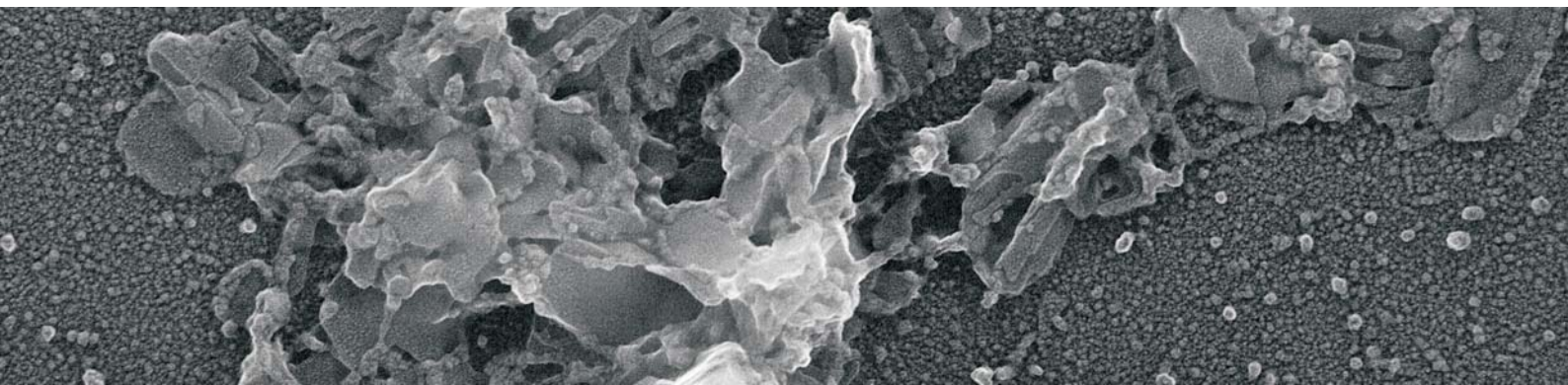


---

# Plaques de cromatina dels cromosomes metafàsics: estructura i autoassociació

Maria Milla Astals



### **3. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---



### 3.1. Resultats obtinguts en la preparació de mostres.

#### 3.1.1. Millora del rendiment d'obtenció de cromosomes.

Durant el procés d'obtenció de cromosomes, es va veure que el rendiment del procés era força baix: molts dels cromosomes quedaven retinguts a l'interior de les cèl·lules metafàsiques. Per això, es va decidir assajar diverses condicions que afecten el nombre de cèl·lules metafàsiques bloquejades en la metafase i diversos tractaments que afecten a l'alliberació de cromosomes de les cèl·lules metafàsiques.

##### 3.1.1.a. Estudi de l'efecte del bloqueig en metafase a diferents temps.

Es van analitzar mostres obtingudes a diferents temps després de l'adició del colcemid. L'observació es va fer per microscòpia òptica de camp clar, després de fixar la mostra amb metanol-àcid acètic. Es va veure que a mida que augmentava el temps de tractament amb el colcemid, augmentava el nombre de cèl·lules metafàsiques.

Els resultats obtinguts (figura 3.1) indiquen que els tractaments de poc temps (A–C) amb colcemid produeixen cèl·lules amb cromosomes mitòtics d'estructura més laxa que en l'observada amb tractaments més llargs (D i E).

Per altra banda, els resultats obtinguts amb mostres tractades poc temps amb colcemid (2 h) indiquen que la concentració de cèl·lules metafàsiques en aquestes condicions és baixa. A mida que s'anava incrementant el temps d'incubació amb colcemid augmentava el nombre de cèl·lules metafàsiques. A partir dels resultats obtinguts i de la posterior observació de cromosomes al microscopi electrònic (apartat 3.1.2), en els quals es va veure que part dels cromosomes de cèl·lules bloquejades durant temps llargs amb colcemid sense necessitat de fixació amb metanol-àcid acètic es conservaven íntegres, es va decidir que el temps d'incubació pel bloqueig de les cèl·lules seria de 16 h.

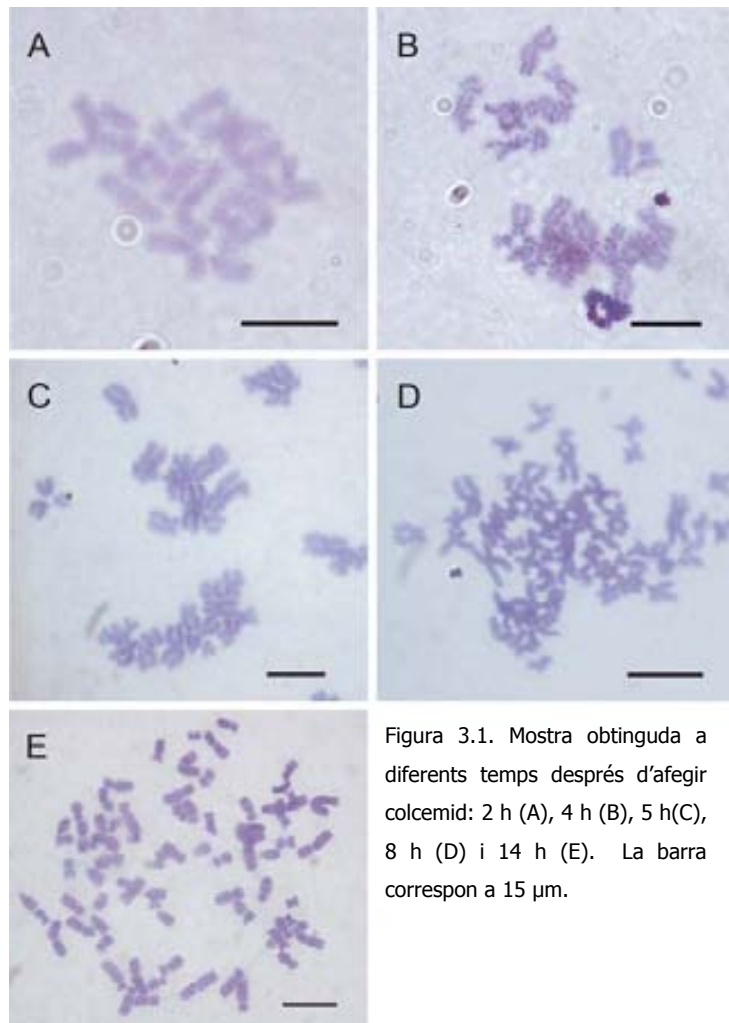


Figura 3.1. Mostra obtinguda a diferents temps després d'afegir colcemid: 2 h (A), 4 h (B), 5 h (C), 8 h (D) i 14 h (E). La barra correspon a 15  $\mu$ m.

*3.1.1.b. Efecte de pH àcid en el procés d'extracció de cromosomes.*

A la figura 3.2, es poden observar exemple de cèl·lules metafàsiques tractades a pHs àcids. No s'observen diferències morfològiques en els cromosomes observats a pH 3.7 o a pH 5.0. En general, els resultats obtinguts indiquen que els medis amb pH àcid no afavoreixen l'alliberament dels cromosomes.

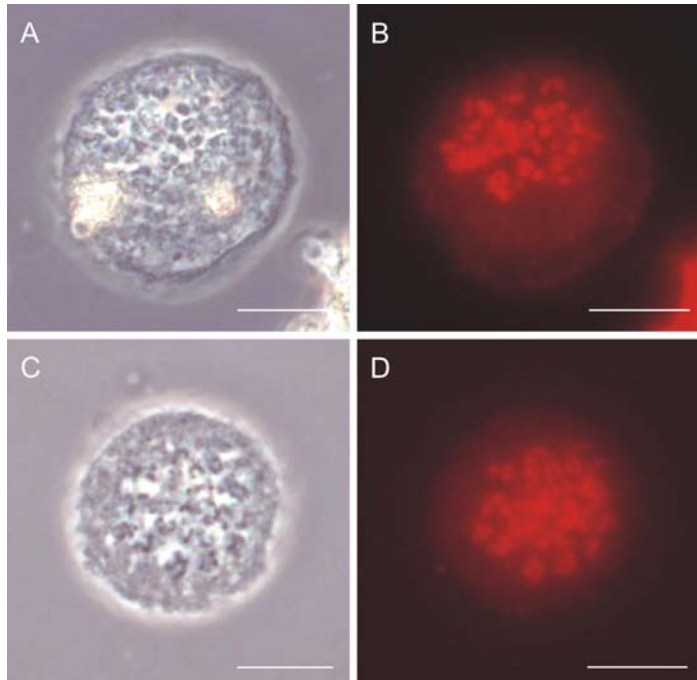


Figura 3.2. Mostra obtinguda després d'un tractament amb tampó de pH 3.7 (A i B) i 5.0 (C i D). Observació amb contrast de fase (A,C) i fluorescència per tinció amb iodur de propidi (B,D). La barra equival a 25 µm.

*3.1.1.c. Efecte de tractaments mecànics.*

Per tal d'intentar millorar el rendiment de l'obtenció de cromosomes, també es va optar per sotmetre la mostra a diversos tractaments mecànics: pas per xeringa, sonicació o homogeneïtzació amb Dounce (veure apartat 2.3.2.b). En aquests estudis a més, es van afegir detergents (Tritó X-100), per tal d'afavorir el trencament dels sacs cel·lulars. Es mostren exemples d'aquests tractaments a la figura 3.3. En general es va observar que cap dels tractaments mecànics emprats aconseguix la millora del rendiment d'alliberament de cromosomes.

