), blau (H3) i verd (H4); el DNA es mostra turquesa i marró. (B) Vista lateral de la mateixa estructura, obtinguda per una rotació de 90° al voltant de l'eix vertical. Figura adaptada de Luger (1997a).

L'estructura del nucleosoma va ser determinada mitjançant estudis de microscòpia electrònica i cristal·lografia de raigs X. Amb la primera, es va poder determinar que el diàmetre de la partícula

nucli és de 11 nm i la seva alçada de 5.7 nm. Mitjançant la cristal·lografia de raigs X (Luger et al., 1997a; Rhodes, 1997; Richmond i Davey, 2003), es va poder determinar l'estructura del nucleosoma fins a una resolució de 1.9 Å.

Les interaccions que mantenen aquestes estructures són majoritàriament electrostàtiques (unions entre Lys i Arg de les histones amb els fosfats del DNA) i inespecífiques (ponts d'hidrogen entre els fosfats de la cadena de DNA i residus polars de la proteïna). També es donen contactes no polars entre les histones i les desoxiriboses del DNA (Luger et al., 1997b).

Tot i que el DNA que envolta l'octàmer sol ser de llargada més o menys constant, s'ha vist que la seva mida pot variar entre 146-170 bp, segons si es considera tan sols la partícula nucli o tenint en compte una estructura molt més dinàmica en la qual el DNA dóna fins a dues voltes al voltant de l'octàmer (Van Holde i Zlatanova, 1999).

1.2.2. Dinàmica nucleosomal.

Estudis de microscòpia electrònica mostren que els nucleosomes són presents en regions de cromatina en les quals s'està portant a terme la transcripció o la replicació. Per tant, per tal de realitzar part de la seva funció biològica, cal que la cromatina sigui una estructura força dinàmica en tots els seus nivells (Chakravarthy et al., 2005; Luger i Hansen, 2005).

1.2.2.a. Formació de nucleosomes.

L'associació dels nucleosomes a l'interior de la cèl·lula té lloc durant la fase S. Molts laboratoris han trobat que en primer lloc es crea un tetràmer H3/H4 al qual s'uneixen posteriorment els dímers H2A/H2B (Park i Luger, 2006). Existeixen evidències que confirmen la presència d'altres proteïnes durant el procés, que actuaran com a xaperones en l'associació de les histones. Per exemple, la proteïna Nap 1 sembla que pot interaccionar de forma clara amb les histones H2A i H2B (Sumner, 2003; Zlatanova et al., 2007); mentre que la proteïna Asf1 s'ha vist que ajuda a la formació del tetràmer H3/H4 (Park i Luger, 2008).

Tal i com s'ha dit anteriorment, la histona H1 s'uneix al nucleosoma amb menys força que la resta d'histones. Aquestes histones presenten un equilibri dinàmic i gran part és constantment intercanviada entre diversos punts de la cromatina per tal de poder regular l'expressió de certs gens (Raghuram et al., 2009).

Altres estudis han estat basats en el posicionament de les histones en seqüències concretes (nucleosome arrays) (Schalch et al., 2005). Mitjançant aquestes tècniques s'ha pogut determinar l'estructura cristal·logràfica d'un complex format per quatre partícules nucli i s'ha pogut veure també quina és l'afinitat relativa dels nucleosomes en seqüències concretes.

1.2.2.b. Transcripció de la cromatina.

L'organització dels nucleosomes podria representar un obstacle per processos bàsics, com la replicació o la transcripció, ja que cal separar el DNA perquè aquests es duguin a terme sense problemes. En alguns casos, són els factors de transcripció els encarregats de separar el DNA, però d'altres vegades, els mecanismes relacionats són força més complexos (Kornberg i Lorch, 1999). Per exemple, s'ha vist en llevats que el complex SWI/SNF desestructura els nucleosomes mitjançant l'ús d'ATP (Peterson i Herskowitz, 1992).

1.3. Propietats autoassociatives de les partícules nucli.

La partícula nucli del nucleosoma (NCP), és la unitat mínima de plegament de la cromatina. Diversos autors (Daban i Cantor, 1982a i 1982b; Wolffe, 1998) han corroborat la capacitat d'autoacoblament i de plegament d'un fragment de DNA al seu voltant.

Anteriorment, estudis previs de les propietats autoassociatives de les NCP (Finch et al., 1977; Dubochet i Noll, 1978; Tatchell i Van Holde, 1978) havien mostrat que aquestes s'associaven fortament a través de les seves cares laterals formant estructures hexagonals planes, arcs de diversos angles i estructures cilíndriques (figura

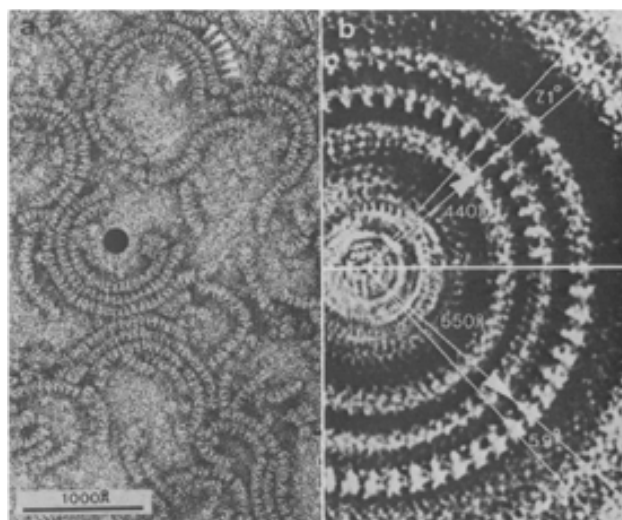


Figura 1.7. (A) Arcs nucleosomals observats per microscòpia electrònica de transmissió. Les fletxes indiquen una estriació radial de 50 a 60 nm d'espaiat. (B) Arcs concèntrics que mostren la periodicitat de les estructures observades. Figura adaptada de Dubochet (1978).

1.7). A partir de l'estudi d'aquesta propietat mitjançant la difracció per raigs X, es va veure que es formaven columnes que seguien un sistema hexagonal (Uberbacher i Bunick, 1985).

Posteriorment, Leforestier i col·laboradors (1999) van determinar, mitjançant estudis de microscòpia de polarització i de criomicroscòpia electrònica, que les NCP s'associaven formant columnes molt empaquetades en presència de poliamines i de concentracions elevades de NaCl. Es

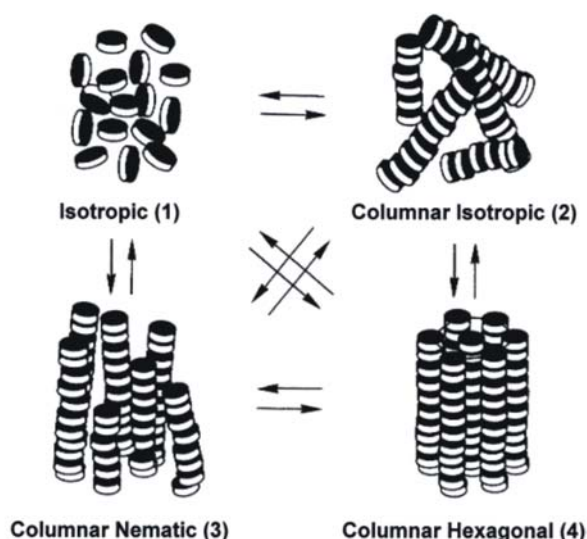


Figura 1.8. Organitzacions supramoleculares en els agregats de NCP induïdes per un tractament amb espermina. Adaptat de Leforestier et al. (1999).

va trobar l'existència de dos tipus de fases amorfes isotròpiques [estructures (1) i (2)] (figura 1.8) i dos tipus de fases cristall líquid [estructures (3) i (4)], una de les quals presenta empaquetament hexagonal compacte [estructura (4)]. Mitjançant microscòpia de polarització, aquests autors van observar que aquests cristalls líquids són òpticament anisotròpics. A més, es va veure que les partícules nucli també podien formar estructures laminades (Leforestier et al., 2001; Mangenot et al., 2003). Es va veure també que les interaccions

electrostàtiques entre les NCP apilades eren més fortes que les interaccions laterals de les NCP en estructures columnars que formaven les fases cristall líquid.

Malgrat que aquestes estructures autoassociatives no tenen semblança directa amb les fibres de cromatina natives, alguns investigadors han suggerit que les interaccions entre les cares dels nucleosomes podrien ser la força directora de la formació d'estructures d'ordre superior a la cromatina (Daban, 2003). De fet, s'han proposat diversos models (Daban i Bermúdez, 1998; Schalch et al., 2005; Robinson et al., 2006) per a l'estructura de la fibra de cromatina en els quals hi ha interacció entre les cares laterals de les NCP.

Pel que fa a les interaccions entre nucleosomes, es va veure que l'apilament de les NCP en aquestes estructures podia ser degut a les interaccions electrostàtiques entre les histones de l'octàmer. De fet, l'anàlisi cristal·logràfic indica que la interacció de les cares dels nucleosomes es donava entre una zona àcida, formada per les histones H2A i H2B de la zona dorsal de la NCP i la cua N-terminal de la histona H4 de la zona ventral de la partícula adjacent (Luger et al., 1997b; Harp et al., 2000; White et al., 2001). Cal destacar que les cues de les histones tenen un paper molt important en la formació de la fibra de cromatina i d'estructures d'ordre superior (Caterino i Hayes, 2007).

1.4. La fibra de cromatina.

La fibra de cromatina és el nivell d'organització bàsic dels cromosomes metafàsics i de la cromatina metafàsica. Està formada per una cadena de nucleosomes units entre ells a través del DNA d'unió. La seva estructura varia considerablement segons les condicions iòniques del medi (Thoma et al., 1979). A baixes concentracions de ions monovalents, la fibra adopta una estructura estesa, on es poden observar els nucleosomes mitjançant microscòpia electrònica (Widom, 1986). A mida que augmenta la força iònica del medi, la cromatina es plega formant una fibra de 30-40 nm de diàmetre, anomenada genèricament fibra de 30 nm.

La fibra de 30 nm ha estat considerada una estructura secundària en molts estudis i se n'han proposat molts models. Malgrat això, el seu elevat grau de compactació en condicions metafàsiques en dificulta el seu estudi.

1.4.1. Tècniques d'elevada resolució per l'estudi de la cromatina.

Com s'ha dit anteriorment, la fibra de cromatina és una macromolècula de difícil estudi degut a l'elevat grau de compactació que pot presentar a determinades concentracions iòniques. Inicialment, la fibra de cromatina era estudiada mitjançant tècniques de microscòpia electrònica de transmissió. Actualment, trobem tècniques que permeten estudiar millor la seva estructura, sense haver de tenyir o fixar la mostra amb reactius químics.

- Microscòpia de força atòmica (AFM): Aquesta tècnica permet l'estudi de la fibra en solució aquosa. Per tant, aquest tipus de microscòpia pot resultar molt útil per estudiar el comportament de la cromatina en diverses condicions iòniques o amb la digestió amb diferents enzims de restricció
- Criomicroscòpia electrònica: En aquesta tècnica, la mostra és congelada i queda embolcallada per aigua vitrificada.

1.4.2. Models estructurals per la fibra de cromatina.

La fibra de cromatina ha estat àmpliament estudiada i s'han proposat diversos models per explicar la disposició dels nucleosomes en el seu interior, ja que la dificultat per estudiar-ne la seva estructura és força elevada (Van Holde i Zlatanova, 2007). Els models proposats es poden classificar segons el grau de compactació del DNA, que vindrà definit per la concentració local de DNA (Daban, 2003).

1.4.2.a. El solenoide.

Finch i Klug (1976) van proposar un model a partir de l'estudi de microscòpia electrònica de transmissió de les estries transversals separades per 11 nm observades en fibres de cromatina de 30 nm de diàmetre (figura 1.9). Aquesta fibra consta de 6 nucleosomes per volta i un pas de rosca que equival al diàmetre d'un nucleosoma (aproximadament 11 nm). En aquest model, el DNA d'unió es troba plegat, permetent així l'apropament de nucleosomes consecutius. El model va ser estudiat mitjançant dicromisme elèctric (McGhee et al., 1983), on es va veure que els nucleosomes

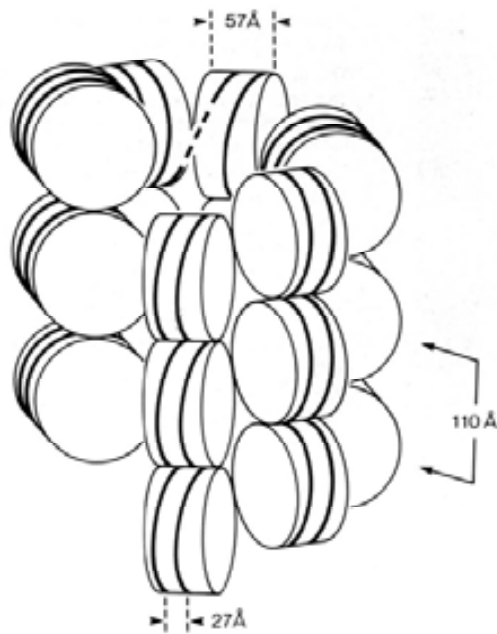


Figura 1.9. Model de solenoide per la fibra de cromatina. Les línies discontinües corresponen al DNA linker plegat entre nucleosomes. Figura adaptada de Widom i Klug (1985).

adquirien una inclinació de 20-30° respecte l'eix de la fibra en funció de la longitud del DNA d'unió. Posteriorment, Widom i Klug (1985) van corroborar el model del solenoide a partir d'estudis de difracció de raigs X de fibres de cromatina parcialment orientades. Aquests autors proposaven una disposició radial dels nucleosomes, situats també perpendicularment respecte l'eix de la fibra. El model del solenoide també ha rebut el suport de diversos autors a partir d'estudis de dispersió de neutrons (Suau et al., 1979; Yabuki et al., 1982; Bradbury i Baldwin, 1986).

Aquest model implica el corbament del DNA linker per poder unir els nucleosomes consecutius, cosa que provoca força controvèrsia (Van Holde i Zlatanova, 1996).

1.4.3.b. Models amb el DNA d'unió paral·lel a l'eix de la fibra i de doble origen.

Aquest model va ser proposat en primer lloc per Worcel i col·laboradors (1981) i posteriorment per Woodcock i col·laboradors (1984). Ambdós van proposar l'existència d'una hèlix de doble origen (cinta helicoidal) formada per un zig-zag de nucleosomes, on les cares de nucleosomes alternants estarien en contacte (figura 1.10). En aquest model, cada volta de la cinta estarà formada per 18 nucleosomes, cosa que conformaria una fibra de 30 nm de diàmetre. Degut a que presenta 11.6 nucleosomes per un pas de rosca d'11 nm, aquest model és més compacte que l'anterior.

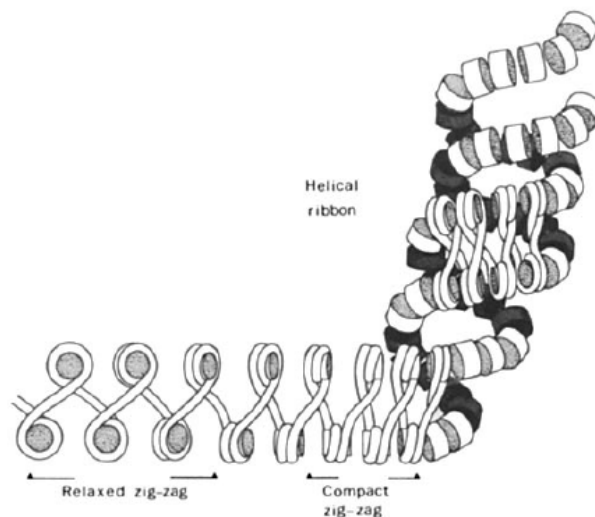


Figura 1.10. Model d'hèlix de doble origen o de cinta helicoidal. Figura adaptada de Woodcock et al. (1984).

1.4.3.c. Models amb el DNA d'unió creuat (zig-zag).

Williams i col·laboradors (1986) van desenvolupar un nou model a partir de l'estudi amb tècniques de microscòpia electrònica de fibres estretes de diverses espècies amb diferents longituds del DNA

d'unió. El model proposat es va basar en un zig-zag de nucleosomes plegats helicoïdalment sobre el seu propi eix que donaria lloc a la doble hèlix (figura 1.11). El DNA d'unió travessaria la fibra per l'interior de forma perpendicular a l'eix de la fibra. El pas de rosca per aquest model seria d'aproximadament 26 nm i el nombre de nucleosomes dependria de la longitud del DNA d'unió.

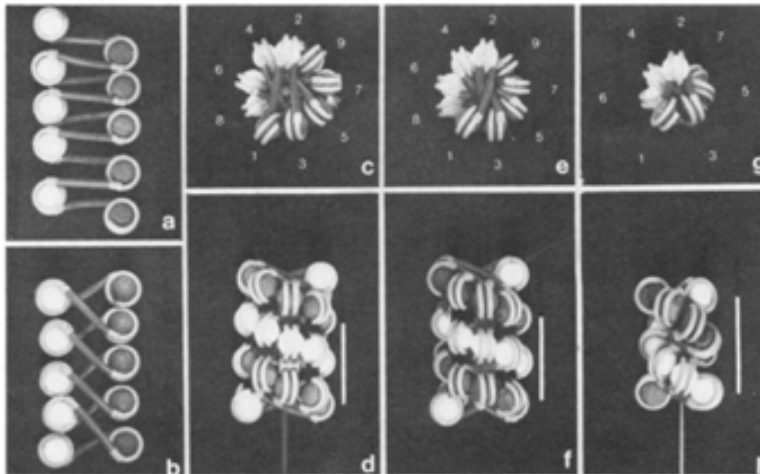


Figura 1.11. Model d'hèlix de doble origen amb DNA d'unió creuat. (A, B) Cadenes esteses de nucleosomes. (C-H) Vista lateral i superior de possibles disposicions dels nucleosomes. Figura adaptada de Williams et al. (1986).