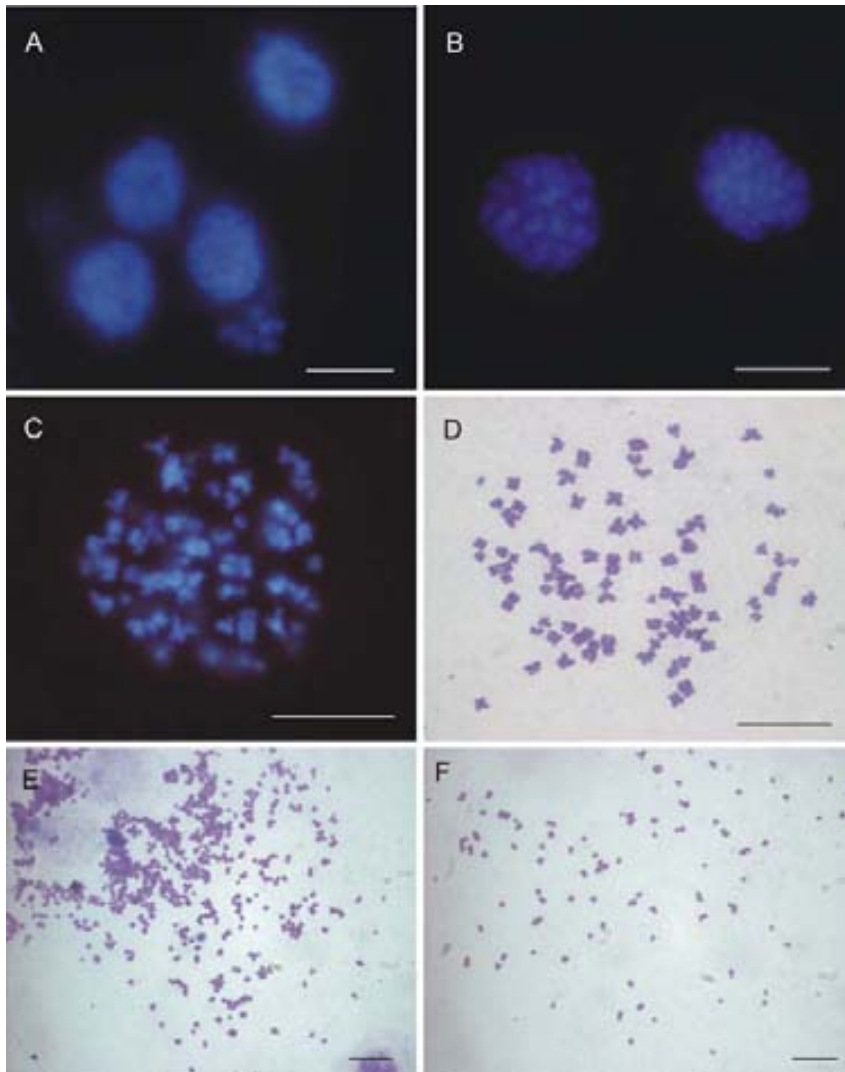


Figura 3.3. Totes les mostres van ser tractades amb tampó hipotònic. A més, les mostres B i F van ser sotmeses a homogeneïtzació amb Dounce. (A-C) Observació per fluorescència per tinció amb DAPI; (D-F) Microscòpia de camp clar de mostres fixades amb metanol-àcid acètic. La barra correspon a 25  $\mu\text{m}$  (A-C), 15  $\mu\text{m}$  (D), i 30  $\mu\text{m}$  (E i F).

#### 3.1.1.d. Efecte de la fixació amb metanol-àcid acètic.

Per a l'observació de mostres per microscòpia de camp clar, es va fixar la mostra amb metanol-àcid acètic en proporció 3:1 (veure apartat 2.10.2). Els resultats que es presenten a la figura 3.3 mostren que és aquest tractament en medi orgànic (figura 3.3.D-F), i no pas els tractaments mecànics, el que provoca l'alliberament dels cromosomes. Els cromosomes fixats en medi orgànic són emprats rutinàriament en estudis de citogenètica (Sumner, 1989). Malauradament, però, donat que l'interés de la nostra recerca és l'estudi de l'estructura dels cromosomes metafàsics en condicions fisiològiques, encara que el rendiment d'alliberació sigui superior, no seria adequat emprar aquests cromosomes obtinguts en medi orgànic, i no s'ha pogut fer servir aquest tractament en els estudis realitzats en aquesta tesi.

### **3.1.2. Visualització de cromosomes en condicions iòniques properes a la metafase mitjançant SEM i TEM.**

Durant el procés de purificació de la mostra, es van agafar alíquotes procedents del gradient esglaonat de sacarosa (apartat 2.5.2) en presència de 5 mM MgCl<sub>2</sub> per tal de veure si els cromosomes metafàsics conservaven la seva integritat abans de l'aplicació de diferents tractaments. Les mostres van ser observades amb microscòpia electrònica de transmissió i de rastreig. Tal com s'observa a les figures 3.4 i 3.5, l'estructura dels cromosomes restava íntegra després del pas de la mostra per un gradient esglaonat de sacarosa.

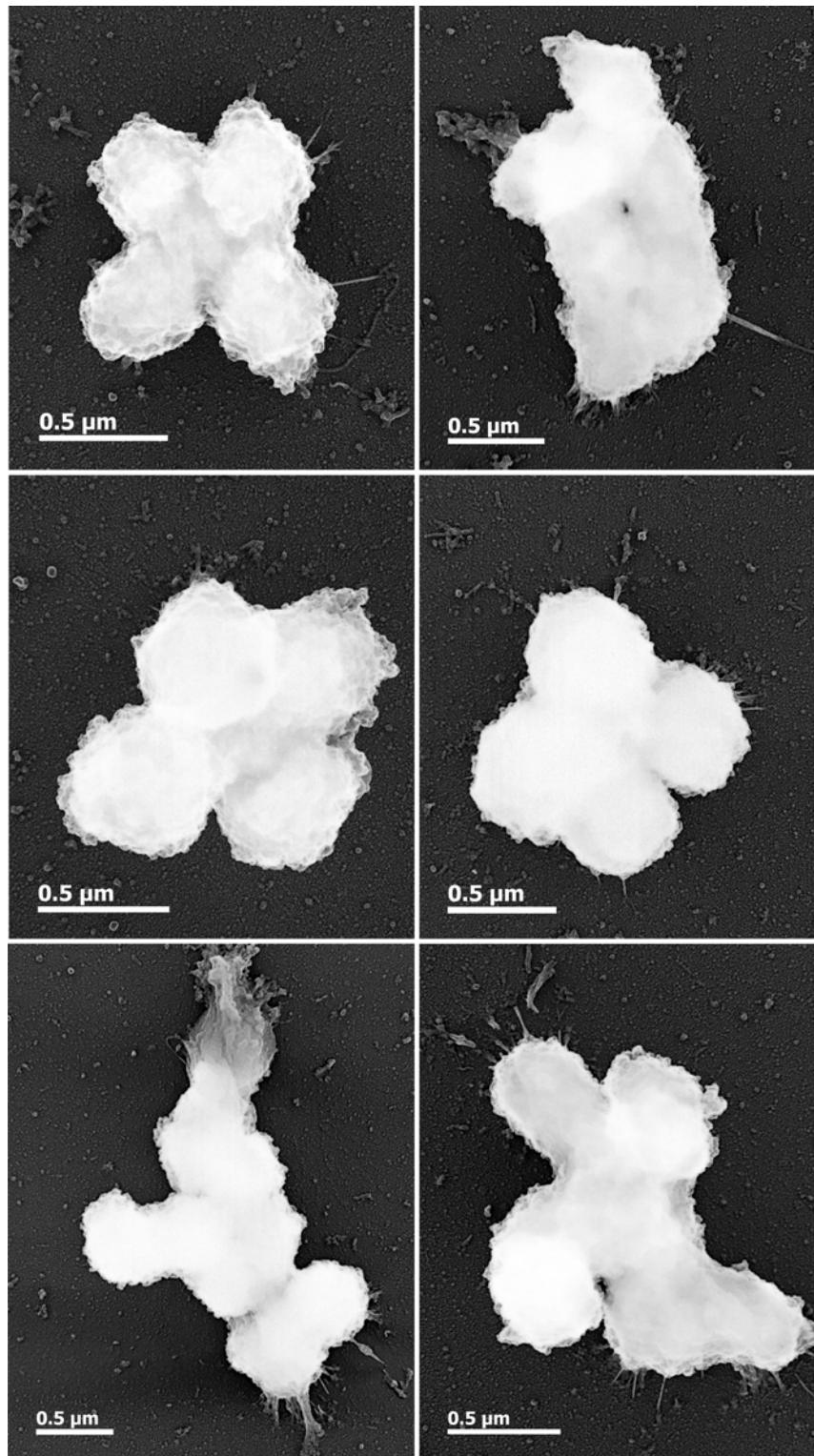


Figura 3.4. Imatge de microscòpia electrònica de transmissió de cromosomes purificats per gradient esglaonat de sacarosa. Extensió per centrifugació, fixació de la mostra sobre reixeta i posterior platiniació seguint els protocols habituals del grup (apartats 2.12.4-6).