Per altra banda, a partir de l'estudi de la dispersió de raigs X, Bordas i col·laboradors (1986) van proposar un model que també presentava el DNA d'unió creuat. En aquest model, la fibra descondensada correspon a una hèlix de 2.75-3.25 nucleosomes per volta, un pas de rosca de 33 nm i un diàmetre de 20 nm. La mateixa fibra obtinguda a concentracions més elevades de $MgCl_2$, corresponia a una hèlix de 2.56 nucleosomes per volta, un pas de rosca de 3 nm i un diàmetre de 27 nm. En aquest cas, el DNA d'unió presenta una longitud constant de 64 bp, que condicionaria la regularitat de la fibra. Finalment, van veure que les histones H1/H5 eren importants pel plegament de la cromatina, encara que fos a baixa força iònica.

Aquest model ha estat corroborat per diversos estudis de microscòpia de força atòmica (Zlatanova et al., 1994; Zlatanova et al., 1998; Zlatanova i Leuba, 2003), criomicroscòpia electrònica (Bednar et al., 1998) i tomografia electrònica (Horowitz et al., 1997). Malgrat això, la majoria d'aquests estudis es van realitzar en condicions amb baixa força iònica. En aquests models es suggereix que l'estructura de la fibra de cromatina ve determinada per la longitud del DNA d'unió i per l'angle d'entrada i sortida del DNA en el nucleosoma (Woodcock et al., 1993; Leuba et al., 1994). A més, a partir de modelatge simulat per ordinador, es van obtenir models molt semblants a les fibres observades per criomicroscòpia electrònica (Woodcock i Horowitz, 1995) (figura 1.12).

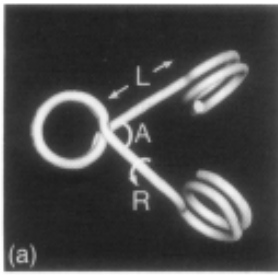


Figura 1.12. Model de plegament en zig-zag. A correspon a l'angle d'entrada i sortida del DNA d'unió del nucleosoma. L correspon a la longitud del DNA d'unió i R és l'angle de rotació entre dos nucleosomes consecutius. Figura adaptada de Woodcock et al. (1995).

Recentment, estudis que combinaven la microscòpia electrònica i simulacions de Monte Carlo (Grigoryev et al., 2009) han mostrat que les fibres de cromatina, en presència de H1 i a concentració iònica baixa, presenten una estructura de zig-zag dominada pels contactes entre nucleosomes alternats. En canvi, a concentracions superiors d'ions monovalents, aquesta estructura és molt més compacta, ja que hi ha un plegament del DNA d'unió que permet les interaccions entre nucleosomes consecutius.

1.4.3.d. Models de densitat elevada.

1.4.3.d.1. El solenoide interdigitat compacte.

El model del solenoide interdigitat compacte proposat pel nostre grup permet entendre el comportament de les fibres de cromatina en presència de 1.7 mM $MgCl_2$ (Bartolomé et al., 1994, 1995; Bermúdez et al., 1998). El model es va suggerir a partir dels resultats obtinguts en gels electroforètics de DNA en condicions no desnaturalitzants en presència de 1.7 mM $MgCl_2$ i en estudis de microscòpia electrònica de transmissió. En el cas de l'electroforesi no desnaturalitzant, es va veure que en fragments de cromatina procedents d'eritròcits de pollastre de 6-50 nucleosomes de longitud, apareixia una banda retardada en el gel independentment del pes molecular del fragment estudiat (Bartolomé et al., 1995). Pels estudis de microscòpia electrònica de transmissió, van extreure la cromatina present a la banda retardada del gel d'agarosa en presència de 1.7 mM $MgCl_2$, el van entrecreuar amb gluteraldehid i el van platinar rotacionalment. Com a resultat, van observar estructures amb un diàmetre constant de 33 nm (per fragments de 10-36 nucleosomes). Aquestes estructures cilíndriques presentaven una perifèria helicoidal, amb una anella d'11 nm de gruix amb barres radials i un forat central de 7-12 nm.

Posteriorment, es van fer estudis de desnaturalització parcial (Bermúdez et al., 1998), on es va confirmar una disposició radial dels nucleosomes a l'interior de la fibra compacta, a més de veure que els nucleosomes consecutius no es trobaven oposats respecte l'eix de la fibra. A partir de totes aquestes dades, es va elaborar un model similar al del solenoide (veure apartat 1.4.3.a), proposat anteriorment per Widom i Klug (1985). El model es basava en l'existència d'hèlices primàries formades per un nombre de nucleosomes per volta no sencer i inferior a 6. Aquestes hèlices s'interdigitaven entre els diferents nivells, a partir de la interacció entre les cares laterals de nucleosomes, i formaven hèlices secundàries (figura 1.13). La intercalació dels successius nivells és la que provoca que la fibra de cromatina sigui més compacta que en altres models proposats.

En aquest cas, es desconeix la trajectòria del DNA d'unió, però s'ha demostrat que a l'interior de l'espai central es podia col·locar un DNA d'unió de mida llarga (60-64 bp) sense tenir problemes estèrics.

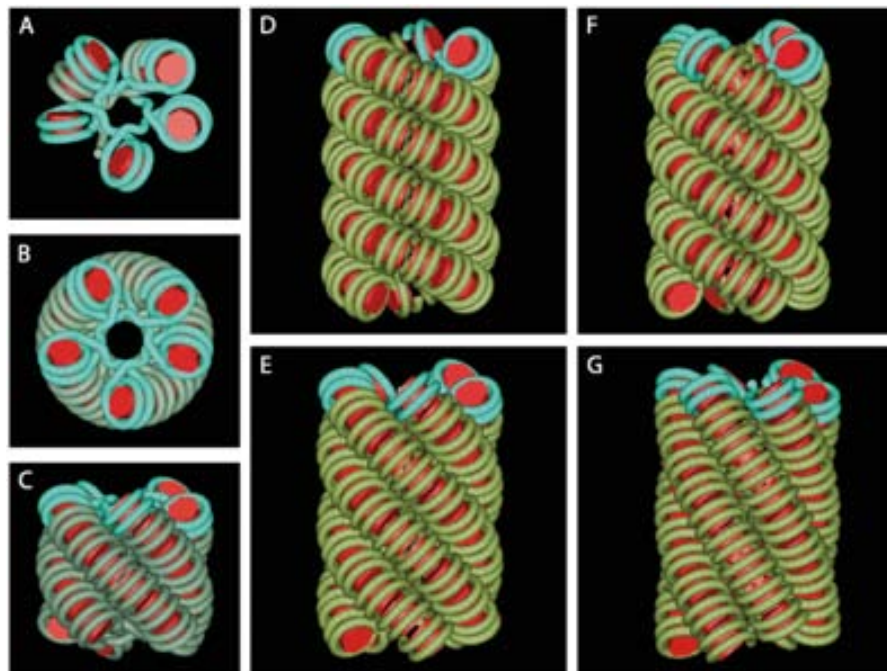


Figura 1.13. (C) Model del solenoide interdigitat compacte (vista lateral). (A) Vista superior de la volta completa de l'hèlix i inici de la segona. (B) Vista superior de l'estructura mostrada a (C). (D-G) Fibres modelades amb un nombre creixent de nucleosomes/volta d'hèlix, cosa que provoca una variació de l'angle d'inclinació dels nucleosomes en les hèlixes secundàries. Figura adaptada de Daban (1998).

Més recentment, altres investigadors han mostrat evidències a favor d'aquest model (Robinson et al., 2006). A partir d'estudis de microscòpia electrònica convencional i criomicroscòpia, van analitzar fragments repetitius de DNA (10-40 nucleosomes) a una concentració de 1.6 mM $MgCl_2$. Van determinar que les fibres de 33 nm no variaven de diàmetre amb la longitud del DNA d'unió, confirmant un model de solenoide. A més, van veure que l'hèlix d'un sol origen que es descrivia contenia 5.4 nucleosomes per volta, que s'interdigitaven per donar lloc a una relació d'empaquetament elevada (figura 1.14). Com en el cas del solenoide interdigitat compacte, la interdigitació vindria determinada per la interacció de les cares laterals dels nucleosomes.

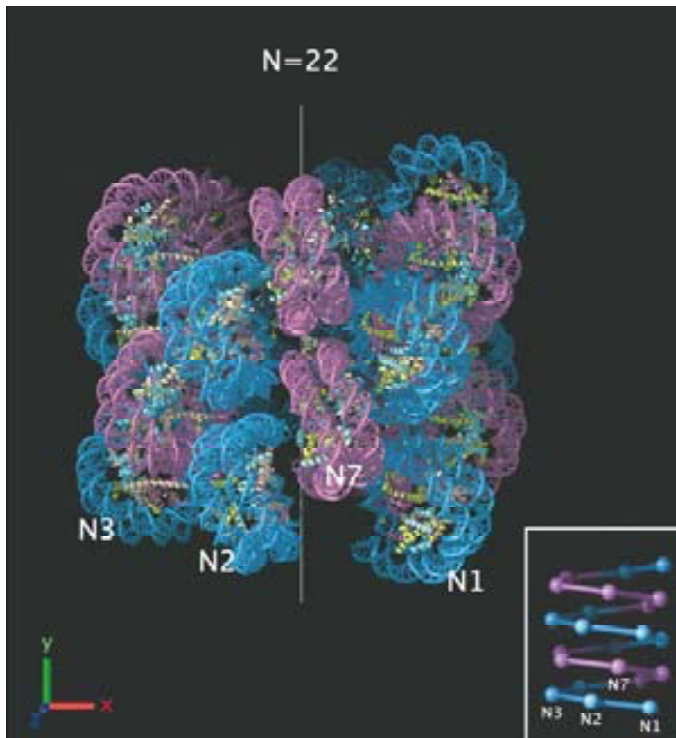


Figura 1.14. Model d'hèlix interdigitada d'un sol origen construït a partir de les restriccions imposades per les mesures de diàmetre i les relacions d'empaquetament observades experimentalment. L'hèlix conté 22 nucleosomes i un diàmetre de 33 nm. Els diferents nivells estan presentats amb diferents colors. S'han indicat els diversos nucleosomes consecutius de les hèlixes primàries amb N1, N2,... El requadre inferior mostra un esquema de la connectivitat del DNA del model proposat. Figura adaptada de Robinson et al. (2006).

1.4.3.d.2. El tetranucleosoma.

Schalch i col·laboradors (2005) van proposar un nou model de la fibra de cromatina a partir de la cristal·lització i anàlisi per difracció de raigs X d'un tetranucleosoma sense histona H1 a una concentració de $MgCl_2$ molt elevada. Al cristall es va observar que els nucleosomes formaven dues parelles de unides per les seves cares laterals. El model proposat a partir d'aquesta estructura del tetranucleosoma és una cinta girada de 25 nm de diàmetre, 6.6 nucleosomes cada 11 nm i 18.9 nucleosomes per volta (figura 1.15). Els nucleosomes estan rotats 70° un respecte l'altre i el DNA que els uneix és força curt (20 bp).

Aquest model valida els models proposats amb el DNA d'unió creuat (veure apartat 1.4.3.c), però a la vegada presenta un grau més elevat d'empaquetament que els anteriors. Per altra banda, cal destacar la interacció de les cares laterals dels nucleosomes a l'interior de la fibra, cosa que permet una estabilització important de la mateixa. Així doncs, s'han vist interaccions entre els dímers de H2A/H2B dels nucleosomes de nivells consecutius; i entre la cua de la H4 i el dímer H2A/H2B, malgrat que per aquesta interacció és necessari que els nucleosomes estiguin menys inclinats.

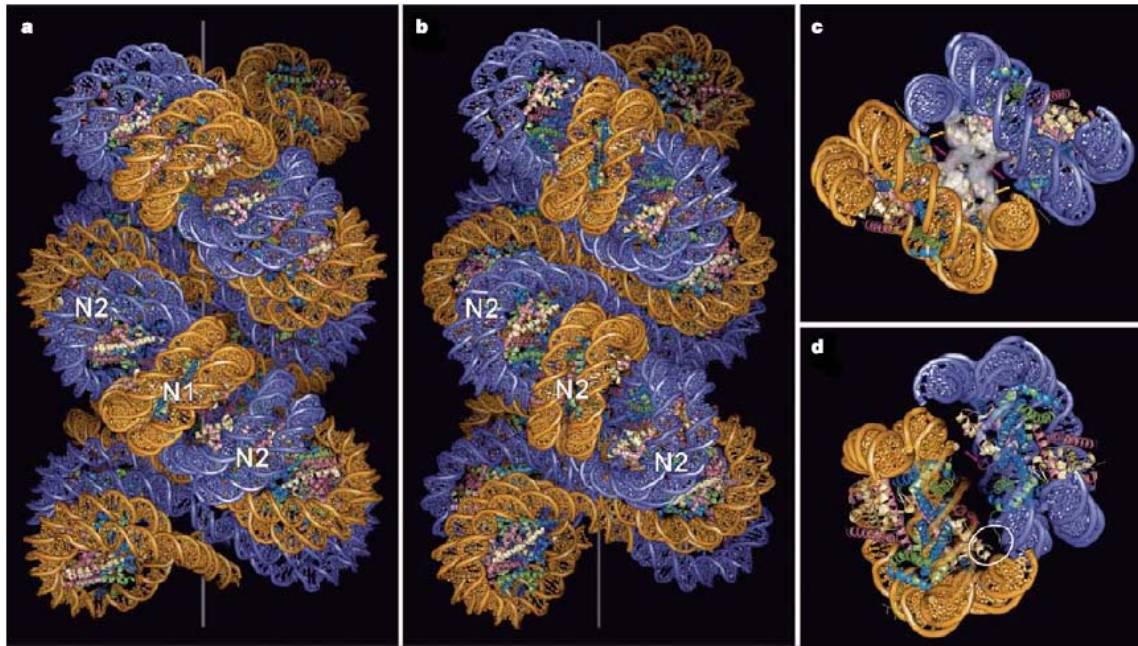


Figura 1.15. Model del tetranucleosoma. (A) Model construït a partir dels paràmetres de rotació o translació obtinguts necessaris per generar una interacció entre les cares dels nucleosomes N1 i N2. L'eix de la fibra s'ha escollit per fer equivalents els dos inicis de les hèlices. (B) Model ideal per tenir un eix de rotació dels nucleosomes ortogonal a l'eix de la fibra. (C) Interfase entre dos nucleosomes del model representat a A; es pot apreciar la interacció entre els dímers H2A/H2B. (D) Part interior de la interfase dels nucleosomes del model representat a B; cal destacar l'apropament de la cua de H4 amb el dímer H2A/H2B. Figura adaptada de Schalch et al. (2005).

1.4.3.d.3. Models recents.

Actualment, el debat segueix obert. Wong i col·laboradors (2007), van modelar la fibra a nivell atòmic, de manera que es va poder realitzar un estudi detallat de l'efecte de la longitud i topologia del DNA d'unió sobre la morfologia de la fibra, així com l'efecte de la histona H1 sobre la disposició d'aquest (figura 1.16.C).

Per altra banda, Depken i Schiessel (2009) van proposar un sistema predictiu basat en la forma del nucleosoma per tal de crear nous models i altres formes d'empaquetament de la cromatina (figura 1.16.A). Seguint la mateixa línia, Scipioni i col·laboradors (2010) van dissenyar un sistema predictiu, sota la hipòtesi d'una mínima distorsió de l'estructura del nucleosoma i del DNA d'unió i en el qual s'integren dades experimentals i restriccions geomètriques, conformacionals i topològiques (figura 1.16.B).

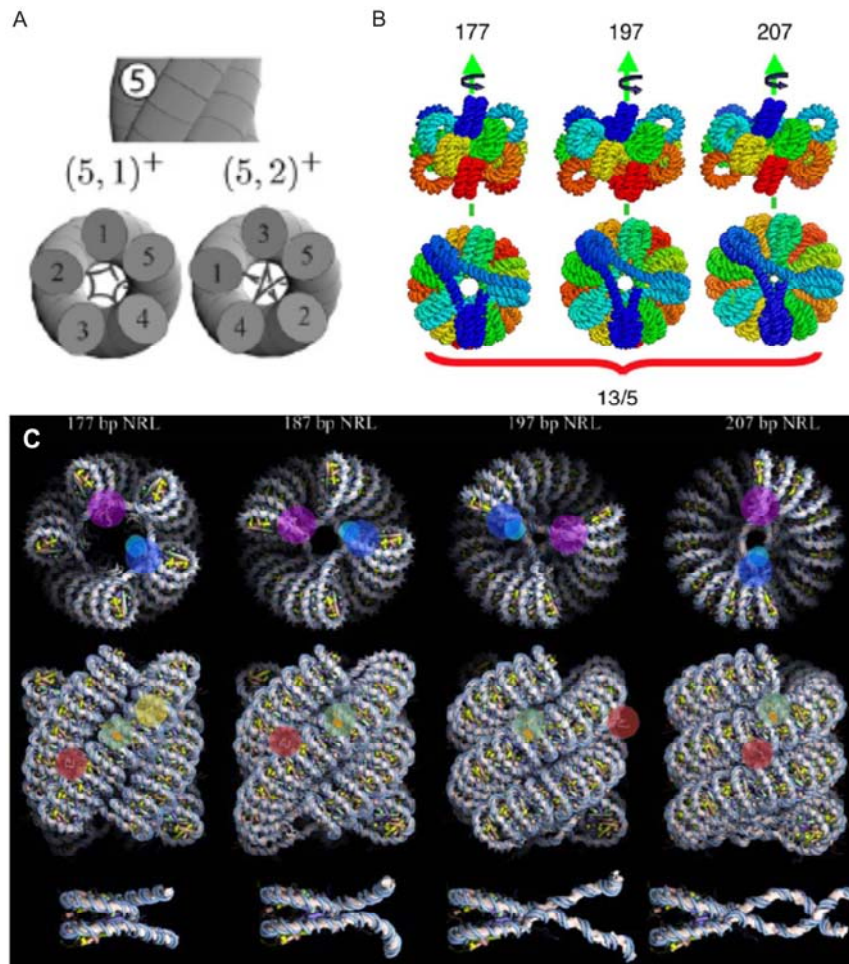


Figura 1.16. Models informàtics de la fibra de 30-40 nm. (A) Model obtingut per Depken et al. (2009), fixant el diàmetre de la fibra a 33 nm. (B) Model d'estructures interdigitades proposades per Scipioni et al. (2010), amb un diàmetre de fibra de 34 nm [fibres de la part superior; el nombre indica el número de parell de bases per nucleosoma (Nucleosome Repeat Length, NRL)] per cada fibra. (C) Estructura de la fibra proposada per Wong et al. (2007): es mostren les fibres de diversos NRL, així com el recorregut del DNA d'unió del nucleosoma usat al model (part inferior).