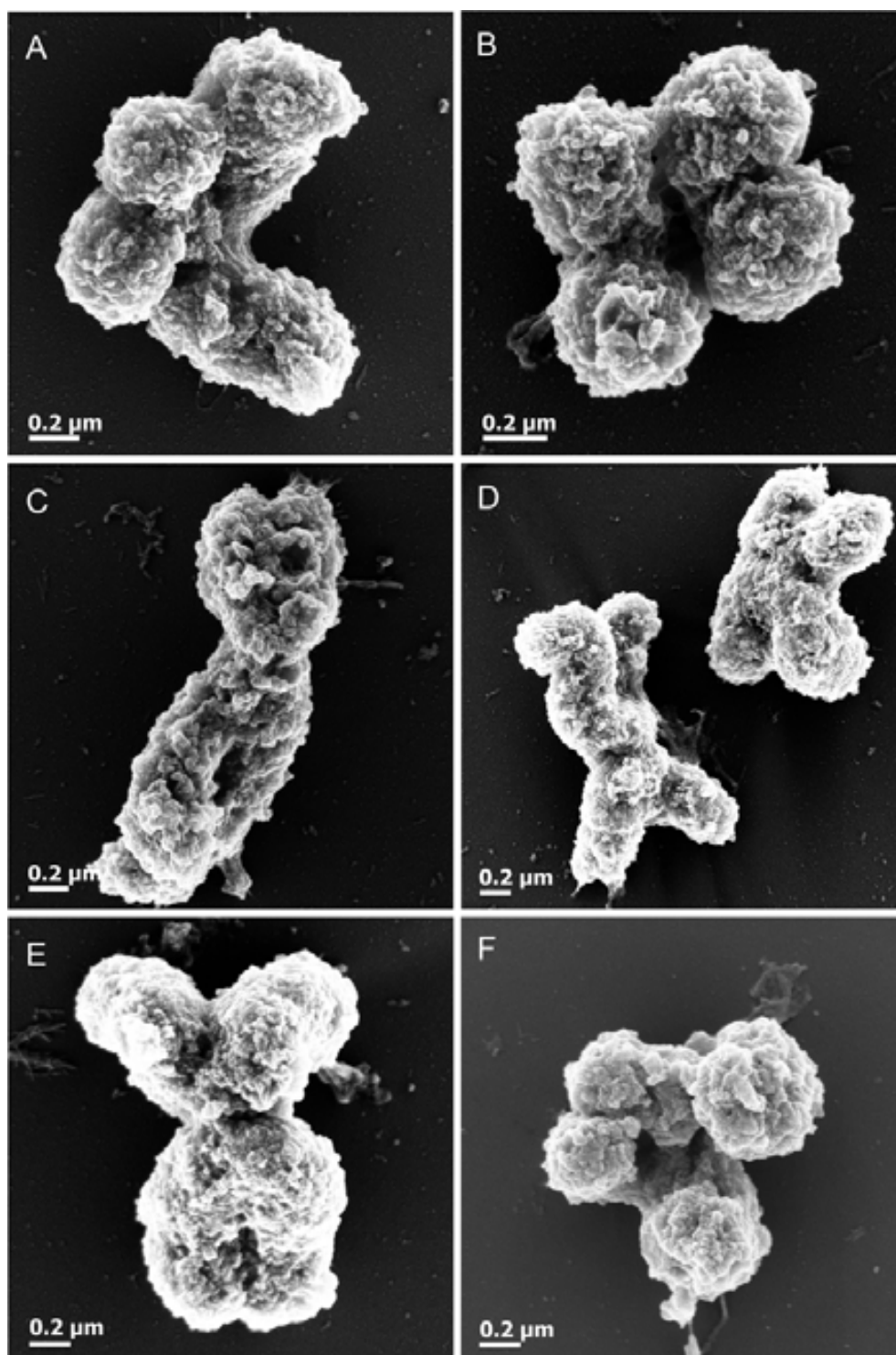


Figura 3.5. Imatge de microscòpia electrònica de rastreig de cromosomes purificats per gradient esglaonat de sacarosa. (A-E) Mostres platinades de forma típica (apartat 2.12.6). (F) Mostra platinada rotacionalment amb 0.6 nm de guix de metall i amb un angle de 45°. En tots els casos, les mostres van ser esteses per centrifugació i fixades sobre reixeta (apartats 2.12.4.b i 2.12.5.b).

### 3.1.3. Observació de controls per TEM: boles de làtex i *E. Coli*.

Per poder descartar la presència d'artefactes en les mostres observades per microscòpia electrònica de transmissió, es van usar reixetes que contenen boles de làtex, o boles de làtex i bacteris de la soca BL21 d'*E. Coli*, conjuntament. Aquestes reixetes es preparaven fent servir els protocols típics emprats per les mostres de cromatina o de cromosomes.

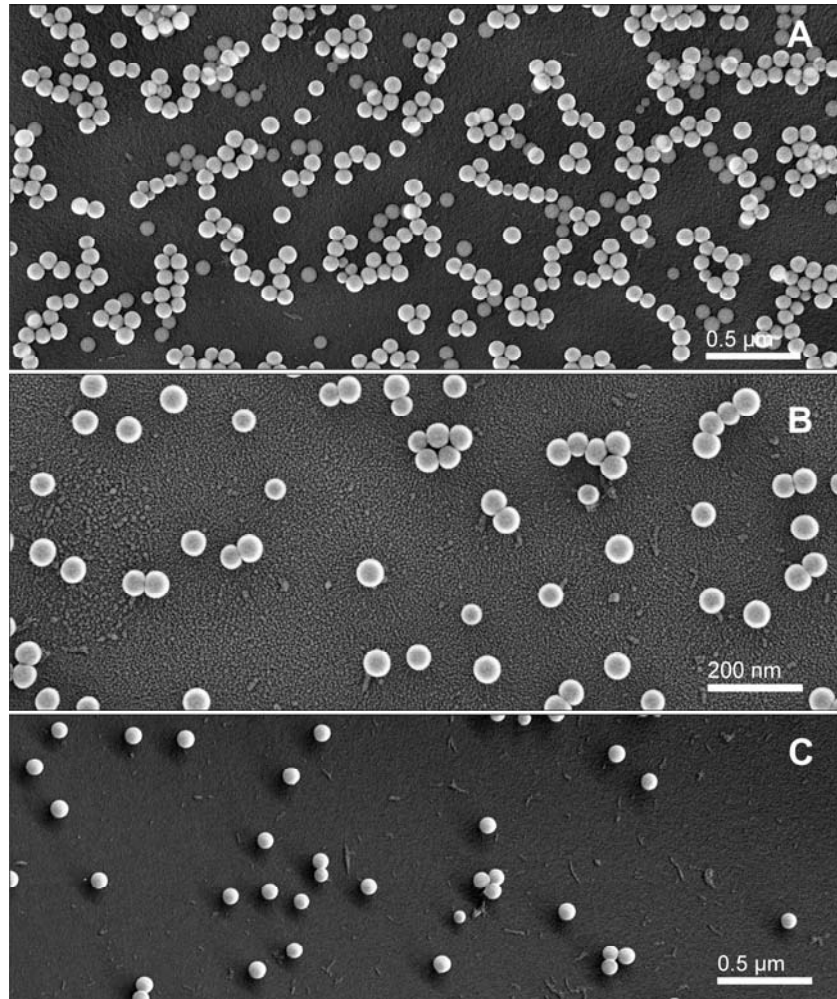


Figura 3.6. Partícules de làtex preparades a diferents concentracions. Les esferes de làtex eren suspeses en 5 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> i 10 mM (Pipes pH 7.2) i sacarosa 50% (p/v), i mesclades després amb 1 volum de la mateixa solució, però sense sacarosa. Les solucions resultants eren esteses per centrifugació sobre reixeta, fixades i platinades posteriorment (apartats 2.12.4.b i 2.12.5.b).

Tal com es pot veure a les figures 3.6 i 3.7, no s'aprecien estructures laminars (com les que es veuran moltes vegades en les micrografies d'aquesta tesi) en cap dels controls realitzats. Es pot descartar doncs que les plaques que s'estudiaran en aquesta tesi siguin el resultat d'artefactes produïts per cristalls de sacarosa o per la precipitació d'alguna de les sals contingudes als tampons utilitzats en l'aïllament i tractament de la mostra.

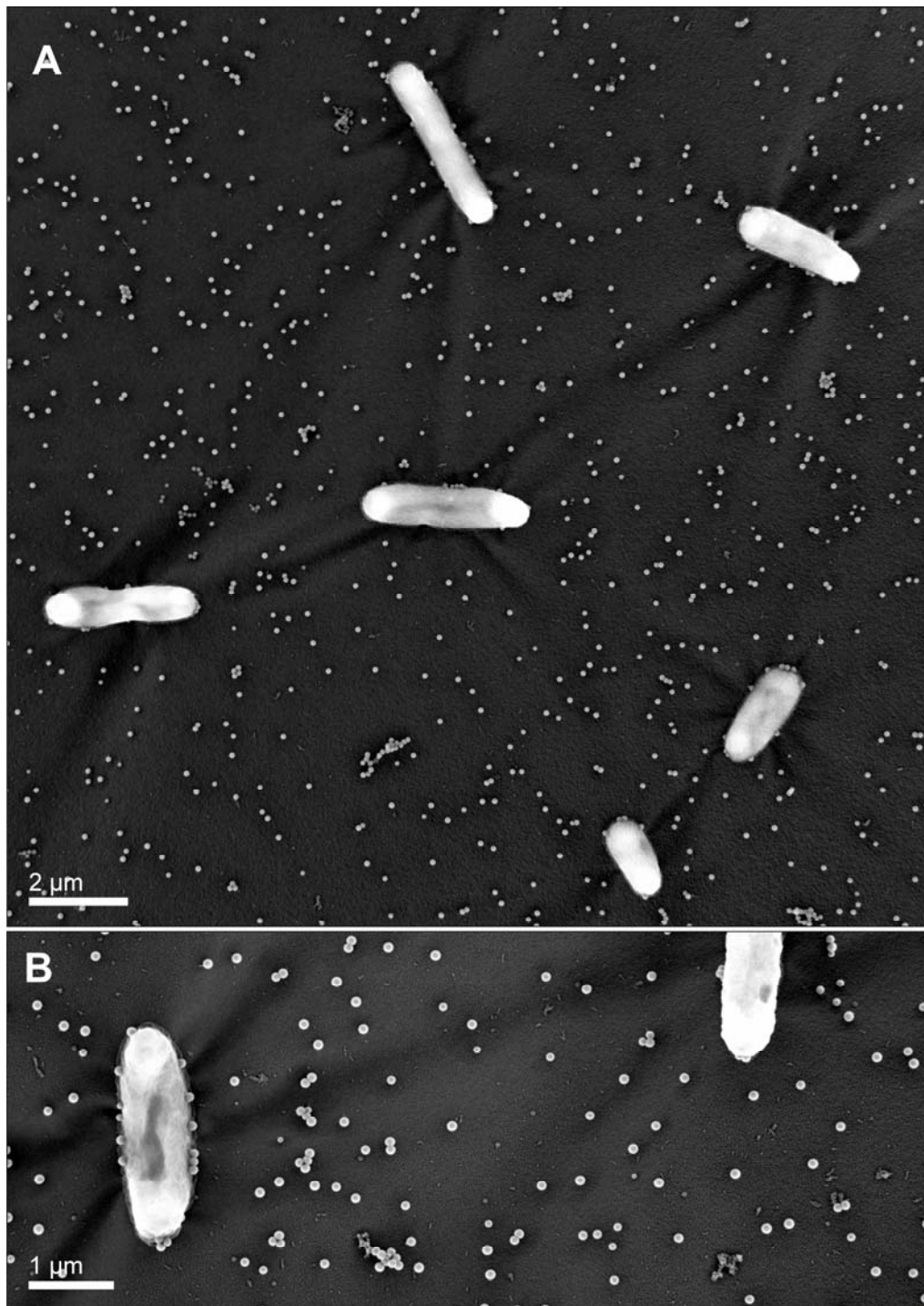


Figura 3.7. Partícules de làtex mesclades amb bacteris *E. Coli*. La mostra era suspesa en 5 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> i 10 mM Pipes (pH 7.2) i sacarosa 50% (p/v), i mesclades després amb 1 volum de la mateixa solució, però sense sacarosa. Les solucions resultants eren esteses per centrifugació sobre reixeta, fixades i platinades posteriorment (apartats 2.12.4.b i 2.12.5.b).

### 3.2. Estudi de l'estructura interna del cromosoma mitjançant microscòpia de polarització.

#### 3.2.1. Ús de sacs cel·lulars.

En aquests estudis s'han emprat cèl·lules metafàsiques incubades en medis hipotònics i, per tant, inflades. El fet de preservar la integritat de la cèl·lula ens ha permès conservar el material cel·lular. Els resultats obtinguts demostren que d'aquesta manera, s'ha aconseguit que els cromosomes estiguessin distribuïts a l'atzar i en totes les orientacions possibles a l'interior del sac cel·lular.

A la figura 3.8 es mostren exemples on es poden veure sacs cel·lulars obtinguts després del tractament amb diferents tampons (75 mM KCl, poliamines i PNa-20 mM MgCl<sub>2</sub>). Tal com es pot observar, hi ha una orientació aleatòria dels cromosomes a l'interior de les cèl·lules.

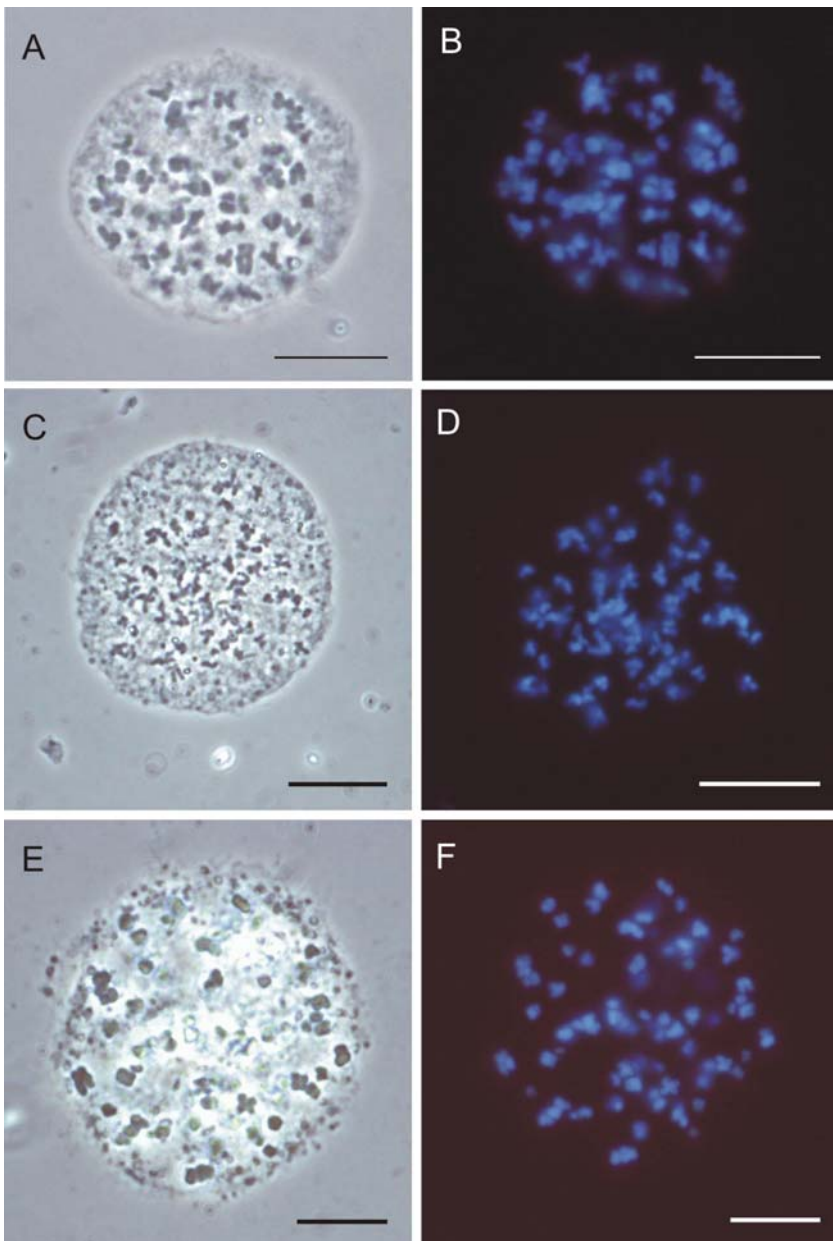


Figura 3.8. Mostres obtingudes per tractament amb 75 mM KCl (A i B), amb tampó de poliamines (C i D) i amb PNa-20 mM MgCl<sub>2</sub> (E i F). Observació per contrast de fase (A, C i E) i per fluorescència després de fer una tinció amb DAPI (B, D i F). Les barres corresponen a 25 µm (A i B), i a 20 µm (C-F).

Aquests resultats són molt importants per poder realitzar els estudis de microscòpia de polarització d'aquest treball. Al disposar de mostres que contenen cromosomes situats en totes les possibles orientacions, es podrà observar simultàniament, en cadascuna de les imatges obtingudes, la interacció dels cromosomes amb la llum polaritzada del microscopi incidint en molt diverses orientacions de l'estructura del cromosoma.

### 3.2.2. Tria de controls.

Per la realització dels estudis de polarització ha estat imprescindible l'ús de controls interns adequats. És ben conegut que la calcita és un material birefringent (Perkins i Henke, 2002). Per això s'ha emprat calcita en pols com a control. Com que aquest material és inorgànic, es va realitzar una recerca bibliogràfica per tal d'intentar trobar materials biològics birefringents més propers als cromosomes. Es va trobar que el cap d'esperma de calamar podia servir com a control biològic (Livolant, 1984).

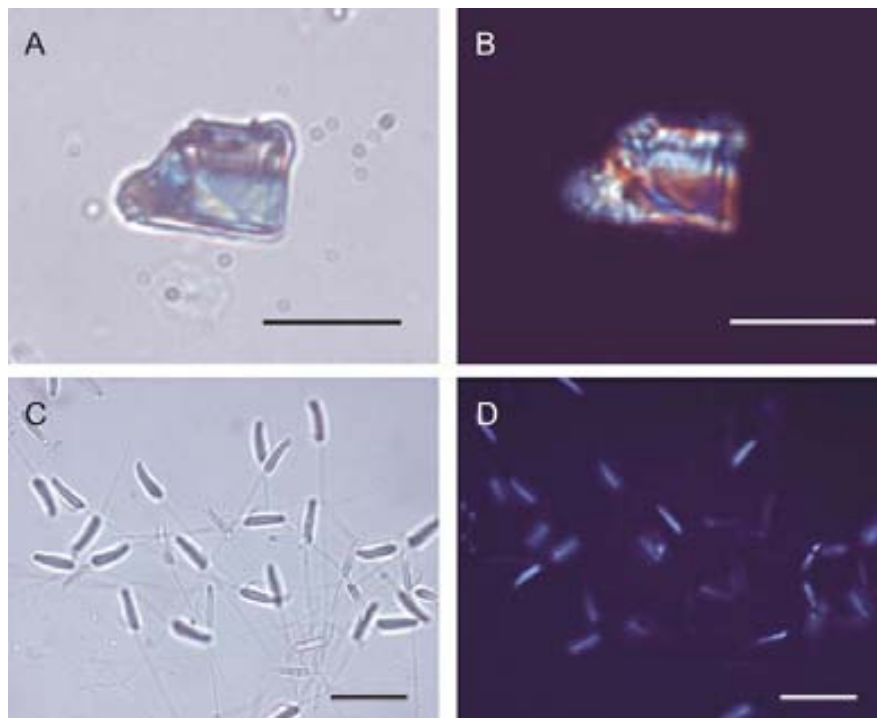


Figura 3.9. Controls interns usats: calcita (A i B) i esperma de calamar (C i D). En A i C, observació amb polaritzadors en paral·lel. En B i D els polaritzadors estan creuats. Les barres corresponen a 10  $\mu\text{m}$  (A i B) i a 15  $\mu\text{m}$  (C i D).

A la figura 3.9 es poden observar els dos controls usats en les dues posicions del microscopi de polarització. L'esperma de calamar presenta més birefringència que els fragments de calcita de la mateixa grandària; a més, la mida dels caps d'esperma és més homogènia i similar a la de la mostra usada. En el cas de la calcita es poden observar fins i tot figures d'interferència (figura 3.9.B).

### 3.2.3. Incubacions amb diferents medis.

#### 3.2.3.a. Medi poliamines.

Es va observar mostra mesclada amb calcita i amb esperma de calamar. Els millors resultats es van obtenir fent servir esperma de calamar com a control intern. A les figures 3.10, 3.11 i 3.12, es pot observar la mostra amb els polaritzadors creuats a diferents temps d'exposició.

Com es veu a les imatges, no hi ha cap signe de birefringència en el cas de les cèl·lules. En canvi, els controls interns es veuen perfectament il·luminats. Els caps d'esperma són cilíndrics i es veuen sempre il·luminats (figura 3.12). En el cas de la calcita, si l'orientació dels fragments és la correcta, la birefringència en posició d'extinció és important (figura 3.10 i 3.11).