Altres autors (Kepper et al., 2008; Stehr et al., 2010), van emprar un nou mètode de simulacions de Monte Carlo que permet modelar l'estabilitat de les fibres segons l'orientació dels nucleosomes, el seu pas de rosca i la longitud del DNA d'unió. Aquests estudis indiquen que el model de solenoide interdigitat compacte és el més estable degut a les interaccions internucleosomals. Per altra banda, gràcies a aquests estudis, també s'ha vist que la cromatina és una estructura molt flexible.

1.5. El cromosoma metafàsic.

1.5.1. El cicle cel·lular.

El cicle cel·lular és un procés que permet el creixement de les cèl·lules i la seva divisió per formar cèl·lules filles. Durant el cicle, el DNA de les cèl·lules és replicat i posteriorment segregat en dues cèl·lules filles. El cicle està dividit en dues fases molt marcades: mitosi i interfase (figura 1.17). La interfase està subdividida en tres fases ben definides: G1, S, i G2.

El cicle s'inicia a la fase G1, quan la cèl·lula filla acaba d'originar-se a partir d'una cèl·lula anterior. És una etapa de creixement, en la qual la cèl·lula augmenta de mida fins arribar a la fase S. En aquesta fase, es duplica la totalitat del genoma de la cèl·lula. Seguidament, s'inicia l'etapa G2, en la qual es prepara la cèl·lula per la mitosi. De la mateixa manera que a G1, durant la fase G2, la cèl·lula segueix augmentant de mida.

Finalment, durant la mitosi, el material genètic estructurat en cromosomes serà repartit entre les dues cèl·lules filles. Aquesta última fase comprèn diverses etapes: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase i citocinesi (Alberts et al., 2002).

Profase: En aquest punt, la cromatina del nucli cel·lular es condensa per donar lloc als cromosomes. Els centrosomes es situen a cada costat del nucli i es genera el fus mitòtic entre ells.

Prometafase: Durant aquesta fase, es trenca l'embolcall nuclear i s'acaben de formar els cinetocors. Els cromosomes es situen sobre el fus mitòtic, que els dirigirà cap al centre de la cèl·lula.

Metafase: En aquest punt, el DNA de la cèl·lula adquireix el màxim nivell de compactació. Els cromosomes metafàsics s'alinearan al centre de la cèl·lula sobre el fus mitòtic (placa mitòtica) mitjançant els microtúbuls.

Anafase: Aquesta fase s'inicia quan els cinetocors es separen, fet que provoca que les cromàtides germanes es separin cap a extrems oposats de la cèl·lula.

Telofase: Els cromosomes arriben a cadascun dels pols. La membrana nuclear es torna a formar i els cromosomes comencen a descondensar-se.

Citocinesi: Aquest últim pas permet la divisió del citoplasma de la cèl·lula mare per la formació de les dues cèl·lules filles.

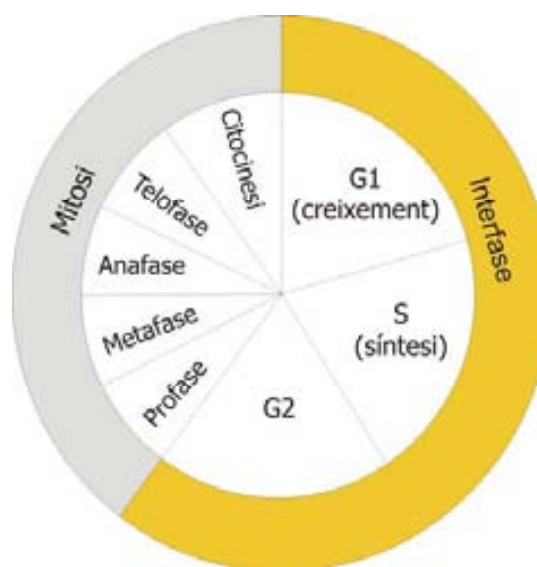


Figura 1.17. Esquema del cicle cel·lular. Durant les fases G1 i G2 la cèl·lula creix de forma contínua. El material nuclear es replica a la fase S, mentre que amb la mitosi, es dividirà la cèl·lula donant lloc a dues cèl·lules filles.

1.5.2. Organització del nucli interfàsic.

Inicialment, mitjançant estudis de microscòpia òptica i electrònica, es va poder determinar que la cromatina del nucli interfàsic es podia diferenciar en heterocromatina (altament condensada) i eucromatina (menys condensada). Tot i que les tècniques usades no permetien visualitzar estructures nuclears altament organitzades (excepte el nuclèol), la majoria de models proposaven organitzacions no territorials de la cromatina en el nucli (Comings, 1968). D'aquesta manera, fins fa poc més de dues dècades, el nucli es seguia considerant un sac de fibres de cromatina de diferents cromosomes entrecruant-se al nucleoplasma (Mora, 2007).

Posteriorment, l'aparició de la tècnica de la hibridació fluorescent in situ (FISH), ha permès conèixer que hi ha una distribució territorial de la cromatina en el nucli interfàsic (Cremer i Cremer, 2001; Parada i Misteli, 2002). Segons això, cada cromosoma interfàsic ocupa una regió del volum intranuclear més o menys globular, que exclou a la resta de cromosomes. L'espai que ocupa cada cromosoma s'anomena territori cromosòmic. Més recentment, Lieberman-Aiden i col·laboradors (2009) han confirmat que la presència de territoris cromosòmics permet l'apropament de regions riques en gens dels cromosomes.

1.5.3. Condicions iòniques del nucli cel·lular i dels cromosomes metafàsics.

Com s'ha comentat anteriorment, les condicions iòniques del medi afecten considerablement a la formació d'estructures com la fibra de cromatina. Per tant, és una variable que cal tenir molt en compte en estudis de compactació de la cromatina dels cromosomes metafàsics.

La concentració intracel·lular de Na^+ i K^+ és de 5-15 mM i 140 mM respectivament (Alberts et al., 2008). Aquests ions es troben distribuïts uniformement dins la cèl·lula eucariota i la seva concentració no varia durant el cicle cel·lular. Strick i col·laboradors (2001) van fer estudis d'espectrometria de masses de ió secundari (SIMS) de la distribució tridimensional dels cations Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ i K^+ a l'interior del nucli durant el cicle cel·lular. Aquests autors van mostrar que el Na^+ i el K^+ estaven associats de manera constant amb la cromatina al llarg del cicle cel·lular, però el Ca^{2+} i el Mg^{2+} presentaven canvis de localització entre la interfase i la mitosi (taula 1.1).

	Ca^{2+}		Mg^{2+}	
	Interfase	Mitosi	Interfase	Mitosi
Nucli/cromosoma	4 – 6 (5.0)	12 – 24 (18.0)	2 – 4 (3.0)	5 – 17 (11.0)
Citosòl	5 – 8 (6.5)	4 – 6 (5.0)	2 – 3 (2.5)	2 – 3 (2.5)
Cromosoma	ND	20 – 32 (26.0)	ND	12 – 22 (17.0)
Cèl·lula	7 – 9 (8.0)	4 – 8 (6.0)	1 – 3 (2.0)	1 – 3 (2.0)

Taula 1.1. Concentracions (mM) de Ca^{2+} i Mg^{2+} a l'interior del nucli cel·lular. Tal i com indiquen els valors, les concentracions d'aquests ions són superiors durant la mitosi. Taula adaptada de Strick et al. (2001).

1.5.4. Models estructurals pel cromosoma metafàsic.

L'estructura dels cromosomes metafàsics encara presenta molts interrogants. El fet que els cromosomes presentin un grau de compactació molt elevat, juntament amb els canvis en l'estructura de la cromatina nativa segons les condicions iòniques del medi, ha dificultat l'estudi d'aquest complex macromolecular. Malgrat això, s'han proposat diversos models per tal d'explicar el mecanisme de plegament de la cromatina en els cromosomes metafàsics.

1.5.4.a. Models basats en llaços de cromatina ancorats a un eix proteic.

Aquests models estan basats en una estructura en la qual, la fibra de cromatina s'uniria de forma radial a un eix proteic situat a l'interior de cadascuna de les cromàtides. El model va ser proposat per Laemmli i col·laboradors (Paulson i Laemmli, 1977; Marsden i Laemmli, 1979), a partir de l'observació per microscòpia electrònica de cromosomes obtinguts a concentracions iòniques molt elevades. En aquests experiments, en els quals s'havien eliminat la majoria de les histones, es va proposar que els llaços contindrien entre 50 i 100 kbp de DNA i que formarien fibres de 30 nm que es plegarien helicoidalment per donar lloc a fibres més gruixudes d'uns 250 nm. Aquestes fibres es plegarien fins a donar lloc a les cromàtides metafàsiques (figura 1.18.A).

Segons el model, els llaços de cromatina s'uneixen a l'esquelet proteic per regions concretes de DNA riques en AT (regions SARs). Aquestes regions interaccionarien específicament amb la topoisomerasa II i la condensina (Maeshima i Laemmli, 2003).

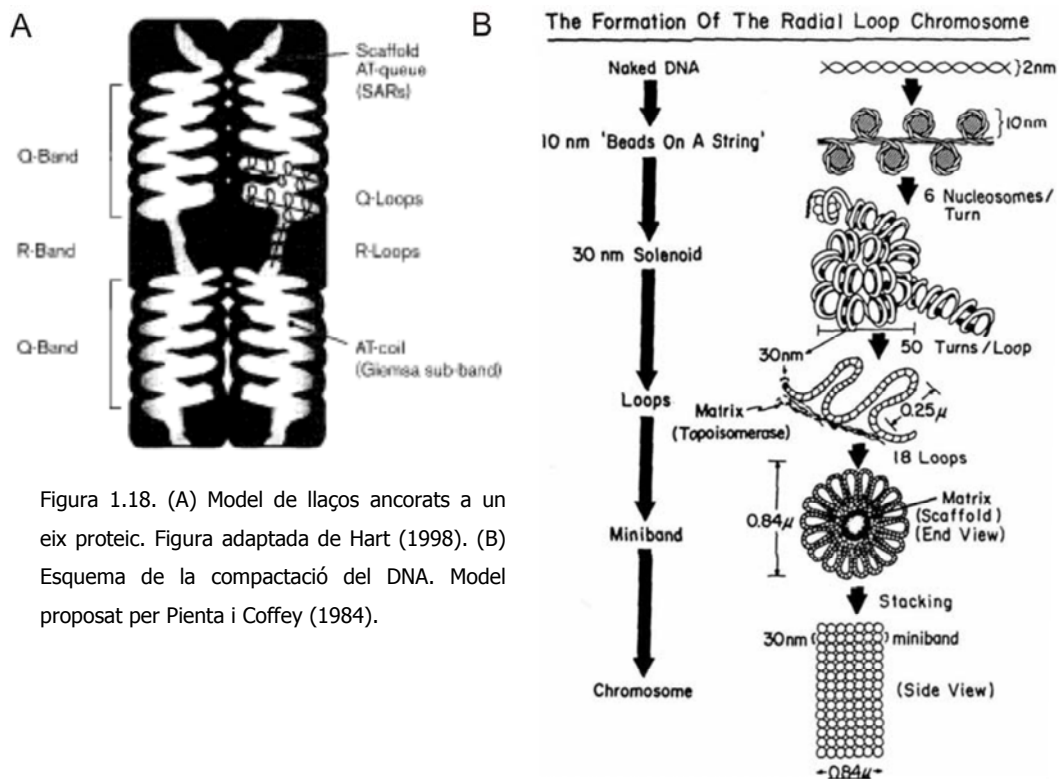


Figura 1.18. (A) Model de llaços ancorats a un eix proteic. Figura adaptada de Hart (1998). (B) Esquema de la compactació del DNA. Model proposat per Pienta i Coffey (1984).

Altres investigadors van proposar altres models que partien d'aquest. Cal destacar el model proposat per Pienta i Coffey (1984), que consisteix en llaços de DNA ancorats a una matriu nuclear (figura 1.18.B). Els llaços estan formats per fibres de 30 nm que contenen unes 60 kbp. En aquest model es va proposar que hi ha minibandes, les quals estarien formades per 18 llaços.

1.5.4.b. Models basats en el plegament helicoidal.

En aquest tipus de models, la unitat bàsica a través de la qual es dona el plegament helicoidal és la fibra de 30 nm. Taniguchi i Takayama (1986) van proposar els primers models de plegament helicoidal: la fibra de 30 nm es plega helicoidalment per donar lloc a una fibra d'ordre superior de 200 nm de diàmetre. Aquesta fibra es tornaria a plegar helicoidalment per formar la cromàtide metafàsica (figura 1.19).

Alguns investigadors han proposat models de plegament helicoidal que es suporten sobre un esquelet proteic. Per exemple, Stack i Anderson (2001) van proposar que la fibra de 30 nm s'ancorava a un esquelet proteic formant llaços i donant lloc a una estructura cilíndrica que es condensaria de forma helicoidal durant la metafase per crear la cromàtide.

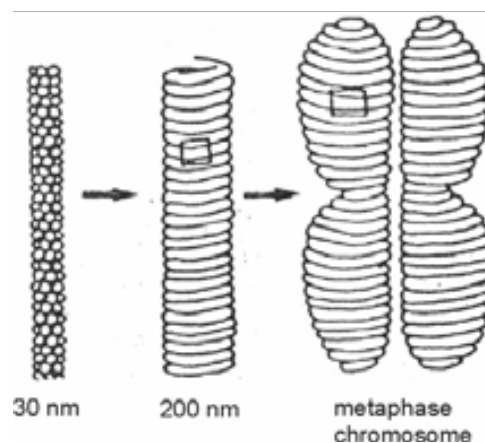


Figura 1.19. Model de plegament helicoidal proposat per Taniguchi i Takayama (1986).

1.5.4.c. Models recents heterogenis.

1.5.4.c.1. Model basat en cromòmers.

Els cromòmers es podrien definir com agregats de cromatina que no presenten una orientació definida. Aquestes estructures ja s'havien observat durant certes fases de la profase primerenca (El-Alfy i Leblond, 1989). Posteriorment, Belmont i Bruce (1994) van definir un model de plegament en el qual la fibra de 30 nm es plega per generar una fibra de cromonema d'entre 60 i 80 nm. Aquesta darrera fibra es plega també per donar lloc a dos nivells superiors de plegament: fibres de 100-130 nm de diàmetre en primer lloc, i les cromàtides de 600 nm. Aquest model no és incompatible amb els models d'esquelet proteic proposats anteriorment, però destaquen el fet que

els cromòmers actuen com a intermediaris durant el procés de formació dels llaços i l'esquelet proteic.

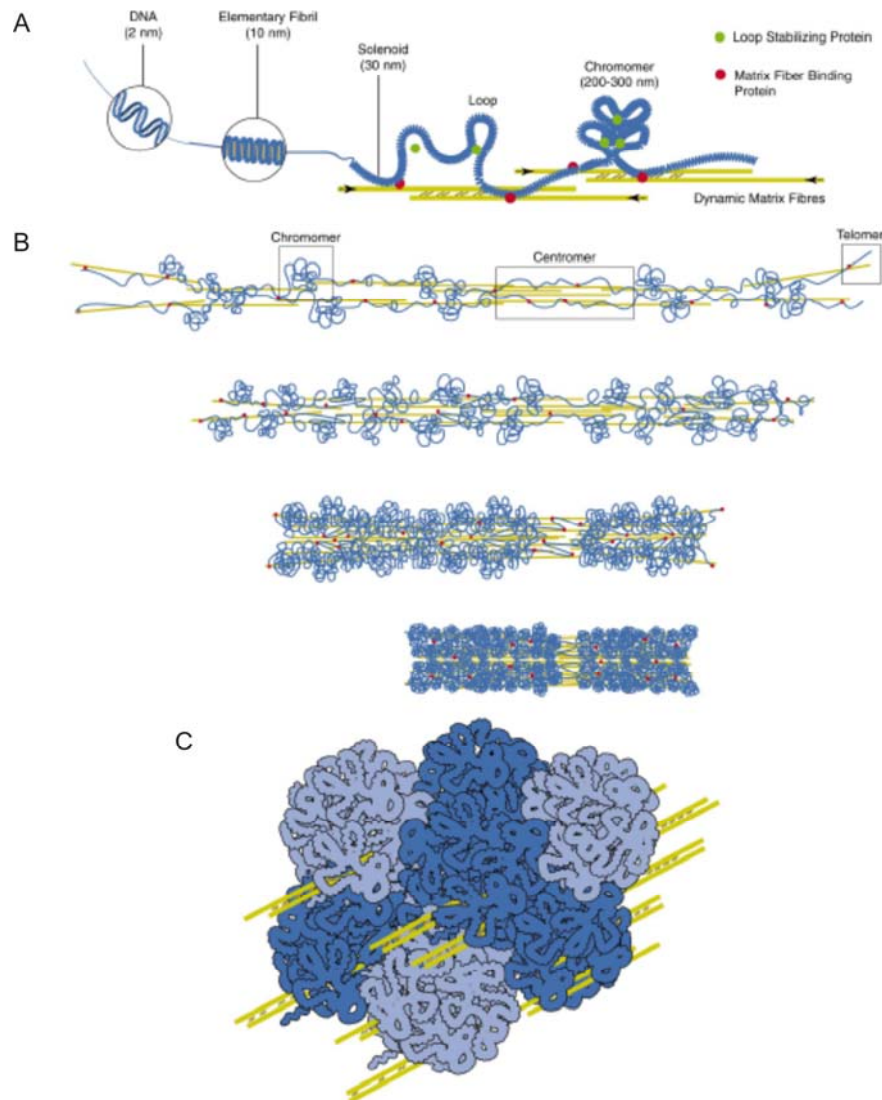


Figura 1.20. Model de condensació de la cromatina basat en cromòmers. (A) Inici de la condensació de la matriu de fibres a la zona del centròmer. (B) Compactació dels cromòmers. (C) Clusters de 500 llaços d'un cromòmer (200-300 nm de diàmetre). Figura adaptada de Wanner i Formanek (2000).