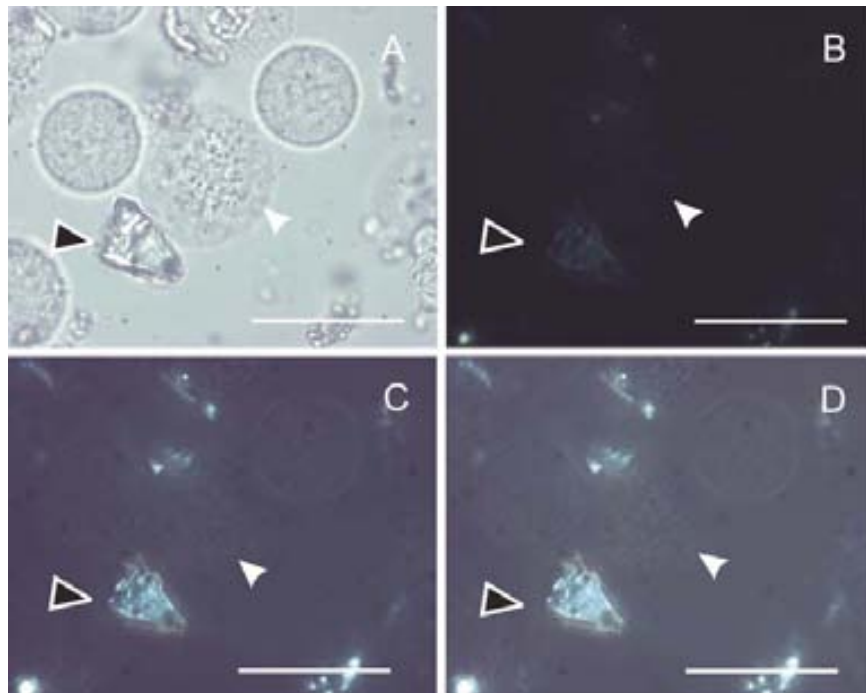


Figura 3.10. Tractament de sacs cel·lulars metafàsics amb tampó poliamines, observat per microscòpia de polarització. (A) Observació amb polaritzadors paral·lels; (B-D) Posició d'extinció a temps d'exposició de 0.35, 4.86 i 7.53 s, respectivament. Es poden observar fragments de calcita il·luminats (fletxes negres); les cèl·lules (fletxes blanques) no són visibles en posició d'extinció. La barra correspon a 30  $\mu\text{m}$ .

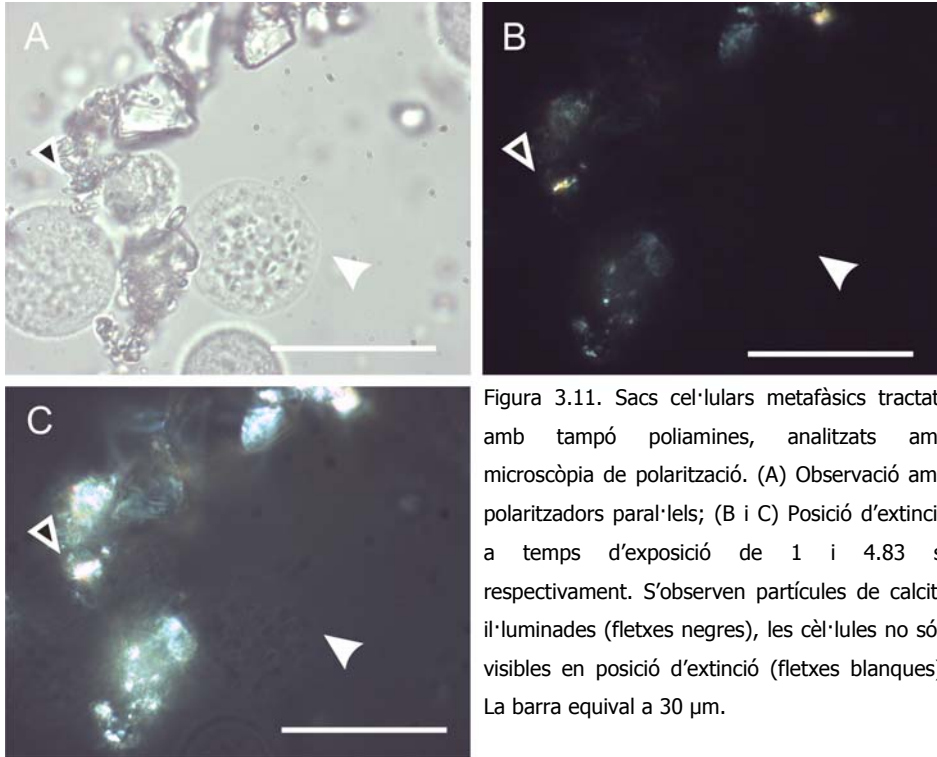


Figura 3.11. Sacs cel·lulars metafàsics tractats amb tampó poliamines, analitzats amb microscòpia de polarització. (A) Observació amb polaritzadors paral·lels; (B i C) Posició d'extinció a temps d'exposició de 1 i 4.83 s, respectivament. S'observen partícules de calcita il·luminades (fletxes negres), les cèl·lules no són visibles en posició d'extinció (fletxes blanques). La barra equival a 30  $\mu\text{m}$ .

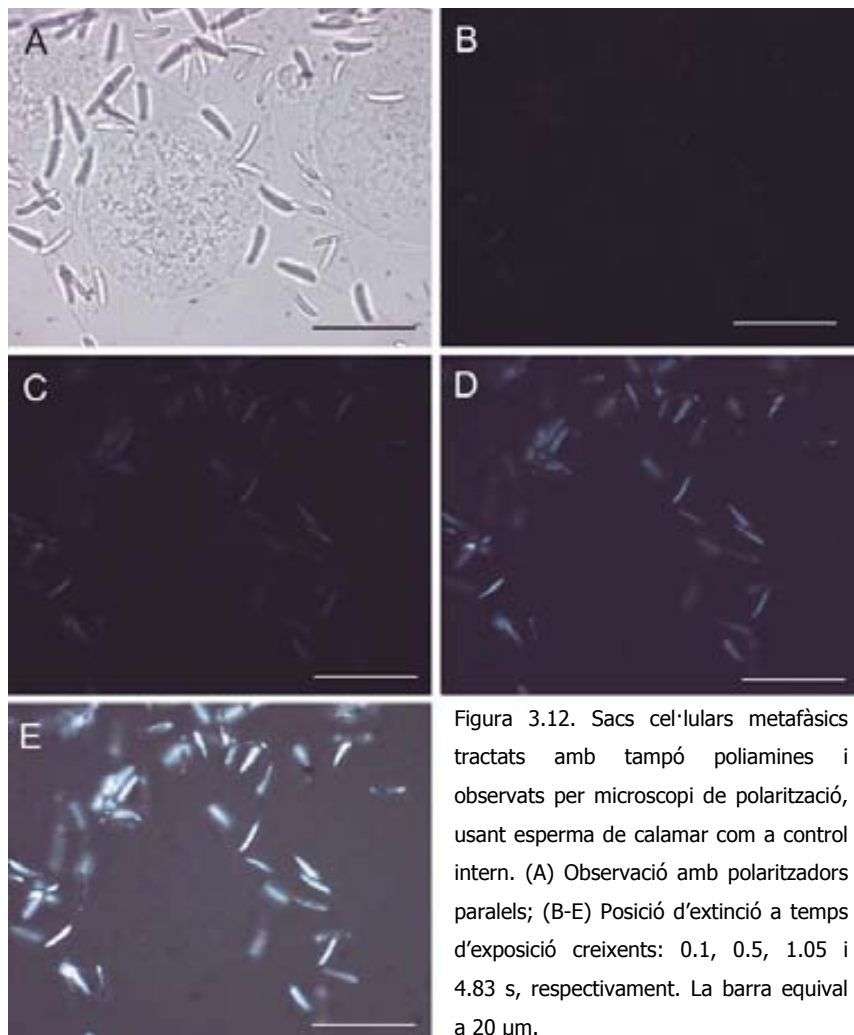


Figura 3.12. Sacs cel·lulars metafàsics tractats amb tampó poliamines i observats per microscopi de polarització, usant esperma de calamar com a control intern. (A) Observació amb polaritzadors paral·lels; (B-E) Posició d'extinció a temps d'exposició creixents: 0.1, 0.5, 1.05 i 4.83 s, respectivament. La barra equival a 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3.b. Tampó PNa-5mM MgCl<sub>2</sub>.

La mostra amb el tampó estructurant PNa-5 mM MgCl<sub>2</sub> es va observar al microscopi de polarització, usant com a control intern calcita i esperma de calamar. Igual que en el cas del tampó de poliamines (veure apartat anterior), amb els polaritzadors creuats no es va observar cap tipus d'il·luminació associada als cromosomes metafàsics. Exemples dels resultats obtinguts es mostren a les figures 3.13 i 3.14.

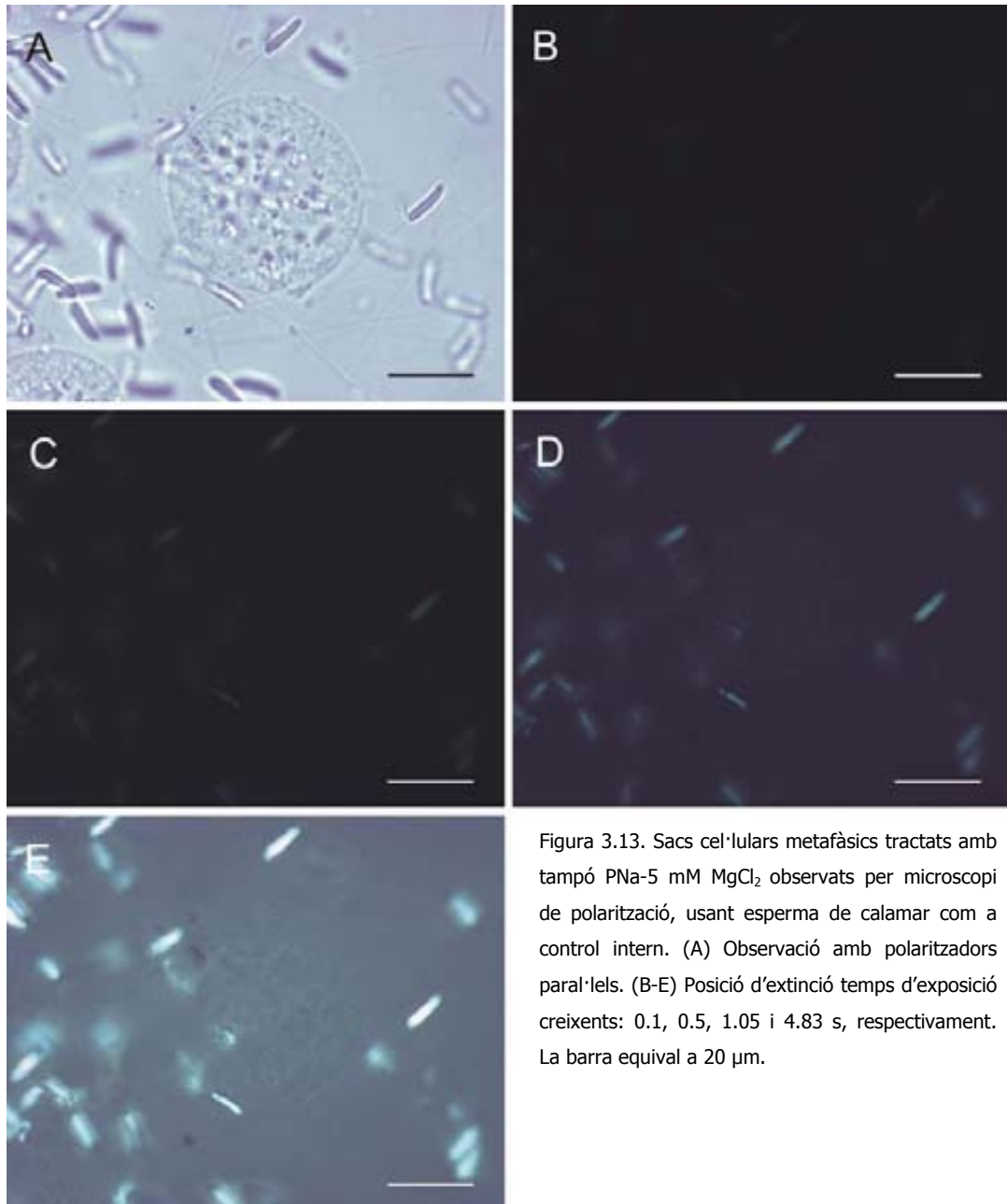


Figura 3.13. Sacs cel·lulars metafàsics tractats amb tampó PNa-5 mM MgCl<sub>2</sub> observats per microscopi de polarització, usant esperma de calamar com a control intern. (A) Observació amb polaritzadors paral·lels. (B-E) Posició d'extinció temps d'exposició creixents: 0.1, 0.5, 1.05 i 4.83 s, respectivament. La barra equival a 20 µm.



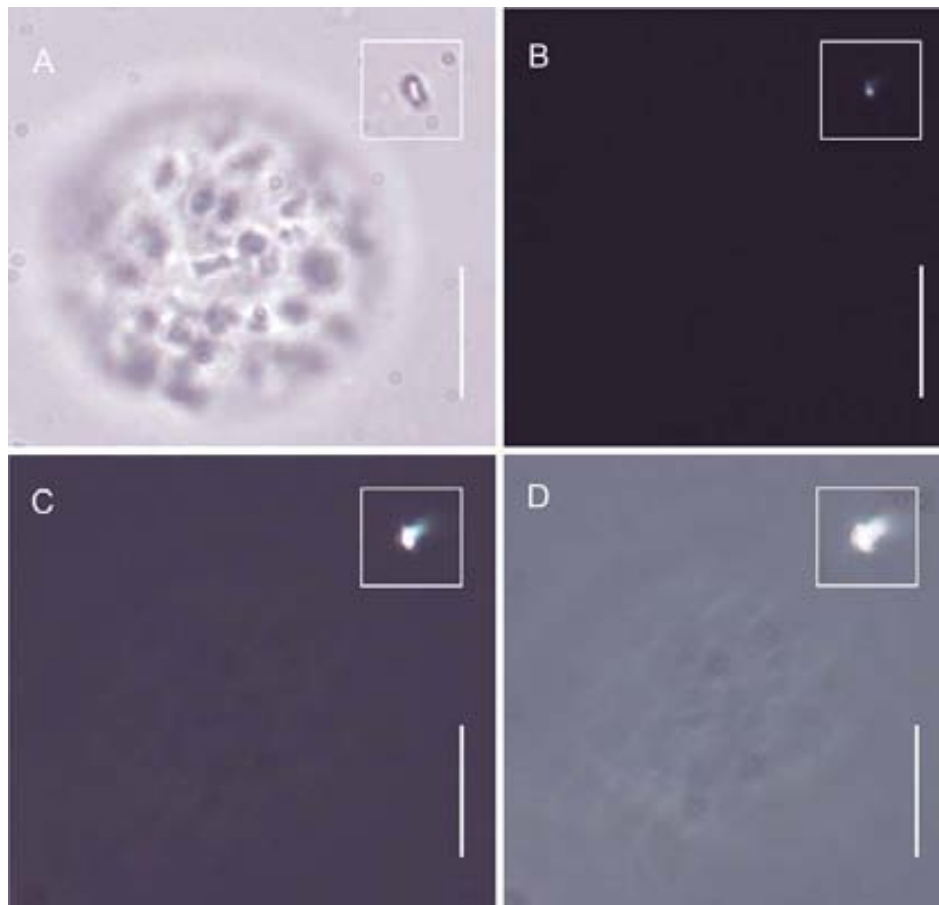


Figura 3.14. Sacs cel·lulars tractats amb PNa-5 mM  $MgCl_2$  observats amb microscòpia de polarització, usant calcita com a control intern. Les imatges (B-D) mostren A en posició d'extinció, a temps creixents d'exposició: 0.35, 3.68 i 9.43 s, respectivament. Al quadre superior es pot observar un fragment de calcita trobat en el mateix camp que la cèl·lula. La barra correspon a 10  $\mu m$ .

### 3.2.3.c. Tampó PNa-20 mM $MgCl_2$ .

També es va estudiar la mostra en presència de tampó PNa-20 mM  $MgCl_2$ . Es van resuspendre les cèl·lules metafàsiques i es van observar al microscopi de polarització en presència dels controls interns. Com en els casos anteriors, no es va veure cap tipus d'il·luminació dels cromosomes metafàsics en posició d'extinció (figures 3.15 i 3.16). A la figura 3.15, es poden comparar els tractaments amb els tampons PNa-5 mM  $MgCl_2$  i PNa-20 mM  $MgCl_2$ .

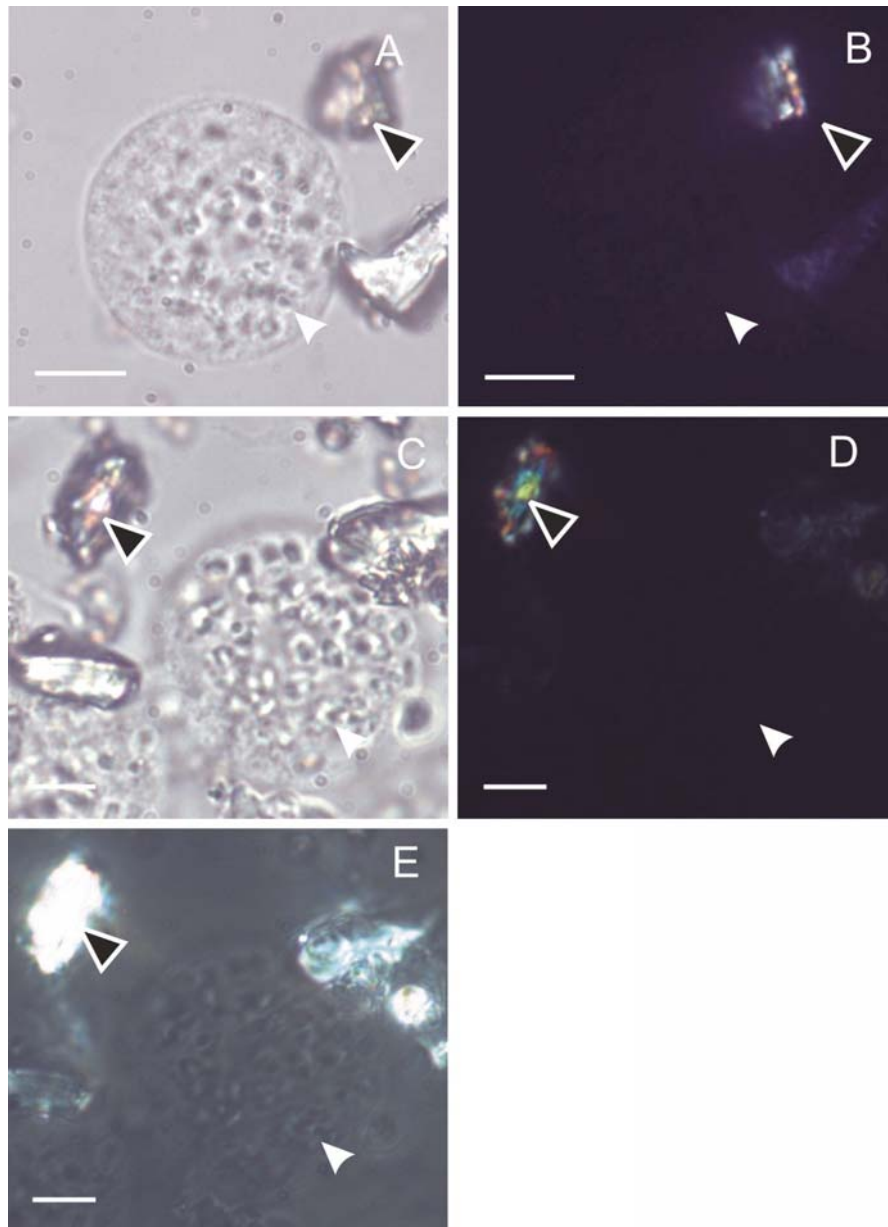


Figura 3.15. Sacs cel·lulars metafàsics tractats amb PNa-5 mM  $\text{MgCl}_2$  (A-B) i PNa-20 mM  $\text{MgCl}_2$  (C-E), observats amb microscòpia de polarització usant calcita com a control intern. (B) Correspon a A en posició d'extinció a 0.35 s d'exposició; (D-E) Corresponen a C en posició d'extinció, a diferents temps d'exposició: 0.35 i 3.68 s, respectivament. S'observen partícules de calcita (fletxes negres) i cèl·lules (fletxes blanques), que no són visibles en posició d'extinció. La barra correspon a 10  $\mu\text{m}$  (A i B) i a 6  $\mu\text{m}$  (C-E).