Finalment, Wanner i Formanek (2000) van proposar un model basat en cromòmers utilitzant estudis de SEM d'alta resolució. En aquest cas, es formarien petites fibres elementals d'aproximadament 10 nm que es condensarien formant solenoides (25-30 nm). Es va proposar que els cromòmers (200-300 nm) es formarien a partir de l'acció de proteïnes estabilitzadores que generarien una matriu de fibres paral·leles (figura 1.20). Els autors van proposar que la condensació s'iniciava al centròmer, que principalment estaria format per una matriu de fibres, i finalitzava als telòmers.

1.5.4.c.2. Model de plegament jeràrquic.

Aquest model es basa en el plegament successiu del DNA, des de la fibra de 10 nm fins a la formació de les cromàtides. A diferència de models anteriors, en aquest tipus de plegament no es considera necessària la presència d'un esquelet proteic per poder dur a terme el plegament del material genètic. Inicialment, el model partia de l'estudi de cromosomes parcialment desnaturalitzats i es va veure que existien diversos dominis estructurals que s'anaven succeint fins a donar lloc a la cromàtide. Posteriorment, estudis amb cromosomes interfàsics van permetre observar diferents agrupacions cromatíniques (Belmont i Bruce, 1994). Finalment, es va proposar un model de plegament jeràrquic pel cromosoma metafàsic (figura 1.21), on la cromatina adquiria una morfologia amorfa (Kireeva et al., 2004).

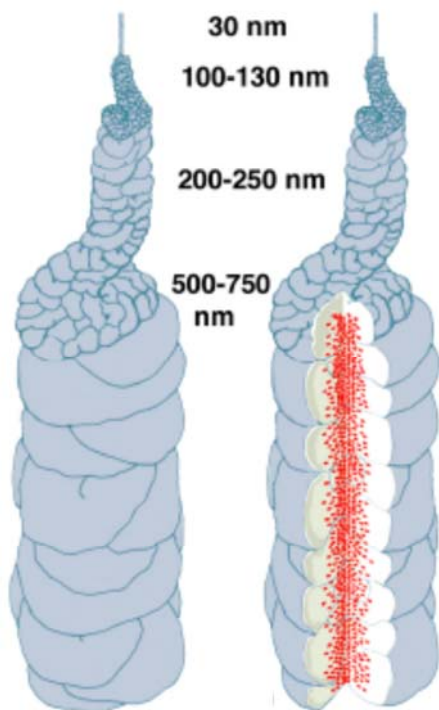


Figura 1.21. Model de plegament jeràrquic pel cromosoma metafàsic (tan sols es representa en el cas d'una cromàtide). La condensina (marró) ocupa aproximadament un terç del diàmetre de la cromàtide, actuant com una cola (crosslinking glue) que estabilitza el cromosoma metafàsic. Figura adaptada de Kireeva et al. (2004).

1.5.4.c.3. Models dinàmics.

Els models dinàmics es basen en estudis sobre les propietats mecàniques dels cromosomes. En particular s'ha estudiat l'elasticitat dels cromosomes mitjançant tècniques biofísiques de micromanipulació.

- Models mixtes.

Aquest model es basa en l'anàlisi de les propietats mecàniques a partir d'estudis realitzats amb cromosomes reconstituïts en presència d'extracte d'ous de *Xenopus*. Els autors del model van mesurar la deformabilitat longitudinal i la rigidesa al corbament dels cromosomes i van observar que els cromosomes eren molt flexibles (Houchmandzadeh i Dimitrov, 1999). Van proposar un

model mixt, on els cromosomes estarien formats per eixos proteics fins, elàstics i deformables, però amb una rigidesa important, rodejats d'una coberta de cromatina molt deformable (figura 1.22).

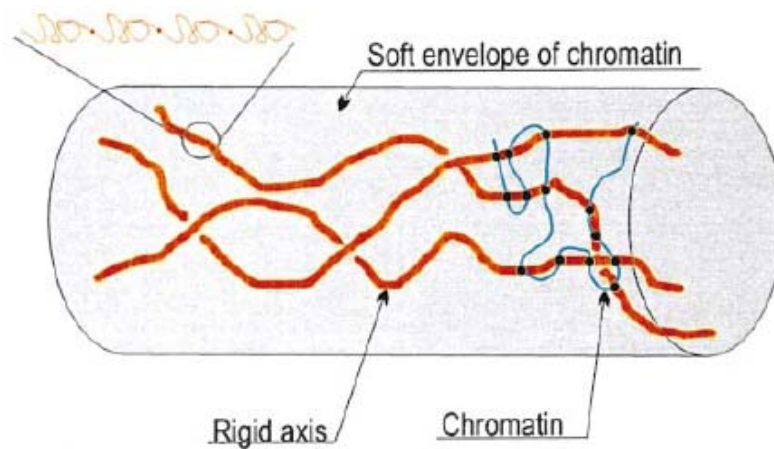


Figura 1.22. Esquema del model de plegament per cromosomes metafàsics basat en mesures d'elasticitat. El cromosoma conté alguns eixos rígids, envoltats de cromatina. Els eixos rígids estan formats per molècules semblants a la titina, amb dominis repetitius. Figura adaptada de Houchmandzadeh et al. (1999).

Posteriorment, Almagro i col·laboradors (2004) van realitzar més experiments que indicaven que les propietats elàstiques dels cromosomes eren degudes al DNA. A més, van suggerir que l'interior dels cromosomes reconstituïts presentava una organització heterogènia. Consideren que les proteïnes SMC participen en aquesta organització i que el grau d'empaquetament dels cromosomes metafàsics ve determinada per la concentració de cations divalents units al DNA durant la mitosi.

- Model reticular.

El model reticular està basat en el comportament elàstic dels cromosomes sotmesos a una tensió mecànica mitjançant micropipetes. Poirier i Marko (2002) van mostrar com variava l'elasticitat del cromosoma en presència de nucleases i per canvis temporals de la concentració iònica del medi. Els resultats que van obtenir no eren compatibles amb el model d'esquelet proteic proposat anteriorment, i suggerien que els cromosomes eren entitats molt dinàmiques i elàstiques.

Per tal de poder demostrar la importància de les interaccions electrostàtiques en el manteniment de l'estructura del cromosoma,

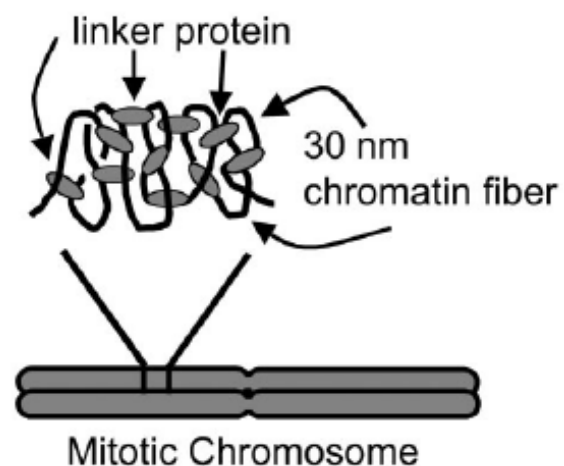


Figura 1.23. Model reticular. Les línies negres representen la fibra de 30 nm, mentre que les boles grises representen proteïnes que connecten la cromatina. Figura adaptada de Poirier i Marko (2002).

es van sotmetre els cromosomes a diverses condicions iòniques. Els autors van observar que a concentracions molt elevades de cations monovalents i divalents (>500 mM NaCl i > 200 mM $MgCl_2$), així com en concentracions relativament baixes de cations monovalents (< 30 mM NaCl), els cromosomes es descondensaven. Per contra, concentracions intermèdies d'ions divalents (10 mM $MgCl_2$ o 20 mM $CaCl_2$), provocaven la condensació. Per altra banda, també es van fer estudis amb nucleasa micrococcal i amb enzims de restricció que van demostrar que el DNA era el responsable de la integritat dels cromosomes. Es va proposar que el cromosoma presenta una estructura reticular (network), on es produïa un entrecreuament cada 15 kbp (figura 1.23).

1.5.4.d. Model de les plaques primes de cromatina.

Al grup d'investigació on s'ha realitzat la tesi es va proposar un nou model d'organització de la cromatina en els cromosomes metafàsics basat en el descobriment d'estructures multilaminars en cromosomes parcialment desnaturalitzats (Caravaca et al., 2005).

Mitjançant microscòpia electrònica de transmissió, s'ha vist que aquestes estructures que anomenem plaques de cromatina són un element estructural dels cromosomes. Les plaques són primes (d'aproximadament 6 nm cada estrat) i presenten una superfície molt llisa. En contra de la majoria de models, que consideren la fibra de cromatina com a element bàsic de l'estructura del cromosoma, el model de les plaques primes va ser proposat a partir de resultats obtinguts amb cromosomes tractats amb condicions iòniques properes a la metafase (figura 1.24).

Mitjançant l'observació amb microscòpia electrònica convencional, criomicroscòpia electrònica, microscòpia de força atòmica i tomografia electrònica (Castro-Hartmann,

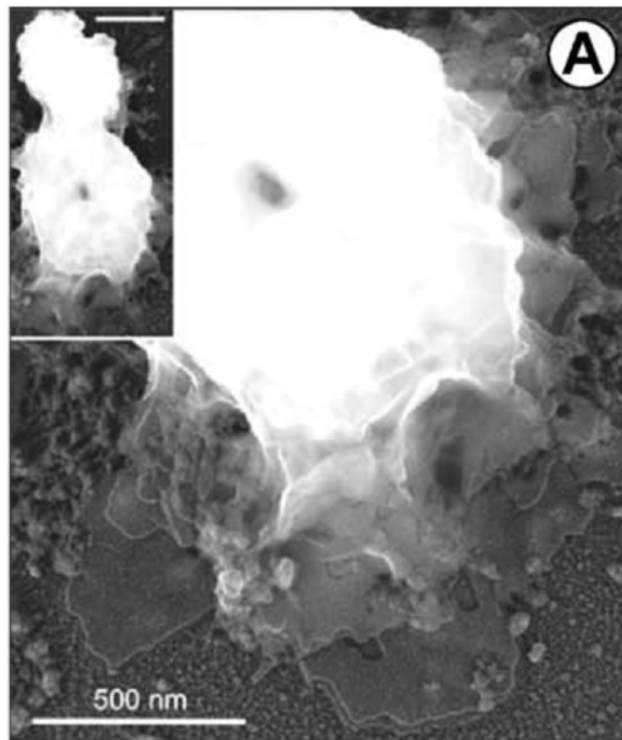


Figura 1.24. Plaques emanades de cromosomes metafàsics parcialment desnaturalitzats observats amb microscòpia electrònica de transmissió. Figura adaptada de Daban (2011).

2009; Gállego et al., 2009), es va proposar que les cromàtides estan formades per plaques i que aquestes s'apilen de forma perpendicular a l'eix de la cromàtide a l'interior dels cromosomes (figura 1.25.A). L'aplicació de diferents tractaments desnaturalitzants provocaria el lliscament i la deformació de les plaques, fent que aquestes fossin parcialment visibles a la perifèria de les cromàtides (figura 1.25.B). En aquests estudis també van indicar que, per justificar el petit gruix de les plaques cal que els successius estrats estiguin interdigitats. Posteriorment, a partir d'experiments de microscòpia de força atòmica, espectroscòpia de forces i de nanotribologia que

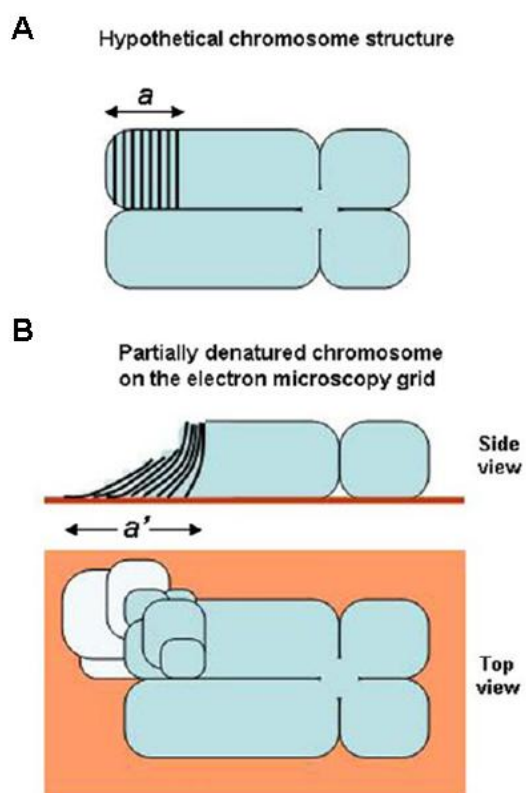


Figura 1.25. Model d'estructuració en plaques primes per la cromatina condensada en els cromosomes metafàsics. Figura adaptada de Gállego et al (2009).

permetien estudiar la mostra en medi aquós (Gállego et al., 2009 i 2010), es va determinar que el DNA és el principal responsable de les propietats mecàniques de les plaques. Aquests estudis van permetre concloure que les plaques estaven formades per una xarxa bidimensional flexible i mecànicament resistent, que permetia l'emmagatzematge segur del DNA durant la mitosi. Finalment, cal remarcar que l'organització de la cromatina formant plaques perpendiculars a l'eix del cromosoma podria explicar l'aparició de les bandes en tincions citogenètiques de cromosomes (Daban, 2011).

1.6. Objectius.

Després de dècades d'investigació, el plegament de la cromatina a l'interior dels cromosomes metafàsics segueix sent un dels problemes més difícils de resoldre de la biologia estructural. Gran part dels models de plegament més acceptats van ésser proposats a partir d'estudis en condicions de molt baixa força iònica. Aquests models no poden explicar l'elevada concentració local de DNA observada en els cromosomes metafàsics (Daban, 2000). Tal com s'ha descrit anteriorment, al nostre grup d'investigació es va observar mitjançant múltiples tècniques (Caravaca et al. 2005; Gállego et al. 2009; Castro-Hartmann, 2009; Daban, 2011), que els cromosomes metafàsics contenen un nou element bàsic de plegament: la placa de cromatina. La possibilitat de plegar la cromatina en forma plana en els cromosomes ha donat lloc al model de les plaques primes descrit a l'apartat 1.5.3.d.

Com a objectiu general, el treball experimental realitzat en aquesta tesi pretén ampliar el coneixement sobre l'estructura interna dels cromosomes metafàsics utilitzant condicions iòniques properes a les observades a la metafase. En el present treball, s'ha estudiat l'estructura de la cromatina en els cromosomes metafàsics des de dos punts de vista molt diferents. En primer lloc, tenint en compte les consideracions de l'apartat 1.5, s'ha estudiat l'estructura dels cromosomes sencers dins les cèl·lules mitjançant tècniques de microscòpia de polarització.

Per altra banda, anteriorment al grup s'havien fet estudis amb fragments de cromatina purificats d'eritròcits de pollastre (Bartolomé et al., 1994 i 1995; Bermúdez et al., 1998) i s'havia detectat una lleu tendència a la formació de petits agregats laminars d'aquests fragments (Gállego et al., 2009). En aquesta tesi, s'ha realitzat un ampli estudi de la capacitat d'autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics de cèl·lules humanes en condicions properes a les observades a la metafase.

Els objectius concrets del present treball experimental són:

1. Investigar sistemes per intentar millorar les tècniques de preparació de cromosomes a partir de cèl·lules HeLa en cultiu. També s'han fet experiments per millorar les tècniques de microscòpia electrònica emprades per la visualització de la cromatina dels cromosomes metafàsics.
2. Contribuir a l'estudi de l'estructura interna dels cromosomes metafàsics nadius en medi aquós. Com que en treballs previs (veure apartat 1.3) s'ha demostrat que les estructures formades per les NCP poden estudiar-se mitjançant microscòpia de polarització, en aquesta part de la tesis s'ha utilitzat aquest tipus de microscòpia.
3. Investigar la possibilitat d'autoassociació de plaques a partir fragments de cromatina procedents de cromosomes de cèl·lules humanes digerits amb nucleasa micrococcal. L'estructura dels agregats s'ha estudiat mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. S'ha realitzat una recerca exhaustiva de condicions i de procediments que, en principi, podrien afavorir l'autoassociació.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. Procediments generals.

2.1.1. Preparació de sacs de diàlisi.

Es separaven uns 4 metres de sacs de diàlisi Medicell (Visking Size 2-18/32" o 1-8/32") i es submergien en 2 l de 1 mM EDTA (pH 8.0) en un matrau Erlenmeyer de 2 l de capacitat tapat amb un vidre de rellotge. S'escalfava la solució fins a l'ebullició i es deixava refredar. A continuació es descartava el líquid, s'afegien de nou 2 l del mateix tampó i es portava a l'ebullició. Un cop refredat, es buidava el matrau i es rentaven els sacs de diàlisi fins a 5 cops amb aigua destil·lada. Els sacs es guardaven a 4°C en 1 l d'aigua destil·lada amb 10 gotes de cloroform per evitar la contaminació per microorganismes.

2.1.2. Purificació de medis i condicions de treball en els experiments de microscòpia electrònica.

Per tal de prevenir l'aparició d'artefactes en els experiments de microscòpia, es necessiten condicions de neteja i esterilitat adequades. La manipulació de les reixetes de microscòpia electrònica es realitzava en una zona neta i per evitar contaminacions es portava una màscara quirúrgica durant tot el procés.

Un focus important de contaminació són els medis on es troba la mostra. Per evitar la seva contaminació, tots els tampons eren preparats i filtrats a través de dispositius de filtració estèrils, habitualment d'un sol ús. Els filtres emprats eliminaven partícules, microorganismes i precipitats, ja que el diàmetre de porus de les seves membranes és de 0.22 µm. Segons el volum filtrat, s'usaven diferents dispositius indicats a la taula 2.1:

Volum filtrat	Dispositiu de filtració emprat
0 – 10 ml	Millex, membrana ME-Millipore, filtre per xeringa
10 – 50 ml	Steriflip, membrana Millipore Express PLUS, filtre per tubs de 50 ml
50 – 1000 ml	Stericup de 250 ml, amb membrana Millipore GP Express
	Steritop de 500 ml, amb membrana Millipore GP Express

Taula 2.1. Dispositius de filtre usats per la purificació de medis i tampons.

2.2. Cultius cel·lulars. Preparació de cromosomes de HeLa.

Es van emprar cultius de cèl·lules HeLa (línia tumoral humana). Com a medi de cultiu s'usà Eagle's Minimum Essential Medium (MEM- α), complementat amb sèrum fetal boví (FBS) 10% (v/v) i 2 mM GlutaMax (Invitrogen).