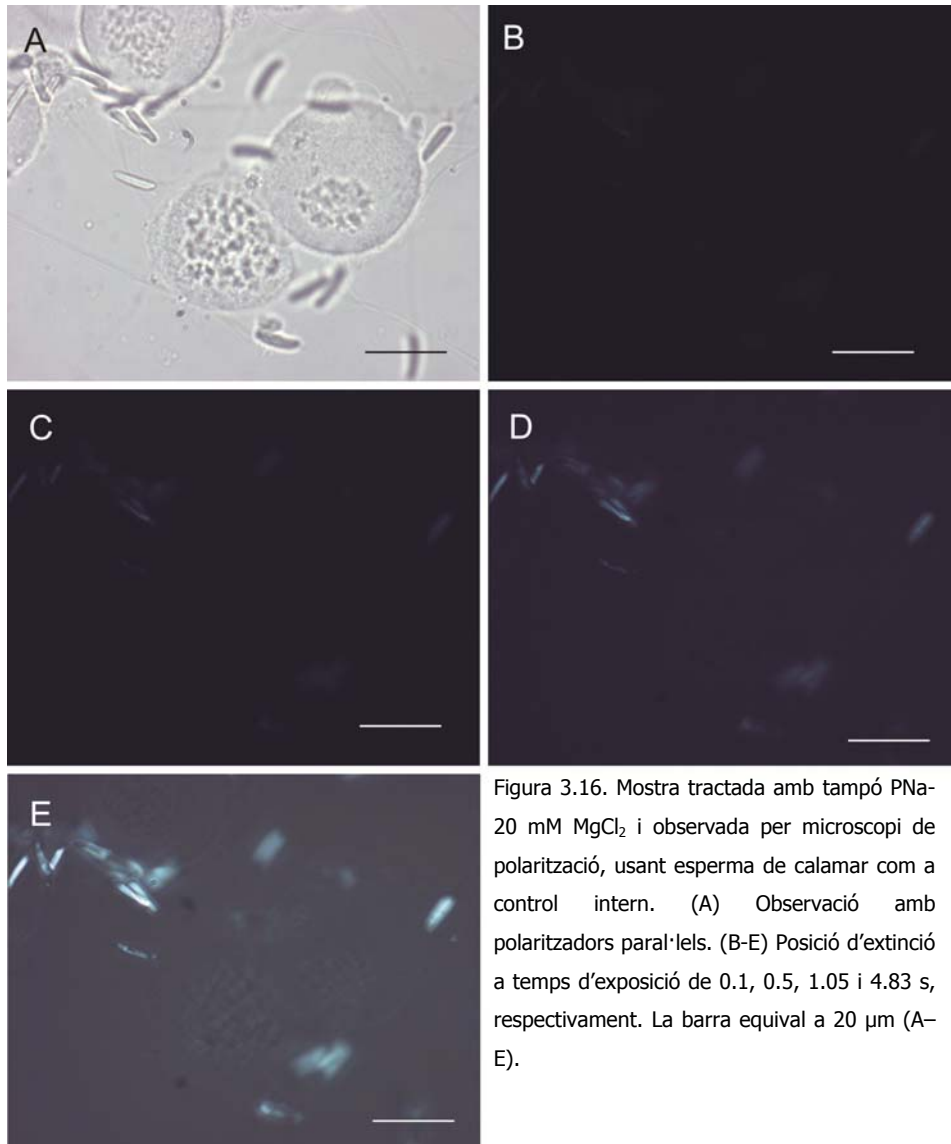


Figura 3.16. Mostra tractada amb tampó PNa-20 mM  $MgCl_2$  i observada per microscopi de polarització, usant esperma de calamar com a control intern. (A) Observació amb polaritzadors paral·lels. (B-E) Posició d'extinció a temps d'exposició de 0.1, 0.5, 1.05 i 4.83 s, respectivament. La barra equival a 20  $\mu m$  (A-E).

Finalment, a la figura 3.17 es presenten exemples que permeten comparar les mostres procedents de les tres incubacions amb tampó poliamines, tampó PNa-5 mM  $MgCl_2$  i tampó PNa-20 mM  $MgCl_2$ . En tots els casos es va veure que els cromosomes no donen imatges birefringents. També pot observar-se que els cromosomes metafàsics no presenten diferències morfològiques importants en aquests tampons estructurants.

El nombre total de cèl·lules metafàsiques estudiades en aquest treball per microscòpia de polarització és de 124 tractades amb tampó de poliamines, 144 tractades amb PNa-5 mM  $MgCl_2$  i 73 tractades amb PNa-20 mM  $MgCl_2$ .

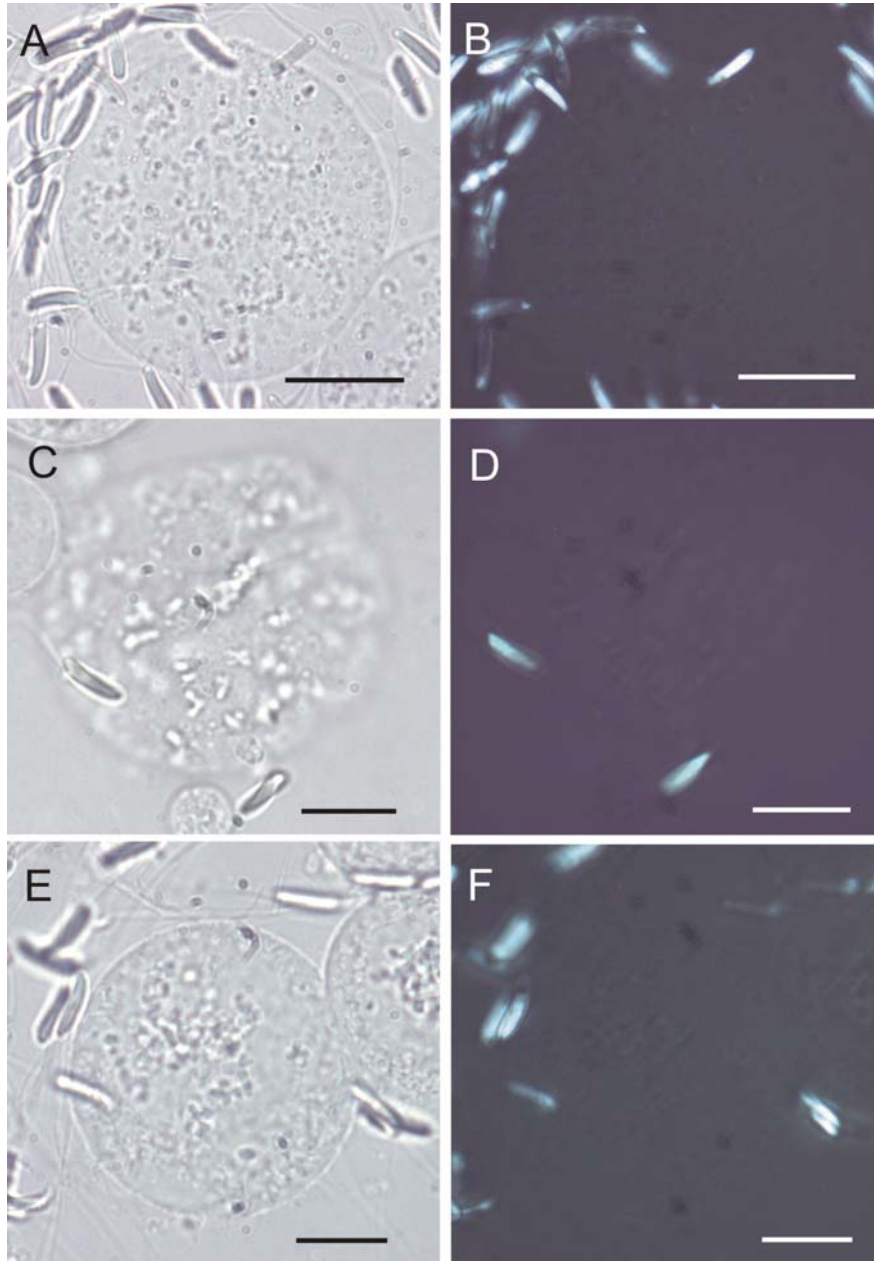


Figura 3.17. Sacs cel·lulars tractats amb poliamines (A i B), PNa-5 mM  $MgCl_2$  (C i D) i PNa-20 mM  $MgCl_2$  (E i F), analitzats en un microscopi de polarització, usant esperma de calamar com a control biològic intern. (A, C i E) Observació amb els polaritzadors paral·lels. (B, D i F) Observació en posició d'extinció a 4.83 s d'exposició. La barra correspon a 15  $\mu m$ .

### 3.3. Estudi d'autoassociació de fragments de cromatina purificats.

#### 3.3.1. Anàlisi dels materials emprats en els experiments d'autoassociació.

Es va analitzar la longitud dels fragments de cromatina obtinguts en el procés de digestió amb nucleasa micrococcal. La dilució de la mostra digerida amb medis de baixa força iònica, provoca la descondensació dels fragments i permet la visualització per microscòpia electrònica de transmissió dels anomenats "collarets" de nucleosomes. A la figura 3.18, es presenten exemples corresponents a fragments de cromatina d'entre 25 i 55 nucleosomes.

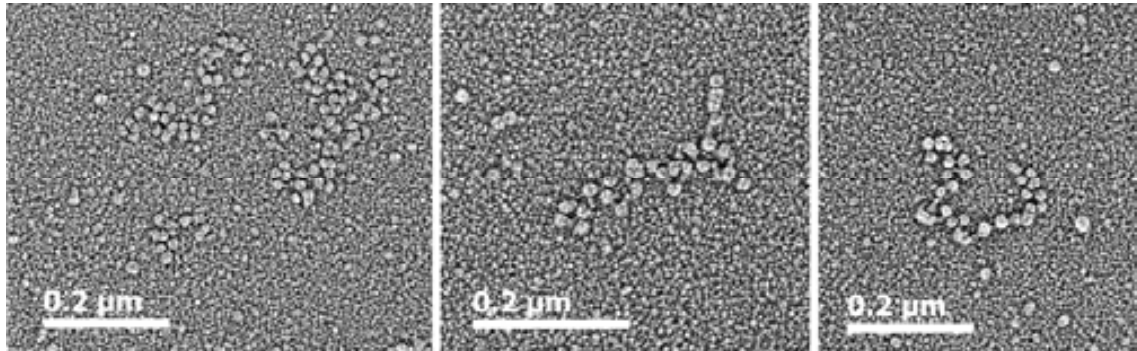


Figura 3.18. Imatge de TEM de fragments de cromatina obtinguts per digestió amb nucleasa micrococcal (1:100) durant 15 minuts a 37°C. La mostra es va diluir amb 1 mM Pipes i 1 mM EDTA per tal de provocar la descondensació dels fragments. La fixació va ser en dissolució (apartat 2.12.5.a) i posteriorment es va estendre la mostra de forma directa (apartat 2.12.4.a).