Les cèl·lules HeLa emprades pels estudis creixen per adherència sobre les superfícies dels recipients usats. A més, han estat immortalitzades amb el virus del papil·loma humà i cal aplicar mesures de bioseguretat de nivell 2. Cal treballar en cabines de flux laminar adequades (Bio-II-A, Telstar) i eliminar correctament els residus generats.

2.2.1. Establiment i manteniment d'un cultiu cel·lular.

Es va partir d'un criotub de 1-1.5 ml conservat en nitrogen líquid (-196°C). Cada criotub contenia una suspensió de cèl·lules HeLa en medi crioprotector [FBS i DMSO 10% (v/v)], a una concentració de 10^6 cèl·lules. El DMSO és un compost orgànic tòxic per les cèl·lules, especialment a 37°C . Per tant, es van mantenir els vials i les cèl·lules a 4°C durant tot el temps possible del procés per tal d'assegurar la viabilitat cel·lular. Es descongelà el vial durant 1 minut en un bany a 37°C , s'afegí medi de cultiu i es sembrà en un flascó de 25 cm^2 (Cultek); el volum s'ajustà amb medi de cultiu fins a 9 ml totals. S'incubà el cultiu preparat en un incubador (Forma Scientific) a 37°C , al 5% CO_2 i 90% d'humitat. Amb aquest mètode d'establiment de la línia cel·lular, calia canviar el medi de cultiu on es trobaven les cèl·lules el dia posterior a la sembra de les cèl·lules per tal d'eliminar restes de DMSO. Un cop les cèl·lules creixien amb normalitat, s'escalava el cultiu a flascons de superfícies més grans.

Paral·lelament, calia controlar periòdicament l'estat del medi de cultiu. El canvi de color del medi de cultiu de rosa cap a colors ataronjats indica que el medi està esgotat. Generalment, calia canviar el medi de cultiu de 2 a 3 vegades per setmana. Per canviar el medi, s'aspirà el medi amb una pipeta pasteur, evitant tocar la monocapa de cèl·lules. Seguidament, s'afegí medi fresc temperat a 37°C . El volum afegit depenia del flascó amb el que es treballava.

<i>Superfície del flascó</i>	<i>Marca comercial</i>	<i>Volum de medi emprat</i>
25 cm^2	Sarstedt	5 ml
75 cm^2		15 ml
225 cm^2	Cultek	45 ml
300 cm^2	BD	75 ml
¹ 600 cm^2	Millipore / Nunc	130 ml

Taula 2.2. Relació de la superfície dels flascons utilitzats amb el volum de medi corresponent.

¹ Superfície total dels flascons triples.

Per altra banda, també cal tenir en compte la confluència del cultiu. Un cop el cultiu ha arribat a la confluència del 80%, cal fer una disgregació enzimàtica amb tripsina per tal de separar les cèl·lules

entre elles. Es va extreure el medi del flascó per no inactivar la tripsina amb el sèrum present en el medi complementat. Es va fer un rentat amb PBS (1-3 ml) per eliminar restes de sèrum. S'afegí la dissolució de tripsina (3 ml per flascons de 75 cm²). La solució de tripsina contenia tripsina porcina 5 g/l i EDTA 2 g/l, i es diluïa 10 vegades en PBS abans d'ésser emprada. Es deixà incubar el cultiu a 37°C durant 1 min (es podia seguir el procés per observació al microscopi òptic) i s'afegí medi complementat (fins a dos volums de la solució de tripsina) per inactivar l'enzim. Abans de sembrar al flascó de cultiu, s'aïllaven les cèl·lules per centrifugació durant 6 min a 400 *g* (centrífuga Sorvall TC6 amb el rotor H-400, o amb la centrífuga Eppendorf Centrifuge 5702). Es resuspengué el sediment en un volum petit de medi de cultiu i s'afegí una part a un flascó de cultiu. Finalment, s'afegí medi de cultiu fresc, fins al volum corresponent al flascó (taula 2.2) i es deixà en un incubador a 37°C, al 10% CO₂ i 90% d'humitat.

2.2.2. Sincronització de cèl·lules per bloqueig a la fase M.

Per tal d'obtenir gran quantitat de cèl·lules en metafase i, per tant, de cromosomes metafàsics, s'usà colcemid (Invitrogen). Aquest compost és un derivat de la colxicina i provoca la despolimerització reversible dels microtúbuls. Cal considerar, però, que com més llarg sigui el tractament amb el bloquejador, més dificultat es tindrà per recuperar el cultiu. La concentració emprada de colcemid és de 0.1 µg/ml pels nostres experiments i va ser establerta en estudis anteriors (Craig, 1999). S'afegí colcemid quan el cultiu estava a un 70% de confluència. El temps de tractament va ser entre 12 i 16 h.

2.2.3. Obtenció i extracció de cèl·lules metafàsiques.

A partir d'un cultiu bloquejat, es poden extreure les cèl·lules metafàsiques. En el cas de les cèl·lules HeLa, durant la mitosi les cèl·lules es separen de la superfície on es troben adherides i adquireixen una morfologia esfèrica i refringent, perfectament distingible de les interfàsiques (estrellades i adherides a la superfície). Es recuperà el medi de cultiu procedent de flascons de 225, 300 o 600 cm² en tubs cònics de 50 ml i s'afegí PBS al flascó (5-15 ml, segons la superfície del flascó). Per shake-off, es separaren les cèl·lules metafàsiques que encara estaven unides a la superfície del flascó. Es recuperaren aquestes cèl·lules i s'afegiren al medi separat anteriorment. Es centrifugaren aquestes mostres durant 10 min a 400 *g* (centrífuga Sorvall TC6 amb el rotor H-400) i es recuperà el sediment, que es resuspengué en un volum concret de PBS. A partir d'aquesta mostra es va fer un recompte cel·lular per tal de determinar la concentració cel·lular (apartat 2.2.4). Es centrifugà de nou la mostra a 400 *g*, durant 10 min a temperatura ambient i es descartà el sobrenedant. El sediment fou resuspès posteriorment en el medis indicats als apartats 2.3, 2.4 i 2.6.

2.2.4. Recompte cel·lular.

Inicialment, el recompte de les cèl·lules metafàsiques es feia amb la cambra de Neubauer, però també es va usar el comptador automàtic de cèl·lules TC10 Automated Cell Counter (BioRad).

Per al recompte amb la cambra de Neubauer, s'agafà una alíquota de volum conegut de les cèl·lules extretes resuspeses en PBS i es mesclà amb el mateix volum de Trypan blue al 0.4%. Aquest colorant penetra a l'interior de les cèl·lules mortes, però no de les vives. D'aquesta manera, les cèl·lules vives tindran un aspecte refringent, mentre que les mortes es veuran blaves. Es col·locà una gota de la suspensió cel·lular a la cambra de Neubauer i es va fer un recompte de totes les cèl·lules presents en quatre camps.

La mitjana de les cèl·lules comptades a cada camp (X), el factor de dilució (FD) usat i el factor que té en compte el volum real de la cambra (10) permeten trobar la concentració de cèl·lules presents a la mostra:

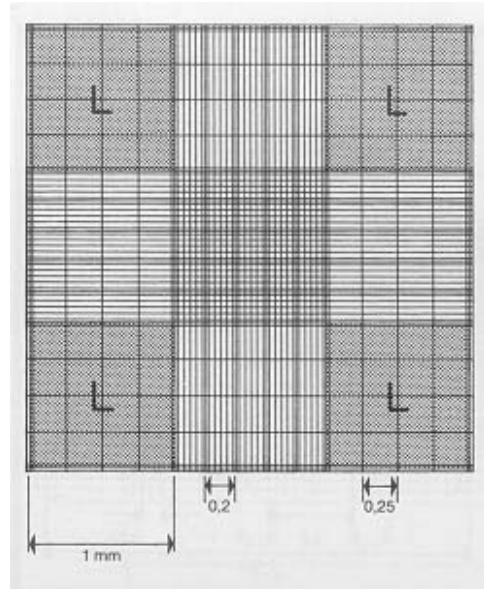


Figura 2.1. Detall dels camps observables de la cambra de Neubauer.

$$\text{Cèl·lules}/\mu\text{l} = X \cdot 10 \cdot \text{FD}$$

Per conèixer el nombre total de cèl·lules, es multiplicà el resultat obtingut pel volum de mostra.

En el cas del recompte realitzat amb el comptador TC10, es va usar una alíquota de 10 μl de les cèl·lules extretes resuspeses en PBS. La mostra s'introduïa en uns portaobjectes proporcionats per BioRad. A diferència del protocol anterior, en aquest cas no calia la tinció amb Trypan blue.

2.3. Millora del procés d'obtenció de cromosomes metafàsics.

2.3.1 Estudi del bloqueig en metafase a diferents temps.

Es varen emprar cultius de cèl·lules HeLa bloquejats a la metafase en diverses condicions per tal de poder estudiar l'estructura de la cromatina en els cromosomes a l'inici del bloqueig.

S'afegí colcemid a una concentració de 0.1 µg/ml a un cultiu (225 cm²) al 70% de confluència i s'analitzà el seu efecte a diferents temps després de l'adició de la droga: 0, 2, 4, 5, 8 i 14 h.

Per processar la mostra, es va fer l'extracció de cèl·lules metafàsiques pel mètode del shake-off (apartat 2.2.3). Un cop es tenien les cèl·lules aïllades, es van resuspendre amb tampó hipotònic (75 mM KCl) a una concentració de 2·10⁶ cèl·lules/ml i es varen incubar en un bany a 37°C durant 10 min. Aquest pas provoca un inflament de les cèl·lules a causa de l'efecte hiposmòtic generat. La mostra es va centrifugar a 275 g (centrífuga Sorvall TC6 amb el rotor H-400) durant 5 min i es descartà el sobrenedant. El sediment es va resuspendre amb tampó de poliamines a una concentració de 8·10⁶ cèl·lules/ml i s'incubà en un bany a 37°C durant 30 min. El tampó de poliamines conté 15 mM TEA-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EGTA, 2 mM EDTA-KOH (pH 7.4), 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.2 mM espermina i 0.5 mM espermidina. Finalment, la mostra era fixada i tenyida tal i com es descriu a l'apartat 2.10.2.

2.3.2. Estudi de l'efecte del pH i altres tractaments en l'alliberació de cromosomes.

Estudis previs havien determinat que l'ús de medis de pH àcid afavorien l'extracció de cromosomes metafàsics (Mendelsohn et al. 1968; Sone et al. 2002). Es treballà amb un ventall de pH entre 3.0 i 5.0 per tal de veure quin efecte tenia aquest canvi de condicions.

2.3.2.a. Tractaments amb medis hipotònics.

En primer lloc i pràcticament en tots els casos, les cèl·lules es van incubar amb tampó hipotònic a una concentració de 2·10⁶ cèl·lules/ml en un bany a 37°C durant 10 min per tal d'inflar-les. Es van emprar els següents medis:

- Tampó àcid de pH variable.
- 35 mM HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 2.6.
- Tampó hipotònic 75 mM KCl. En aquests cas es va fer una segona incubació amb el tampó de poliamines.

El tampó àcid conté tampó citrat-fosfat de pH variable (0.1 M àcid cítric, 0.2 M fosfat sòdic dibàsic), 0.1 M sacarosa, 1 mM MgCl₂ i 1 mM CaCl₂.

2.3.2.b. Altres tractaments.

Un cop acabades les incubacions, s'observà la mostra al microscopi de fluorescència, mitjançant una tinció amb DAPI, IP o Hoescht (apartat 2.10.1). A partir de les observacions fetes, es varen fer diversos tractaments mecànics per tal de veure quin permetia la màxima alliberació dels cromosomes:

- Homogeneïtzació amb èmbol: S'afegí la mostra en un tub de vidre i es passà després l'èmbol (10-15 passades), evitant la formació de bombolles.
- Tractament amb boles de vidre: S'afegí el mateix volum de boles de vidre (Sigma-Aldrich) que de cèl·lules. Es va agitar en un vòrtex durant 5 s i es varen deixar sedimentar les boles de vidre. La mostra es recuperà per aspiració amb una pipeta pasteur.
- Pas per xeringa: Es va passar la mostra (dues vegades) per una xeringa amb una agulla Precision Glide 22G1 (Beckton Dickinson).
- Tractament amb detergents: En els tractaments amb medis hipotònics, esmentats anteriorment, s'afegí Tritó X-100 a una concentració de 0.1% (v/v).

2.4. Obtenció de controls per a mostres de microscòpia electrònica.

Per tal d'assegurar-nos que les mostres observades per microscòpia electrònica no eren un artefacte produït per productes usats durant la purificació dels cromosomes, com la precipitació de sals o de sacarosa, es van fer controls a diferents concentracions que van consistir en substituir la mostra de cromosomes per bacteris *E. Coli* o boles de làtex. També es va emprar la mescla d'ambdós.

2.4.1. Boles de làtex.

Es va partir d'una solució mare de boles de làtex (Sigma-Aldrich) de 0.1 μm de diàmetre i d'una concentració de $1.3 \cdot 10^{12}$ boles/ml. Per aconseguir una correcta separació de les boles de làtex, es sonicaven les solucions preparades abans de ser emprades (sonicador Branson 1510, 2 cicles de 5 min de 42 kHz).

Es van preparar diverses suspensions de boles de làtex a diferents concentracions. Les dilucions es feien amb tampó PM-50% sacarosa (p/v). El tampó PM conté 5 mM Pipes (pH 7.2), 5 mM NaCl i 5 mM MgCl_2 . Es van analitzar les següents concentracions: $5 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^{10}$, $5 \cdot 10^{10}$, $1 \cdot 10^{11}$ i $5 \cdot 10^{11}$ boles/ml. A més, seguint els protocols de dilució de la mostra per observar cromosomes metafàsics, es diluïa un volum de cada condició amb un volum de PM sense sacarosa. Un cop es tenien les mostres a analitzar preparades, s'estenien sobre reixeta seguint els protocols habituals del grup (apartats 2.12.4.b i 2.12.5.b).

2.4.2. *E. Coli*.

Es va fer un cultiu de nit en medi LB en presència d'ampicil·lina de la soca *E. Coli BL21(DE3) pLysS*. Un cop crescuts, es van centrifugar el cultius a 4000 rpm (centrifuga Heraeus) durant 5 min. Es va resuspendre el sediment obtingut amb 1 ml de tampó PM-50% sacarosa i es va mesclar bé mitjançant un vòrtex. Degut a que no sabíem la concentració exacta de bacteris, vam utilitzar una bateria de dilucions: 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/10000. Finalment, es mesclava un volum de la solució de bacteris preparada amb un volum de tampó PM sense sacarosa. La mostra era estesa sobre reixetes seguint els protocols que s'han indicat a l'apartat anterior.

2.4.3. Mescla.

Es van preparar també mostres combinant concentracions conegudes de bacteris i boles de làtex. Es van seleccionar les solucions 1/500 de bacteris i la de $5 \cdot 10^{10}$ boles/ml. D'aquesta manera, es va fer una dilució $\frac{1}{2}$ de la mostra abans de fer la mescla (en tampó PM) i després es va mesclar un volum de cada solució. La mostra es va estendre com en els apartats anteriors.

2.5. Obtenció de fragments de cromatina.

2.5.1. Obtenció de cromosomes metafàsics.

Es partia de cèl·lules metafàsiques resuspeses en tampó hipotònic a una concentració de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. Es centrifugà la mostra a 275 *g* (1250 rpm a la centrífuga Allegra) durant 5 min i se'n descartà el sobrenedant. El sediment es va resuspendre amb tampó de poliamines-digitonina a una concentració de $8 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml i es transferí a un homogeneïtzador Dounce amb un èmbol de tefló per tal de sotmetre les cèl·lules a un tractament mecànic suau. Al tampó de poliamines, descrit anteriorment, s'afegia digitonina a una concentració final de 1 mg/ml. La digitonina és un detergent no-iònic, molt hidrofòbic, que permet el trencament de les membranes cel·lulars. Com que era molt difícil dissoldre el detergent en el tampó poliamines, la solució preparada s'incubava a 37°C durant 20 min. Seguidament es filtrava a través d'una membrana de 0.22 μm de diàmetre de porus i es conservava en gel fins al seu ús. La suspensió de cèl·lules s'homogeneïtzava passant-la fins a 15 vegades per l'èmbol. La solució es centrifugava a 200 *g* durant 10 min a 4°C. Es guardava el sobrenedant i es repetia el procés amb el sediment resultant. Finalment, es conservaven les fraccions obtingudes a 4°C.

2.5.2. Purificació de cromosomes en gradients esglaonats de sacarosa.

Es va fer una centrifugació dels cromosomes obtinguts en un gradient esglaonat de sacarosa. S'usaven fraccions de 60, 50, 40 i 30% (p/v) de sacarosa dissolta en tampó PM (figura 2.2). A cada gradient s'afegia entre 1 i 1.5 ml de mostra. Els gradients eren centrifugats a 3600 *g* en un rotor basculant (6000 rpm al rotor JS 13.1), durant 15 min a 4°C i sense frenada. Els cromosomes es situaven a les interfases de 40-50% i de 50-60%. Per recuperar els cromosomes, s'aspirava el material amb l'ajut d'una pipeta pasteur. El material obtingut es conservava a 4°C per a estudis posteriors.

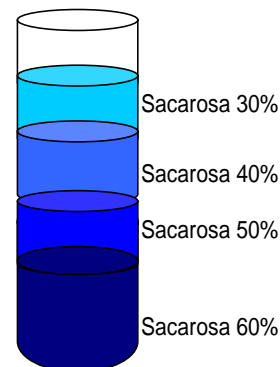


Figura 2.2. Estructura del gradient esglaonat de sacarosa. Els cromosomes es localitzaven a les interfases de 40-50 i de 50-60 % de sacarosa.

2.5.3. Digestió amb nucleasa micrococal.

S'utilitzava la nucleasa micrococal (Sigma-Aldrich) per fragmentar els cromosomes purificats. L'enzim es dissolia inicialment amb aigua milliQ a una concentració stock de 1 mg/ml. Aquesta podia conservar-se en alíquotes a -20°C durant mesos o a 4°C durant un mes.

Per cada experiment, calia fer un assaig previ de l'activitat de la nucleasa micrococal, mesurant la hipercromicitat creixent a 260 nm provocada per la degradació del DNA de doble cadena de timus de vedella (Cuatrecasas et al., 1967).

En primer lloc, la concentració de DNA d'una solució s'obtenia mesurant l'absorbància a 260 nm, on el coeficient d'extinció absorció del DNA és de $20 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. El valor d'absorbància a 320

nm es restava al valor obtingut a 260 nm, per corregir l'efecte de partícules que poden dispersar la llum (Gallagher, 1994; Gallego, 1994). La concentració de cromatina en solució es mesurava a partir de la concentració de DNA obtinguda per aquest mètode. La mesura de la concentració de DNA es feia amb l'espectrofotòmetre Cecil 3000 Series (Cecil Instruments), però també es va usar l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000 (Thermo). L'espectrofotòmetre Cecil 3000 Series permetia mesures d'absorbància puntuals i l'obtenció d'espectres en cubetes de 1 ml de capacitat i 1 cm de pas òptic (*Eppendorf*UVette). El pas òptic podia arribar a ser de 0.2 cm, girant la cubeta 90°, cosa que resultava de gran utilitat per mostres d'alta concentració. En el cas de les mesures fetes amb l'aparell NanoDrop 2000, tan sols era necessari 1 µl de la mostra per fer la mesura. El propi dispositiu analitzava la mostra i en donava la concentració de DNA i la relació de 260 nm/320 nm. Per realitzar l'assaig, es partia d'1 ml de DNA a una concentració de 50 µg/ml, al qual s'afegia 1 µl de 1 M CaCl₂, 5 µl de 1 M MgCl₂ i 5 µl d'una solució 1:100 de l'enzim en aigua destil·lada. Es feia una cinètica de 3 min a 37°C en un espectrofotòmetre Cary 400 Bio (Varian). Aquest procés es repetia amb 10 µl i 15 µl de la dilució 1:100 de l'enzim i es calculava l'activitat, tenint en compte la zona on l'augment d'absorbància era lineal en funció del temps, aplicant la següent equació:

$$\text{Activitat (unitats arbitràries)} = \frac{A_{\text{màx}} - A_{\text{mín}}}{t \cdot V}$$

On;

$A_{\text{màx}}$ és l'absorbància màxima a 260 nm en l'interval seleccionat.

$A_{\text{mín}}$ és l'absorbància mínima a 260 nm en l'interval seleccionat.

t és el temps, en min, de l'interval seleccionat.

V és el volum, en µl, de la dilució 1:100 de nucleasa micrococcal afegit.

La solució de cromosomes es temperava a 37°C durant 5 min, previs a la digestió enzimàtica. La concentració d'enzim i el temps de digestió enzimàtica variaven segons l'experiment. Normalment, s'afegien entre $2.52 \cdot 10^{-3}$ i $2.52 \cdot 10^{-4}$ U d'enzim per cada 1 ml de cromosomes purificats. Per tal que l'enzim fos actiu, s'afegia també 1 M CaCl₂ fins a una concentració final de 1 mM. La digestió s'incubava entre 5 i 15 minuts en un bany a 37°C. La reacció s'aturava afegint 0.2 EDTA (pH 7.5) fins a una concentració de 10 mM i es deixava 10 min en un bany de gel.

2.5.4. Rentat de les mostres digerides: Diàlisi amb condicions de baixa força iònica.

Per tal d'eliminar suaument la sacarosa i obtenir filaments de cromatina, es va sotmetre la mostra a una diàlisi amb tampó 10 mM EDTA, 10 mM Pipes (pH 7.4) i 1 mM PMSF. La diàlisi es deixava tota la nit a 4°C. Passat aquest temps, es centrifugava la mostra a 2500 g (3300 rpm a la centrífuga Allegra), durant 5 min a 4°C. Un cop recuperat el sobrenedant, es retirava una alíquota de mostra per tal de fer un seguiment del procés mitjançant microscopia electrònica (detallat a l'apartat 2.12.4.a i 2.12.5.a).

2.6. Purificació de fragments de cromatina per electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzants.

2.6.1. Electroforesi no desnaturalitzant en gels d'agarosa 0.5%-TB1x.

Per tal de poder purificar els fragments de cromatina obtinguts de la digestió dels cromosomes metafàsics amb nucleasa micrococcal es va utilitzar l'electroforesi en gels d'agarosa no desnaturalitzants. A més, la tècnica permetia analitzar posteriorment els fragments mitjançant altres tècniques. Es van utilitzar els sistemes Mini Sub-Cell (Bio-Rad).

Inicialment, aquest tipus d'electroforesi es realitzava en presència de 1.7 mM MgCl₂, que provocava l'estructuració de la cromatina a l'interior del gel electroforètic (Bartolomé et al., 1995). Com que algunes de les mostres no s'introduïen correctament als gels, es va decidir realitzar l'electroforesi en gels en absència de MgCl₂.

Per preparar el gel, es pesava l'agarosa en un matrau Erlenmeyer [0.5% (p/v)] i s'afegia el volum adequat de tampó TBx1 (90 mM Tris i 90 mM àcid bòric). La solució es portava a l'ebullició i s'anava agitant durant el procés fins que la mescla fos completament transparent, moment en el qual es deixava refredar. Mentre es refredava la solució, es segellaven els marges del suport d'agarosa amb cinta adhesiva i es col·locava el formador de butxaques fins a una distància màxima del fons de 1-2 mm. Quan la temperatura de la solució d'agarosa era de 40°C, s'abocava la solució al suport i es deixava gelificar durant 30 min a temperatura ambient. A continuació, es retirava el formador de butxaques i la cinta adhesiva. També es feia un rentat de les butxaques amb tampó TBx1 per tal d'evitar la presència de fragments d'agarosa al seu interior. Finalment, es submergia el gel en tampó d'electroforesi i es carregaven les mostres.

Prèviament, les mostres de DNA es diluïen amb tampó de mostres 5x per electroforesi de DNA [Ficoll 2.5% (p/v), blau de bromofenol 0.125% (p/v), xilencianol 0.125%(p/v), Tris 0.45 M, àcid bòric 0.45 M] i es carregaven mitjançant una pipeta automàtica al gel.

La longitud dels fragments de cromatina era estimat a partir de la mobilitat electroforètica d'un patró de pesos moleculars. A partir del pes molecular estimat de les bandes de nucleoproteïna, es podia determinar el nombre de nucleosomes aproximats de la mostra. En totes les electroforesis es destinava almenys un carril pels marcadors de pes molecular. Els marcadors utilitzats contenien una mescla de la digestió del fag ϕ -X174 amb l'enzim *Hae* III amb el fag λ digerit amb l'enzim de restricció *Hind* III (GE-Healthcare). El pes molecular dels fragments comprenia desde 72 bp fins a 23130 kbp.

Un cop carregades les mostres i el patró de pes molecular, es feia l'electroforesi durant 1.5 h a 100 V.

2.6.2. Tinció i fotografia dels gels d'agarosa.

Els gels d'agarosa on s'havia carregat cromatina o DNA eren tenyits amb marcadors fluorescents. Es van emprar els colorants SYBR Safe (Invitrogen) o bromur d'etidi (Sigma-Aldrich).

Inicialment, els gels van ser tenyits amb SYBR Safe. Es parteix d'un stock comercial de 10000x dissolt en DMSO. La solució havia de conservar-se a temperatura ambient i protegida de la llum.

En el moment de tenyir el gel es preparava una solució que contenia 1 µl per cada 10 ml d'aigua. Aquesta solució es preparava al moment i era utilitzada en un temps màxim de 30 min després de la seva preparació. El gel era tenyit amb agitació rotatòria suau durant 10 min, destenyit amb aigua durant 10 min més i fotografiat amb un transil·luminador Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Degut a les longituds d'ona d'excitació i emissió del SYBR Safe, es van utilitzar els filtres Xcita Blue i 560DF50 al irradiar el gel amb llum UV per tal de visualitzar les bandes. D'aquesta manera s'obtenia una imatge digital amb una càmera CCD.

Com que la sensibilitat de la tinció amb SYBR Safe no era la desitjada, es va decidir tenyir els gels amb bromur d'etidi. En aquestes tincions, es partia d'una solució concentrada de 10 mg/ml del marcador. Per la tinció s'afegia 1 µl per cada 10 ml d'aigua i els temps de tinció i destinció eren els mateixos que en el cas del SYBR Safe. Per aquests gels, no calia usar els filtres usats amb el SYBR Safe. El bromur d'etidi és un colorant d'elevada toxicitat i calia manipular tots els elements que estiguessin en contacte amb el colorant amb molta precaució. Es va habilitar una zona al laboratori per la manipulació dels gels d'agarosa, es treballà amb guants i s'abocaren les solucions colorants i decolorants, els gels i tot el que havia estat en contacte amb el marcador en contenidors especials. La imatge digital s'obtenia de la mateixa manera que en el cas de la tinció amb SYBR Safe.

2.6.3. Retallada de bandes dels gels d'agarosa preparatius.

Per tal de retallar els fragments de cromatina d'interès, es col·locava el gel tenyit sobre un transil·luminador Gel Doc 1000 (Bio-Rad) i s'il·luminava amb llum UV per tal de poder visualitzar les bandes. Seguidament, es tallava el tac d'agarosa de la regió d'interès amb la fulla d'un bisturí. Calia manipular la mostra amb rapidesa per tal de minimitzar els efectes de la radiació UV sobre la cromatina i treballar rere plaques de metacrilat, a més de portar ulleres de protecció adequades per evitar cremades als ulls.

2.6.4. Extracció de cromatina de longitud coneguda procedent d'electroforesi d'agarosa.

Per tal d'extreure la mostra dels tacs d'agarosa retallats anteriorment, es trituraven els tacs d'agarosa que contenien els fragments de cromatina amb l'ajut d'un bisturí i en presència de TB1x. Seguidament, es transferia la mostra en agarosa a un sac de diàlisi convencional i es dialitzava durant tota la nit a 4°C amb TB1x. Finalment, s'eliminaven les restes d'agarosa per centrifugació en els sistemes Ultrafree (Millipore) durant 30 min a 4°C a 5000 *g* en un rotor d'angle fix (8000 rpm en el rotor JA-20). El filtrat resultant era reservat a 4°C per altres tractaments.

2.7. Aplicació de diferents tractaments per l'autoassociació.

2.7.1. Diàlisi en condicions fisiològiques.

Per tal de veure la capacitat autoassociativa dels fragments de cromatina en condicions iòniques properes a la metafase, vam realitzar diàlisi amb el tampó 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl, 17 mM MgCl₂. Aquestes condicions iòniques van ser considerades com a estàndards per als experiments d'autoassociació, ja que eren pròximes a les metafàsiques (veure apartat 1.5.31). En els experiments típics, la mostra era dialitzada entre 5 i 6 h a 4°C.

Es van utilitzar sacs amb diverses mides de porus:

- Sacs amb un diàmetre de porus convencional (massa molecular retinguda: 12.4 kDa). Els sacs preparats tal com s'ha explicat a l'apartat 2.1.1, es rentaven exhaustivament amb aigua milliQ i es conservaven amb el tampó de la diàlisi fins al seu ús.
- Sacs amb un diàmetre de porus gran (massa molecular retinguda: 1000 kDa). En principi, les diàlisis amb un diàmetre de porus molt gran permetien eliminar proteïnes i altres components no cromatínics. Calia col·locar els sacs amb aigua milliQ durant 15 min abans del seu ús per tal d'eliminar la presència de contaminants. Els sacs es conservaven amb el tampó de la diàlisi fins al seu ús.

Per altra banda també es van utilitzar els sistemes Slide-A-Lyzer MINI Dialysis (Thermo). Aquestes unitats permetien realitzar la diàlisi amb molt poc volum (100 µl) i un cop la mostra ja estava dipositada sobre reixeta (apartat 2.12.4.b i figura 2.3).

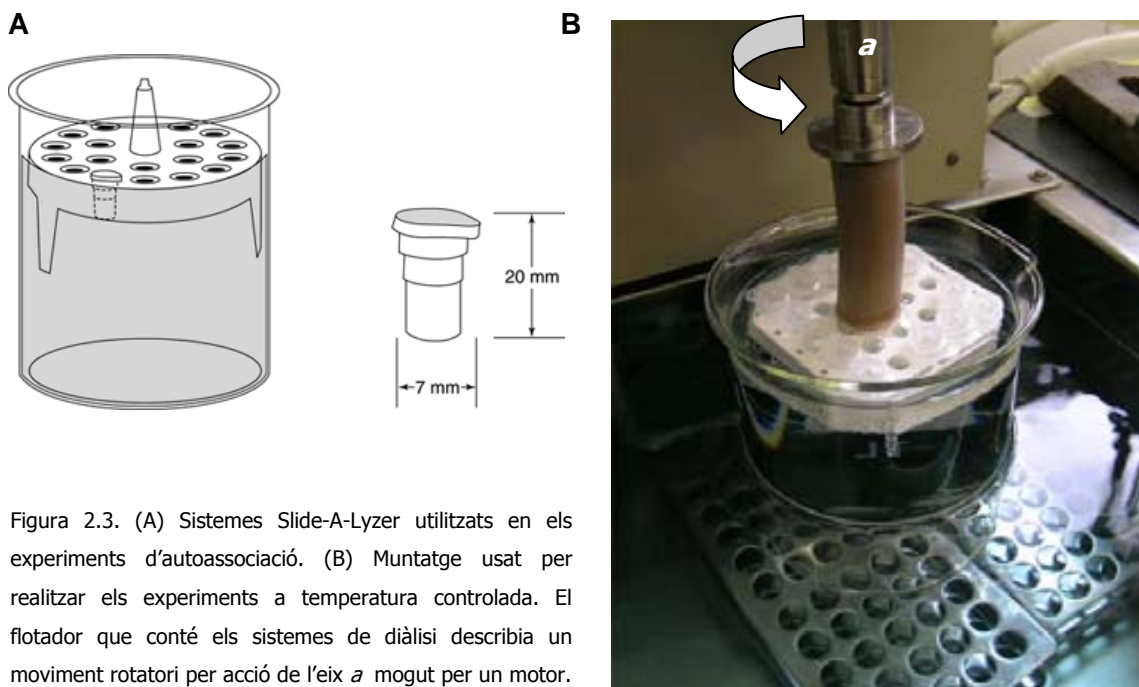


Figura 2.3. (A) Sistemes Slide-A-Lyzer utilitzats en els experiments d'autoassociació. (B) Muntatge usat per realitzar els experiments a temperatura controlada. El flotador que conté els sistemes de diàlisi describia un moviment rotatori per acció de l'eix *a* mogut per un motor.

2.7.2. Associació dels fragments de cromatina a diferents condicions.

Es va estudiar l'efecte de diferents condicions sobre l'associació de fragments de cromatina. Es van realitzar diàlisis amb tampons de diferent força iònica, a diferents temps i temperatures, tal com s'indica a la taula 2.3.

Un cop aplicats els tractaments, es preparava la mostra per la posterior observació al microscopi electrònic de transmissió (apartats 2.12.4.b i 2.12.5.b).

Variable	Condicions emprades
Força iònica	Baixa 1 mM Pipes (pH 7.2), 1 mM EDTA
	Intermèdia 10 mM Pipes (pH 7.2), 1-15 mM MgCl ₂
	Elevada 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 17 mM MgCl ₂ 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 17 mM MgCl ₂ , 2.5-25 mM CaCl ₂
Concentració	Es diluïa la mostra fins a 20 vegades per tal d'analitzar la capacitat d'autoassociació dels fragments obtinguts a diferents concentracions. En altres casos, es va concentrar la mostra amb els sistemes Amicon Ultra 4 (Millipore).
Temperatura	Es va analitzar la capacitat d'autoassociació a 4°C, 25°C i 37°C.
Temps	Es va analitzar mostra a diferents temps de diàlisi: 1, 3, 5, 7, 9, 12 i 24 h.
Altres	Fragments de cromatina de diferent pes molecular. Incubació de les estructures obtingudes amb medis desestructurants (10 mM EDTA i 5 mM NaCl).

Taula 2.3. Condicions d'incubació dels fragments de cromatina procedents de cromosomes metafàsics humans¹.

¹ Les condicions detallades a la taula es van combinar entre elles per tal d'analitzar com afectaven de forma conjunta a la formació d'agregats en un ventall més ampli de condicions.

2.8. Anàlisi electroforètica de les mostres: electroforesi de proteïnes.

2.8.1. Concentració dels fragments de cromatina.

Per tal de poder realitzar l'electroforesi de les histones presents en la mostra, en la majoria dels casos calia concentrar la mostra. Es van utilitzar els sistemes Amicon Ultra 4 (porus de 10 kDa). Les membranes s'havien de preparar anteriorment al seu ús: s'afegia en primer lloc 1 ml de NaOH 1 N i es centrifugava a 4000 rpm (centrífuga Heraeus) a 4°C durant 15 min. Seguidament, es feia un rentat de la membrana amb 1 ml d'aigua milliQ (es centrifugava de nou durant 15 min a 4000 rpm). Finalment, s'afegia la mostra a concentrar i es centrifugava fins a obtenir un volum d'entre 50 i 100 µl.

Quan la mostra procedia de gels d'agarosa no desnaturalitzants, primer calia extreure els fragments de cromatina d'interès dels tacs d'agarosa. A diferència del protocol descrit a l'apartat 2.6.5, el tac d'agarosa triturat s'incubava durant 3 h a temperatura ambient amb 1 ml de tampó TBE1x (90 mM Tris, 90 mM àcid bòric, 1 mM EDTA)-0.1%SDS en els sistemes Ultrafree (Millipore). Passat aquest temps, els dispositius es centrifugaven a temperatura ambient durant 30 min a 5000 *g* en un rotor d'angle fix (8000 rpm en el rotor JA-20). La mostra era llavors concentrada seguint el protocol descrit al paràgraf precedent.

2.8.2. Preparació de les mostres.

Per l'anàlisi en gels d'acrilamida-SDS convencionals, es mesclava la mostra concentrada amb una cinquena part del volum de tampó de mostres per proteïnes 5x [28 ml glicerina, 5 gr SDS, 8.3 ml Tris-HCl 1.5 M pH (6.8), 5 mg de blau de bromofenol, 8.7 ml d'aigua milliQ i 10% β-mercaptoetanol (v/v)]. Finalment, les mostres s'incubaven en un bany a 100°C durant 3 min. En aquell punt, les mostres podien ser carregades al gel directament o conservades a -20°C.

2.8.3. Electroforesi en gels d'acrilamida.

La preparació dels gels es va adaptar a partir de protocols descrits anteriorment en el nostre grup (Bartolomé, 1994; Caño, 2007). Les electroforesis es van realitzar en un aparell MiniProtean II (Bio-Rad). El sistema estava format per un gel separador i un gel apilador.

Solució pel gel separador:

- 5 ml d'una solució d'acrilamida al 30% (p/v) i bisacrilamida al 0.8% (p/v) (Bio-Rad).
- 2.5 ml de 1.5 M Tris (pH 8.8).
- 100 µl de SDS 10% (p/v).
- 2.3 ml d'aigua destil·lada.
- 100 µl de persulfat amoni 10% (p/v).
- 10 µl de TEMED.

S'homogeneïtzava la solució abans i després d'afegir el TEMED, que s'addicionava al final per iniciar la reacció de polimerització. La solució es dipositava ràpidament al sistema MiniProteanII i s'afegien 500 µl d'isopropanol per tal que l'oxigen atmosfèric impedisís la polimerització de la part

alta del gel. Es deixava polimeritzar el gel durant uns 5 min a temperatura ambient. Un cop polimeritzat es realitzaven rentats de la part superior del gel amb aigua milliQ per poder eliminar l'isopropanol; finalment, la superfície del gel s'assecava amb un paper de filtre.

Sobre el gel separador s'afegia la solució del gel apilador. Un cop dipositada la solució es col·locava una pinta formadora de butxaques i es deixava polimeritzar a temperatura ambient durant 5 min, aproximadament.

Solució per gel apilador:

- 1 ml d'una solució d'acrilamida al 30% (p/v) i bisacrilamida al 0.8% (p/v) (Bio-Rad).
- 1.25 ml de Tris 0.5 M (pH 6.8).
- 25 µl de SDS 10% (p/v).
- 2.67 ml d'aigua destil·lada.
- 50 µl de persulfat amoni 10% (p/v).
- 5 µl de TEMED.

Després de la polimerització, es retirava el formador de butxaques i es rentaven les butxaques amb el tampó d'electroforesi [Tris 0.025 M, glicina 0.192 M i SDS 0.05% (p/v)]. Les mostres es dipositaven als pouets amb l'ajuda d'una pipeta Hamilton. Com a control, s'afegien 2 ng d'histones purificades i aïllades procedents de pollastre i de timus de vedella. A més, s'afegia un marcador de pes molecular d'ampli rang (6.5-200 kDa). S'iniciava l'electroforesi, a un voltatge constant de 100 V. Un cop havia entrat la mostra al gel separador, es pujava el voltatge a 150 V, fins que el front sortís del gel.

2.8.4. Tinció de gels convencionals.

2.8.4.a. Tinció amb el colorant Coomassie Blue.

Es preparava una solució stock de Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich) al 0.1% (p/v) en àcid acètic 10% (v/v) i metanol 50% (v/v). El gel es submergia en la solució de tinció i es deixava un mínim de 1 h en agitació. Es feia un doble rentat amb aigua destil·lada per treure l'excés de colorant. Finalment, es destenyia el gel amb una solució decolorant que contenia àcid acètic 7% (v/v) i metanol 5% (v/v). La imatge del gel tenyit s'obtenia amb el densitòmetre GS 800 (Bio-Rad).

2.8.4.b. Tinció amb el fluoròfor Nile Red.

El colorant Nile Red s'uneix a les micel·les formades per SDS i proteïna que es troben al gel. El mètode és molt sensible. El Nile Red és insoluble amb aigua, però és soluble, i mostra un important increment de fluorescència, en presència de dissolvents no polars i en presència de micel·les pures de SDS i de complexos proteïna-SDS.

Es va seguir el protocol descrit al nostre grup (Alba et al., 2009). El gel es tenyia amb una dissolució 1:200 d'una solució concentrada de Nile Red (0.4 mg/ml Nile Red en DMSO) en 500 ml d'aigua destil·lada. Ràpidament, es submergia el gel en aquesta solució en agitació circular (300

rpm) durant 5 min. Seguidament, el gel es rentava fins a 3 vegades amb aigua destil·lada i es transil·luminava amb llum UV. Finalment, es fotografiava amb el sistema Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

2.8.4.c. Tinció amb Oriole.

El fluoròfor Oriole (Bio-Rad) és un colorant d'elevada sensibilitat (límit de sensibilitat per sota de 1 ng) que s'uneix fortament a les proteïnes. Aquesta molècula presenta el màxim d'excitació a 270 nm i el màxim d'emissió a 604 nm.

Per a la tinció del gel amb aquest fluoròfor, es feia un primer rentat amb aigua i seguidament es submergia el gel amb una solució de tinció subministrada per la casa comercial durant 90 min amb agitació circular constant (300 rpm) a temperatura ambient. Finalment, el gel es transil·luminava amb UV i es fotografiava amb l'aparell Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

2.9. Anàlisi electroforètic de les mostres: electroforesi de DNA.

En alguns casos va ser necessari determinar la composició de DNA de la cromatina procedent de les bandes de gels electroforètics d'agarosa no desnaturalitzants. Els processos de líquidació i gelificació de l'agarosa van ser idèntics que en l'apartat 2.6.1, tot i que en aquest cas la composició del gel era la següent: TBE1x, 0.05% SDS (p/v) i 0.7% agarosa.

Després de córrer els fragments de cromatina en una primera dimensió en gels d'agarosa no desnaturalitzants, es retallava la banda d'interès amb un bisturí per obtenir un tac de 1.5 mm x 3 mm i s'introduïa amb l'ajut d'una espàtula en una butxaca d'un gel de agarosa 0.7%, TBE1x i SDS 0.05% (p/v). Calia anar amb molt de compte de no originar bombolles d'aire a l'interior de la butxaca, per tal d'augmentar la superfície de contacte entre els dos gels i assegurar així una correcta migració del material. Finalment, es segellava la part superior de les butxaques amb agarosa low-melting 1% (SeaKem) - TBE1x. L'electroforesi es realitzava a un voltatge de 100 V durant 1.5 h. La tinció del gel es realitzava tal i com s'especifica a l'apartat 2.6.2.

2.9.1. Determinació del pes molecular en gels d'agarosa.

Per determinar el pes molecular de les bandes de DNA en gels d'agarosa, es realitzava una recta de calibració de la mobilitat electroforètica en front del logartime de pes molecular per a les bandes de DNA presents en el carril on havien corregut els marcadors de pes molecular. A la recta de regressió obtinguda a partir de les mobilitats dels marcadors podíem estimar el pes molecular de la mostra de nucleoproteïna analitzada. Els marcadors utilitzats contenien una mescla de la digestió del fag ϕ -X174 amb l'enzim *Hae* III amb el fag λ digerit amb l'enzim de restricció *Hind* III. El pes molecular dels fragments comprenia desde 72 bp fins a 23130 kbp.

La imatge del gel tenyit s'adquiria amb el sistema Gel Doc 1000 (Bio-Rad) i la imatge digitalitzada es tractava amb el software Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad). D'aquesta manera s'obtenien les representacions de la mobilitat en front a la intensitat de la banda. La mobilitat de les mostres era la corresponent al màxim pic de densitat. El pes molecular de les bandes de DNA, calculat d'aquesta manera, s'usava per estimar la longitud dels fragments de DNA de la mostra.

2.10. Processament i observació de la mostra per microscòpia òptica.

2.10.1. Microscòpia de fluorescència

Es van emprar els fluoròfors iodur de propidi (IP), Hoescht i 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). En primer lloc, es prepara una solució estoc de 1 mg/ml amb aigua milliQ. Aquestes dissolucions poden guardar-se a 4°C durant períodes de temps llargs (2-3 setmanes). Abans de fer els experiments es prepararen dilucions de 1 µg/ml, usant com a dissolvent el tampó en el qual s'havia resuspès la mostra. Es mesclà la mostra amb el mateix volum de solució de tinció i es varen posar 20 µl de la preparació en un portaobjectes. S'observà la mostra coberta amb un cobreobjectes amb un microscopi òptic DMRB (Leica) per contrast de fase i per fluorescència. L'obtenció d'imatges es va fer amb una càmera Leica DC 200 connectada al microscopi òptic.

2.10.2. Microscòpia de camp clar.

2.10.2.a. Fixació de la mostra.

La mostra es va fixar mitjançant una mescla de metanol i àcid acètic (3:1). El medi fixador es va preparar el mateix dia de l'experiment i es va conservar a 4°C. El procediment consisteix en mesclar la mostra amb la solució fixadora fresca (per cada 1.3 ml de mostra s'afegien 9 ml de solució fixadora). Es centrifugà la mostra a 200 *g* amb el rotor JA-20 durant 7 min a 4°C, es va extreure el sobrenedant i es va resuspendre el sediment en el mateix volum de solució fixadora. Es repetí el procés entre dues i tres vegades. Com més repeticions del procés es facin, més fixat quedarà el material i millor serà la qualitat de la tinció, però anirà disminuint també el rendiment del procés.

Finalment, es va resuspendre el sediment en solució fixadora fresca fins assolir el volum inicial de mostra. Un cop fixades les mostres, es poden conservar a -20°C o fer una tinció per observar-les al microscopi òptic.

2.10.2.b. Tinció Giemsa i observació al microscopi.

Per l'observació al microscopi òptic de camp clar es va deixar caure una gota de la mostra fixada sobre un portaobjectes (des d'uns 70 cm d'alçada, amb una pipeta pasteur ancorada a un suport metàl·lic). Un cop seca, es va cobrir el portaobjectes amb colorant Giemsa al 0.4% (v/v) durant 2 min. Passat aquest temps, es va col·locar el portaobjectes lateralment en un suport, de manera que quedés cobert per aigua destil·lada. Passats 2 min es va fer un rentat amb aigua corrent, durant 5 min més. Llavors, es deixà assecar a l'aire. Finalment, es va posar una gota de solució muntadora (DPX) sobre la mostra i es col·locà el cobreobjectes a sobre evitant la formació de bombolles. S'observà la mostra amb un microscopi òptic DMRB (Leica) en camp clar. L'obtenció d'imatges es va fer amb una càmera Leica DC 200 connectada al microscopi.

2.11. Microscòpia de polarització.

2.11.1. Fonaments.

El moviment de vibració d'una ona de llum és perpendicular a la seva direcció de propagació. En un feix de llum polaritzada plana, totes les ones emeses vibren en una direcció paral·lela a un pla determinat (Perkins i Henke 2002).

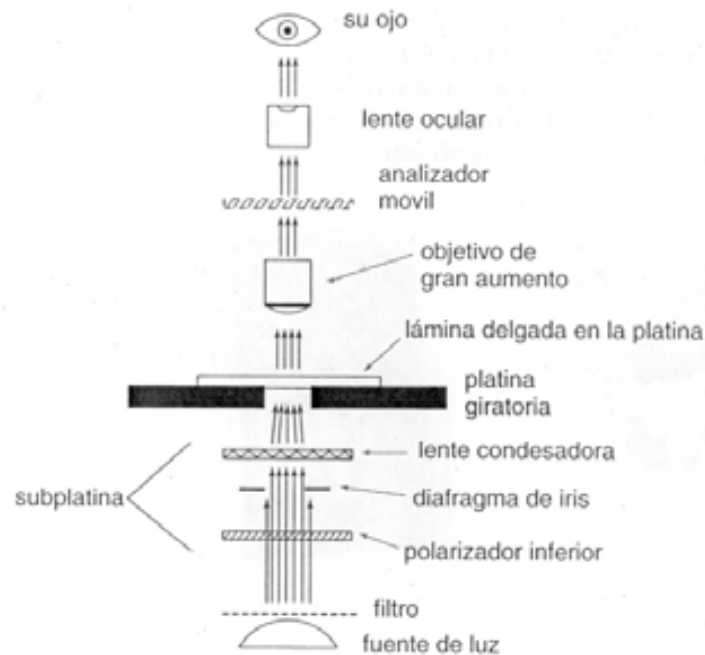


Figura 2.4. Components d'un microscopi de polarització. Adaptat de Perkins i Henke (2002).

El microscopi de polarització consta de dos filtres polaritzants (figura 2.4):

- Polaritzador inferior: Assegura que tota la llum incident sobre la platina sigui polaritzada plana.
- Polaritzador superior (analitzador mòbil): Es pot orientar des de 0° fins a 90° respecte l'anterior i també pot retirar-se de la trajectòria del feix de llum.

Quan l'analitzador es troba a 90° respecte el feix de llum (polaritzadors creuats) es diu que està en posició d'extinció. Els objectes isotròpics són capaços de transmetre o absorbir la llum polaritzada en totes les direccions de forma uniforme. No es veuen il·luminats quan el polaritzador i l'analitzador es situen en posició d'extinció. Els objectes anisotròpics són capaços de modificar el pla de vibració de la llum polaritzada i es veuen com a objectes il·luminats quan el polaritzador i l'analitzador estan en posició d'extinció.

2.11.2. Tractaments previs a l'observació de la mostra.

En el cas de les cèl·lules metafàsiques a observar per microscòpia de polarització, es va fer una primera incubació en un bany a 37°C durant 10 min amb tampó hipotònic (75 mM KCl) a una concentració de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. Seguidament, es van centrifugar a 275 g (centrífuga Sorvall

TC6 amb el rotor H-400) 5 min a 4°C i es va descartar el sobrenedant. Diverses fraccions de la mostra es varen resuspendre en:

- Tampó poliamines (veure apartat 2.2.1).
- Tampó PNa amb 5 mM MgCl₂ (PNa-5 mM MgCl₂).
- Tampó PNa amb 20 mM MgCl₂ (PNa-20 mM MgCl₂).

El tampó PNa conté 5 mM Pipes (pH 7.2), 5 mM NaCl i 1 mM EGTA.

En tots els tractaments la concentració de cèl·lules va ser de 8·10⁶ cèl·lules/ml.

Per comprovar l'estat de les cèl·lules inflades després d'aquests tractaments, es realitzà una observació mitjançant microscòpia de fluorescència per tinció amb DAPI, usant el mètode descrit anteriorment (veure apartat 2.10.1). La mostra es conservà en un bany de gel abans de l'observació.

2.11.3. Observació per microscòpia de polarització.

Per a l'observació de les mostres mitjançant microscòpia de polarització són necessaris controls interns per verificar els resultats. En aquest treball es varen usar els següents controls:

- Calcita polvoritzada: Es fragmentà una roca de calcita (2 cm de llargada). Es passà per un molí excèntric de quars durant 2 min i s'extragué la pols amb l'ajuda d'una espàtula.
- Esperma de calamar (*Loligo vulgaris*): Es varen emprar mascles sexualment madurs (50 cm de llargada i 1 kg de pes per cada individu) procedents de la costa central catalana. Es van extreure els espermatòfors de les gònades masculines i s'obtingué l'esperma en afegir aigua milliQ sobre l'espermatòfor. L'esperma obtinguda va ser congelada amb nitrogen líquid en presència d'un medi crioprotector [glucosa 5.5% (p/v) i DMSO 10% (v/v)].

Just abans de l'observació, es mesclà una petita part del control amb la mostra obtinguda. Es van dipositar 20 µl de mostra amb el control intern en un portaobjectes i es van cobrir amb un cobreobjectes, evitant la formació de bombolles. L'observació es va fer amb un microscopi Leitz Axiotron i l'adquisició d'imatges es va fer amb una càmera Leica DC 200 connectada al microscopi.

2.12. Microscòpia electrònica.

2.12.1. Evaporador de carbó i carbó-platí.

L'evaporador que es va utilitzar en aquest treball està format per un sistema modular (Bal-Tec), format pels mòduls QSG 060, EUM 030, MED 020 i EK 030. L'aparell conté un sistema que provoca un buit molt elevat que permet que un canó d'electrons escalfi una barra de carbó o de carbó-platí, aconseguint l'evaporació de les seves partícules. L'aparell usat té dos canons: un evapora carbó i l'altre una mescla de carbó i platí. Aquests materials es troben a la barra continguda a l'interior del canó.

La barra correspon a l'ànode (potencial terra) i al seu voltant trobem el càtode en forma d'espiral (potencial negatiu). El càtode s'escalfa provocant que es desprenguin electrons, que són accelerats per la diferència de potencial fins a l'ànode. La barra rep els electrons, transformant la seva energia cinètica en calor, que provocarà l'evaporació del material de la barra. Les partícules evaporades es dipositaran sobre l'objecte que tinguem sobre el suport: reixetes o mica acabada d'exfoliar. A la vegada, també arribaran fins a una peça de quars que mesurarà el gruix de la capa dipositada. El suport on es col·loca l'objecte té la capacitat de rotar.

L'angle d'incidència de les partícules sobre les reixetes o sobre la mica és degut a la suma de diversos angles. En primer lloc, cal tenir en compte l'angle degut a la desviació dels canons de l'evaporador respecte a l'eix vertical (angle β); i en segon lloc, també tenim l'angle d'inclinació del suport circular respecte a la vertical (angle α). El primer (β) és constant ($8.9^\circ \pm 2.6^\circ$) i va ser determinat de forma experimental (Caravaca, 2004). L'angle α és variable i el seu valor variarà segons l'evaporació a realitzar.

Per evaporar carbó calia fixar la mica exfoliada sobre el suport i un cop tancada la càmera, aconseguir un buit de $2 \cdot 10^{-5}$ mbar (30 min). En el cas d'una evaporació de platí, el buit necessari era de $6 \cdot 10^{-6}$ mbar (3 h). Un cop fet el buit, es seleccionava el canó i s'especificava la diferència de potencial i la intensitat al mòdul que controlava el canó (taula 2.4).

Tipus d'evaporació	Angle β	Angle α	Voltatge (kV)	Intensitat (mA)
<i>Carbó</i>	8.9°	90°	190 kV	70 mA
<i>Carbó-Platí</i>	8.9°	6°	160 kV	60 mA

Taula 2.4. Voltatge i intensitats necessàries per cada tipus d'evaporació, per a l'observació de mostres al microscopi electrònic de transmissió.

Per augmentar la resolució de la mostra en l'observació de mostres mitjançant el microscopi electrònic de rastreig (SEM), es van dipositar gruixos superiors de platí sobre la mostra:

Tipus d'evaporació	Angle β	Angle α	Voltatge (kV)	Intensitat (mA)	Gruix (nm)
<i>Carbó-Platí (a)</i>	8.9°	45°	160 kV	60 mA	0.6 nm
<i>Carbó-Platí (b)</i>	8.9°	45°	160 kV	60 mA	2 nm

Taula 2.5. Voltatge, intensitat i gruix de carbó-platí emprat per les mostres observades per SEM.

2.12.2. Film de carbó.

Les mostres que es volien analitzar per microscòpia electrònica es dipositaven sobre reixetes de coure de 3 mm de diàmetre i 400 mesh (Sigma-Aldrich). Les reixetes tenen una cara mat i una brillant, que es diferencien quan es fa reflectir la llum en elles. Tant la capa de carbó com la mostra es dipositaven sobre la cara mat. Les reixetes es manipulaven amb pinces de precisió.

Abans de dipositar la capa de carbó sobre les reixetes, aquestes es submergien en acetona analítica en una càpsula de Petri durant 2-3 min. S'assecaven sobre un paper Whatman i es deixaven sobre paper de filtre dins d'una càpsula de Petri.

Per dipositar el carbó sobre les reixetes, s'utilitzava un embut Buckner de 5 cm de diàmetre connectat a un tub de plàstic amb una clau de pas. Es dipositava sobre la base de l'embut un suport amb forma d'anell de PVC de 4 cm de diàmetre extern i 3 cm de diàmetre intern, sobre el qual hi ha unida una malla circular de nylon de 80 μm de diàmetre de porus. Es tancava la clau de pas i s'afegia aigua milliQ a l'embut. Es posaven les reixetes a sobre la malla de nylon amb la cara mat cap amunt. A continuació s'afegia el film de carbó sobre les reixetes. La mica, que contenia el carbó evaporat sobre la seva superfície, s'introduïa lentament i amb molta cura amb un angle de 45° respecte el pla de la superfície de l'aigua. D'aquesta manera el carbó es despenia de la mica i quedava flotant sobre la superfície de l'aigua. Llavors, s'obria la clau de pas del tub de plàstic i l'embut es buidava lentament. Les reixetes amb el carbó ja dipositat eren assecades en un dessecador connectat a una trompa de buit. Un cop ja assecades, les reixetes es conservaven sobre el suport de PVC en una càpsula de Petri segellada amb Parafilm.

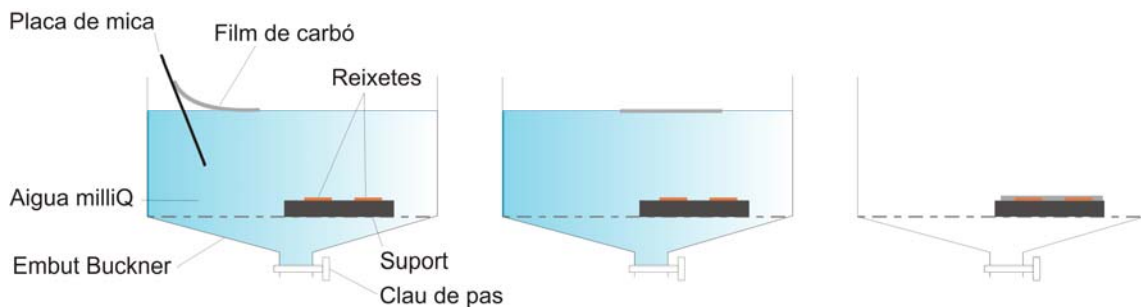


Figura 2.5. Esquema del procés seguit per col·locar el film de carbó sobre les reixetes.

2.12.3. Activació del film de carbó.

Les mostres eren esteses a les reixetes sobre el film de carbó. La superfície de carbó col·locada sobre les reixetes no permetia la correcta extensió de la mostra. Abans d'estendre la mostra sobre les reixetes es tractava el carbó per tal de conferir-li càrrega positiva per atraure la mostra. Per això, s'utilitzava el colorant Alcian Blue (Fluka).

Es preparava una solució 2 mg/ml d'Alcian Blue en àcid acètic 3% (v/v). Aquest stock podia conservar-se a temperatura ambient protegida de la llum fins a 2 dies. Es mesclaven 50 μl d'aquesta solució amb 4950 μl d'aigua milliQ. La solució havia de ser usada abans de 30 min. Es

col·locava 1 ml d'aquesta solució sobre un cobreobjectes, que a la vegada estava sobre una làmina de Parafilm, tal com mostra la figura 2.6. Seguidament es col·locaven les reixetes durant 5 min en aquesta solució i seguidament es feia un rentat de 5 min amb 1 ml d'aigua milliQ.

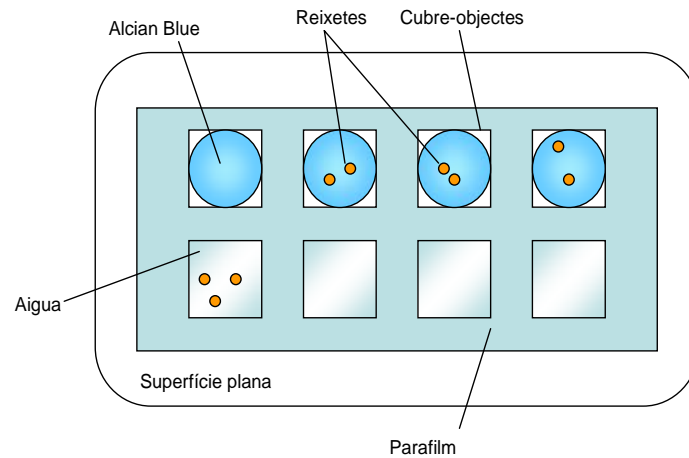


Figura 2.6. Esquema de l'activació de les reixetes amb Alcian Blue i aigua.

2.12.4. Extensió de la mostra sobre les reixetes.

Segons el tipus de mostra amb la qual es treballava, es podien fer dos tipus d'extensions: extensió directa després de la fixació de la mostra i extensió de la mostra no fixada per centrifugació.

2.12.4.a. Extensió directa sobre reixeta.

Es dipositava una gota de 10 μ l de la mostra sobre les reixetes preactivades. S'incubava durant 5 min a temperatura ambient. Seguidament, es treia l'excés de líquid amb un paper de filtre i es rentaven les reixetes per immersió en aigua milliQ durant 5 min. Finalment, les reixetes es deshidrataven durant 2-3 segons en etanol absolut i es deixaven assecar sobre paper de filtre. Un cop seques es guardaven en un porta-reixetes.

2.12.4.b. Extensió de la mostra per centrifugació.

Per estendre la mostra per centrifugació s'usava una adaptació del mètode de Miller. S'usaven taps de microtubs roscats (Rubilabor). A la part interior del tap es dipositaven entre 80 i 95 μ l de mostra² i seguidament s'introduïa la reixeta preactivada amb Alcian Blue amb el film de carboni orientat cap a la superfície. Els taps s'enroscaven amb els tubs i es col·locaven en uns adaptadors (Nylon 344497, Beckman Instruments) per a microtubs de 1.5 ml que permetien la seva inversió, tal com es mostra a la figura 2.7. Les mostres eren centrifugades a 4°C amb el rotor basculant JS 13.1 durant 15 min a 1500 *g*. Un cop passat aquest temps es treien les reixetes amb molt de compte, amb unes pinces, i es fixava el material dipositat sobre la reixeta.

² El volum de mostra dipositat sobre la reixeta depenia de la concentració de la mostra.

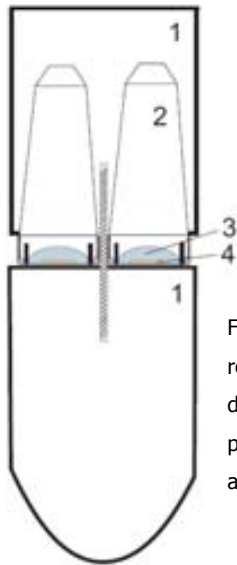


Figura 2.7. Esquema del sistema usat per estendre la mostra sobre reixeta per centrifugació. (1) Adaptador invertit per a eppendorf del rotor JS 13.1; (2) Microtub de 1.5 ml i tap rosca; (3) Mostra per depositar sobre les reixetes; (4) Reixeta de coure preactivada amb film de carboni. Figura de Gállego (2010).

2.12.5. Condicions de fixació de la mostra

La fixació de les mostres per a l'observació amb microscòpia electrònica permetia la conservació de l'estructura de la mostra durant tot el procés. En el nostre cas, la fixació es realitza amb l'agent entrecruador gluteraldehid. Aquesta molècula conté dos grups aldehid que reaccionaran amb els grups amino primaris adjacents, produint la fixació de les mostres de cromatina.

Com que el gluteraldehid perd la seva reactivitat molt ràpidament, les dissolucions que el contenien sempre eren preparades just abans de ser utilitzades. Per cada experiment, s'utilitzava un nou vial de gluteraldehid concentrat (25%, 1 ml, Sigma-Aldrich).

2.12.5.a. *Fragments de cromatina.*

Els fragments de cromatina soluble eren tractats amb diverses condicions per tal d'observar-los per microscòpia electrònica. D'aquesta manera, es podia estudiar la llargada dels fragments. En aquests casos, la fixació de la mostra es feia abans d'extendre-la sobre reixeta.

S'afegia gluteraldehid a la mostra a una concentració final de 0.20 % (v/v) i es conservava a temperatura ambient durant 3.5 h. Passat aquest temps, es dipositava la mostra sobre reixeta seguint el protocol descrit a l'apartat 2.12.4.a.

2.12.5.b. *Cromosomes metafàsics i material procedent de diàlisi.*

En el cas de mostres procedents de diàlisi estructurant o de gradient de sacarosa, la fixació es feia directament sobre reixeta. Es preparava una solució de gluteraldehid al 2.5% (v/v) amb el mateix tampó en el qual estava suspesa la mostra. Es dipositava 1 ml d'aquesta solució sobre un cobreobjectes i es col·locaven les reixetes amb la cara que contenia la mostra sobre la superfície. Les reixetes eren incubades durant 10 min. Passat aquest temps, es feien dos rentats amb aigua milliQ de 10 i 5 min respectivament.

Finalment, cada reixeta es deshidratava durant 2-3 segons amb etanol absolut i es deixava assecar sobre paper de filtre durant uns minuts. Un cop seques, es guardaven en un porta-reixetes.

2.12.6. Contrast de la mostra: platinació.

El microscopi electrònic de transmissió genera les imatges a partir de la incidència d'un feix d'electrons sobre la mostra. Els electrons que xoquen contra la mostra són desviats en funció de la densitat local d'aquesta. Les mostres biològiques tenen una baixa densitat, de manera que per visualitzar la mostra, cal contrastar mitjançant una tinció amb metalls pesants. En el nostre cas, es va fer el contrast mitjançant un ombrejat amb una mescla de carbó i platí. Es van fer ombrejats unidireccionals i rotacionals. Un cop les reixetes amb la mostra havien estat deshidratades amb etanol absolut, es dipositaven al suport de l'evaporador de C-Pt, juntament amb un petit fragment de paper, que ens permetia veure si s'havia realitzat correctament l'evaporació. Els angles de platinació, voltatges i intensitat estan indicats a les taules 2.4 i 2.5 (apartat 2.12.1).

2.12.6.a. Unidireccional.

Aquest tipus d'evaporació es va fer per determinar podem analitzar les alçades dels cossos que trobem sobre la reixeta. En aquest cas, es deixava immòbil la plataforma on es dipositaven les reixetes durant el procés d'evaporació de platí. D'aquesta manera tots els àtoms de platí es dipositen sobre la mostra amb la mateixa orientació, fet que provocava que darrere de cada partícula es generi una zona totalment inaccessible al metall. L'alçada del cos es pot calcular a partir de la mesura de la longitud de l'ombra que ha generat. Segons la mida dels cossos, era convenient obtenir ombres més o menys llargues. Per això, es variava l'angle d'inclinació de la plataforma. El gruix de la capa de platí evaporada era d'1 nm.

2.12.6.b. Rotacional.

En aquest cas, es va fer rotar el suport, de manera que quedà una capa de carbó-platí uniforme sobre la mostra. Com en el cas anterior, el gruix de la capa de platí evaporada era d'1 nm. Amb aquest tipus de platinació es contrasten els contorns i els canvis d'alçada dels objectes estudiats.

2.12.7. Observació de la mostra al microscopi electrònic.

Finalment, la mostra s'observava al microscopi electrònic. En aquesta tesi, es van usar tres microscopis diferents:

Microscopi Electrònic de Transmissió:	Hitachi H70000 de 100 kV i Jeol JEM 1400 de 120 kV.
Microscopi Electrònic de Rastreig:	Zeiss-Merlin FE-SEM.

Tots els microscopis usats portaven incorporats sistemes d'adquisició d'imatges (càmera digital CCD). Les imatges obtingudes a través de les càmeres digitals eren invertides, calibrades i processades amb el software Digital Micrograph (Gatan). Finalment, es van muntar les figures utilitzant el programa CorelDraw X3.

2.13. Mesura i anàlisi de la distribució d'alçades d'una mostra.

Per poder mesurar l'alçada dels cossos presents a la mostra es van platinar les mostres unidireccionalment. A partir de l'angle de platinació i les ombres projectades per les mostres, es pot determinar l'alçada d'un cos. Per la mesura de la longitud de les ombres es va usar el software Digital Micrograph (Gatan), a partir de les imatges obtingudes a través de la càmera CCD.

Es van afegir boles de làtex de diàmetre conegut (d'aproximadament 100 nm, Sigma-Aldrich) com a referència interna per poder conèixer l'angle de platinació real. Un cop la mostra ja havia estat dipositada i fixada (veure apartats 2.12.4 i 2.12.5) i abans de deshidratar les reixetes amb etanol absolut, s'afegien sobre la reixeta 10 µl d'una suspensió que contenia $5 \cdot 10^9$ boles/ml. Passats 5 min, es rentaven les reixetes en aigua milliQ durant 5 min. Finalment, es submergia la reixeta en etanol absolut entre 2 i 3 segons i s'assecava a l'aire.

Les boles de làtex no es deformen en les preparacions de microscòpia electrònica (Bermúdez, 1995) i són esferes quasi perfectes. Per tant, es pot considerar que el seu diàmetre equival a l'alçada. Es pot calcular doncs l'angle de platinació a partir del diàmetre de l'esfera i de l'ombra que aquesta projecta (figura 2.8), mitjançant la següent equació:

$$\text{tg } \alpha = \emptyset / L$$

On,

tg α és la tangent de l'angle de platinació,

\emptyset és l'alçada de la bola de làtex (AC a la figura 2.8.a), que és igual al seu diàmetre, i

L és la longitud de l'ombra que projecta l'esfera de làtex (AB a la figura 2.8.a).

A partir del valor de tg α i de la longitud de les ombres projectades (figura 2.8.b), es pot determinar l'alçada de plaques produïdes per autoassociació quan aquestes estan properes a alguna esfera de làtex:

$$h = \text{tg } \alpha \cdot L_p$$

On,

h és l'alçada aparent de la placa, i

L_p és la longitud de l'ombra projectada per la placa³ (AB a la figura 2.8.b).

Cal tenir en compte que el valor de l'angle de platinació α obtingut amb aquest càlcul no coincideix amb el valor real (α_{real} ; figura 2.8.a). Els valors de α calculats haurien de ser corregits per tal d'obtenir el valor de α_{real} . Malgrat això, prèviament al grup (Caravaca, 2004) es va veure que no hi havia diferències significatives entre els valors de les alçades corregits fent servir l'angle α_{real} i els calculats fent servir l'angle α mesurat tal com s'indica a la figura 2.8.a.

³ La longitud de l'ombra de cadascuna de les plaques estudiades era la mitjana obtinguda a partir de la mesura de la longitud de l'ombra a diferents punts de la placa.

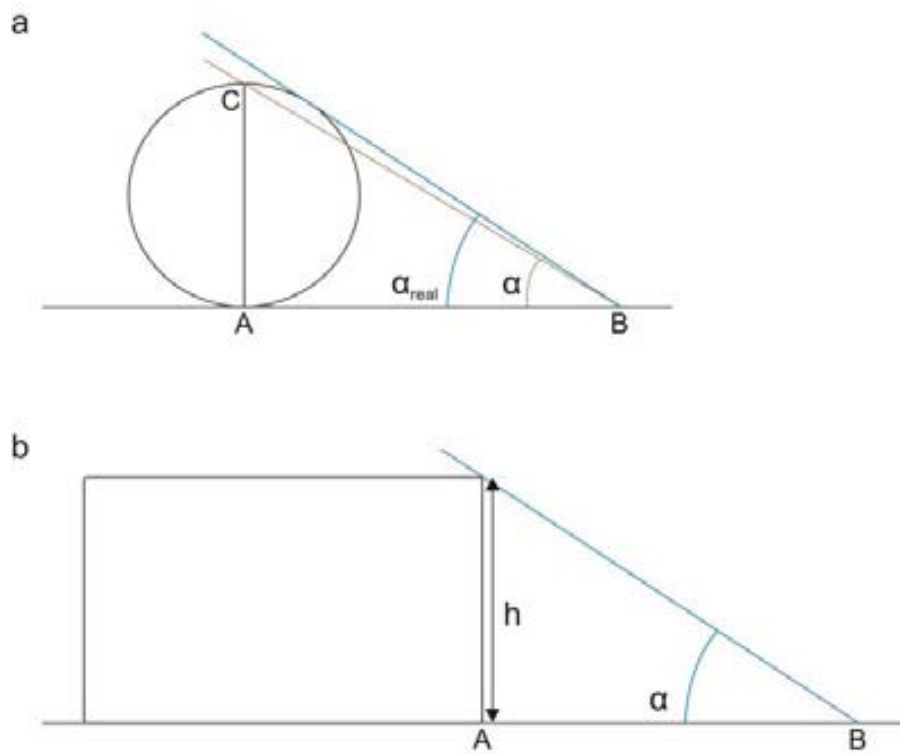


Figura 2.8. (a) Representació gràfica de la recta tangent real i de la recta que va des del centre de la bola de làtex (C) al punt final de l'ombra (B) d'una esfera; (b) A partir de l'angle de platinació calculat amb l'esfera (α), es pot calcular l'alçada de les plaques (h). Figura adaptada de Gállego, 2010.