A la figura 3.19, es mostren exemples d'anàlisi d'histones corresponents a experiments típics d'autoassociació. També es van fer experiments en els que es va utilitzar l'electroforesi com a mètode de purificació de fragments de cromatina. En primer lloc, es va sotmetre la mostra a una electroforesi d'agarosa en gels no desnaturants per purificar els fragments de cromatina (veure apartat 2.6) i per seleccionar fragments de mida diversa. A partir del material obtingut, es va fer un anàlisi del DNA i de les histones presents a la mostra. Una part del material va ser destinada als experiments d'autoassociació.

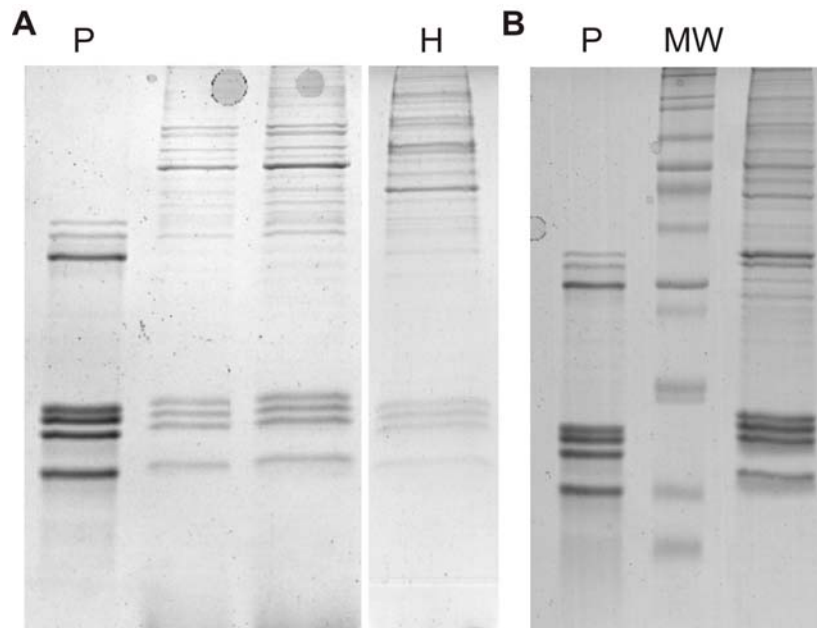


Figura 3.19. Anàlisi d'histones amb gels de poliacrilamida-SDS. Tinció amb Coomassie Blue. (A) Correspon a mostra obtinguda després d'una diàlisi amb sacs de porus gran; P correspon al patró d'histones de timus de vedella; H correspon a histones procedent de cèl·lules HeLa interfàsiques. (B) Mostra obtinguda després d'una diàlisi en condicions fisiològiques durant 6 hores a 4°C; P correspon al patró d'histones de pollastre; MW correspon al patró de pesos moleculars de proteïna. La mostra va ser concentrada en ambdós casos abans de ser aplicada al gel (apartat 2.8.1).

A la figura 3.20, es mostren les anàlisis corresponents a les mostres d'un experiment típic d'autoassociació de fragments de cromatina extrets de gel de nucleoproteïna. La figura A mostra el gel no desnaturalitzant de 0.5% d'agarosa, en el qual s'observa una banda molt ampla de material deguda als fragments de cromatina obtinguts per la digestió de cromosomes amb nucleasa micrococal. A la figura B es mostra el gel desnaturalitzant de 0.7% d'agarosa, en el qual s'analitzà el DNA procedent de tacs d'agarosa retallats del gel anterior. Tal com es pot observar i considerant que la longitud de DNA corresponent a un nucleosoma és de 190 bp (Compton et al., 1976; Tate i Philipson, 1979), el material seleccionat està força digerit, els fragments de cromatina tenen una longitud corresponent a 1-6 nucleosomes. Per altra banda, a la figura 3.20.C, es mostra l'anàlisi de les histones contingudes a la mostra, fet mitjançant un gel de poliacrilamida-SDS.

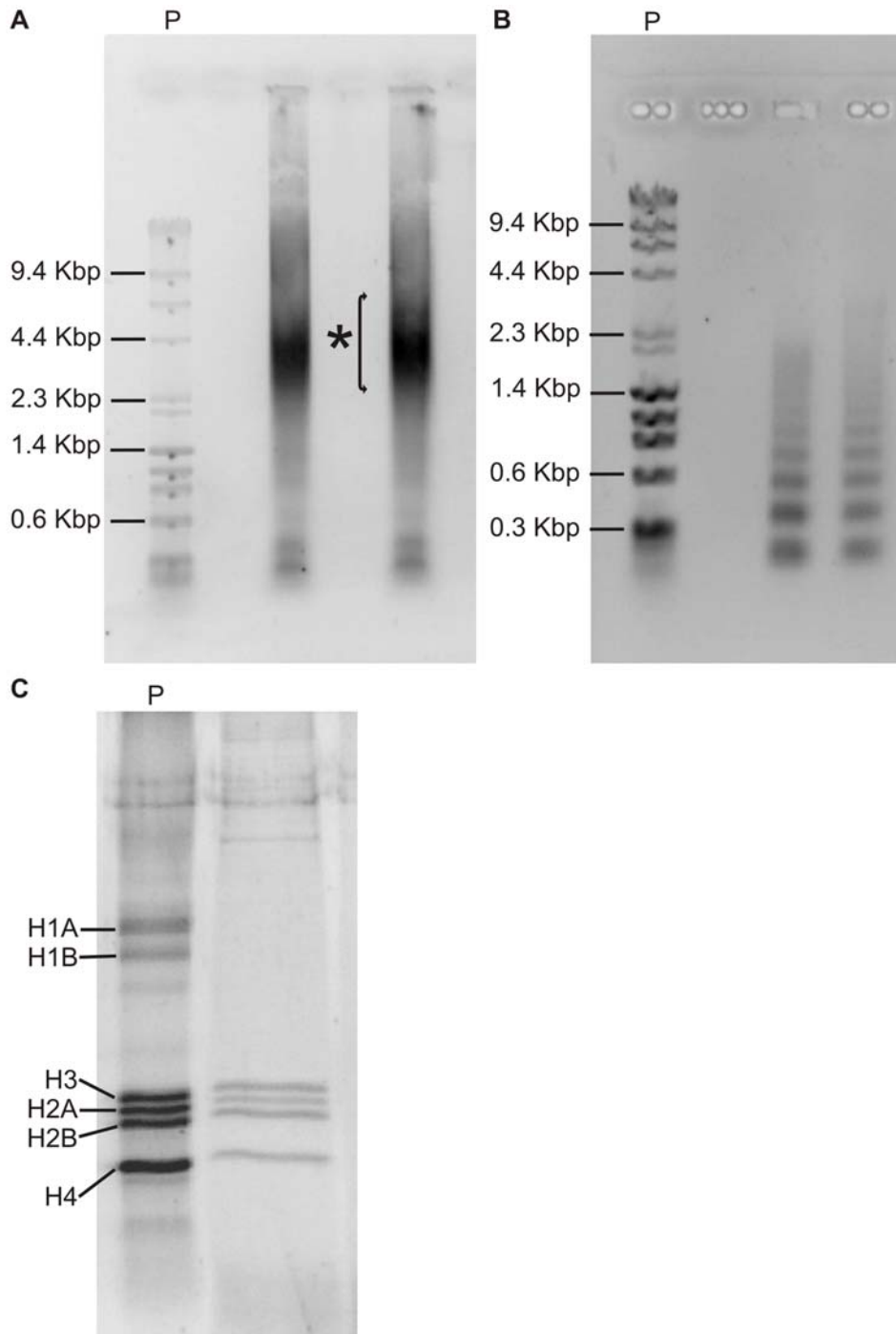


Figura 3.20. Exemple de gels d'electroforesi usats per purificar i analitzar la mostra. (A) Correspon al gel no desnaturalitzant amb 0.5% agarosa; (\*) Indica la mostra seleccionada per posteriors experiments; P correspon al patró de pes molecular *DRigest III* (GE-Healthcare); (B) Gel de 0.7% agarosa amb 0.05% SDS; P correspon al patró de pes molecular *DRigest III* (GE-Healthcare); (C) Gel de poliacrilamida-SDS, tinció amb Oriole; P correspon al patró d'histones de timus de vedella.

### **3.3.2. Formació de plaques per autoassociació en condicions iòniques properes a la metafase.**

Inicialment, es van estudiar condicions que poguessin promoure l'associació dels fragments de cromatina procedents de la digestió dels cromosomes metafàsics amb nucleasa micrococcal. Es va estudiar el procés d'associació mitjançant la incubació a diferents temps amb diverses concentracions de  $MgCl_2$ . També es va analitzar l'efecte de la concentració dels fragments de cromatina aïllats. Els resultats obtinguts van indicar que les plaques es formaven espontàniament a partir de fragments de cromatina sense diluir (dissolts en 10 mM EDTA) quan eren dialitzats amb tampons amb una composició iònica similar a la dels cromosomes metafàsics: 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM  $MgCl_2$  (veure apartat 2.7.1). A les figures 3.22-3.30, s'observen plaques procedents de la diàlisi en aquestes condicions durant 5 hores a 4°C. Els resultats demostren que apareixen nombroses plaques que moltes vegades presenten una extensió important. Cal destacar també que s'observen plaques fins i tot en zones on aparentment domina la presència de material amorf (veure figura 3.26).



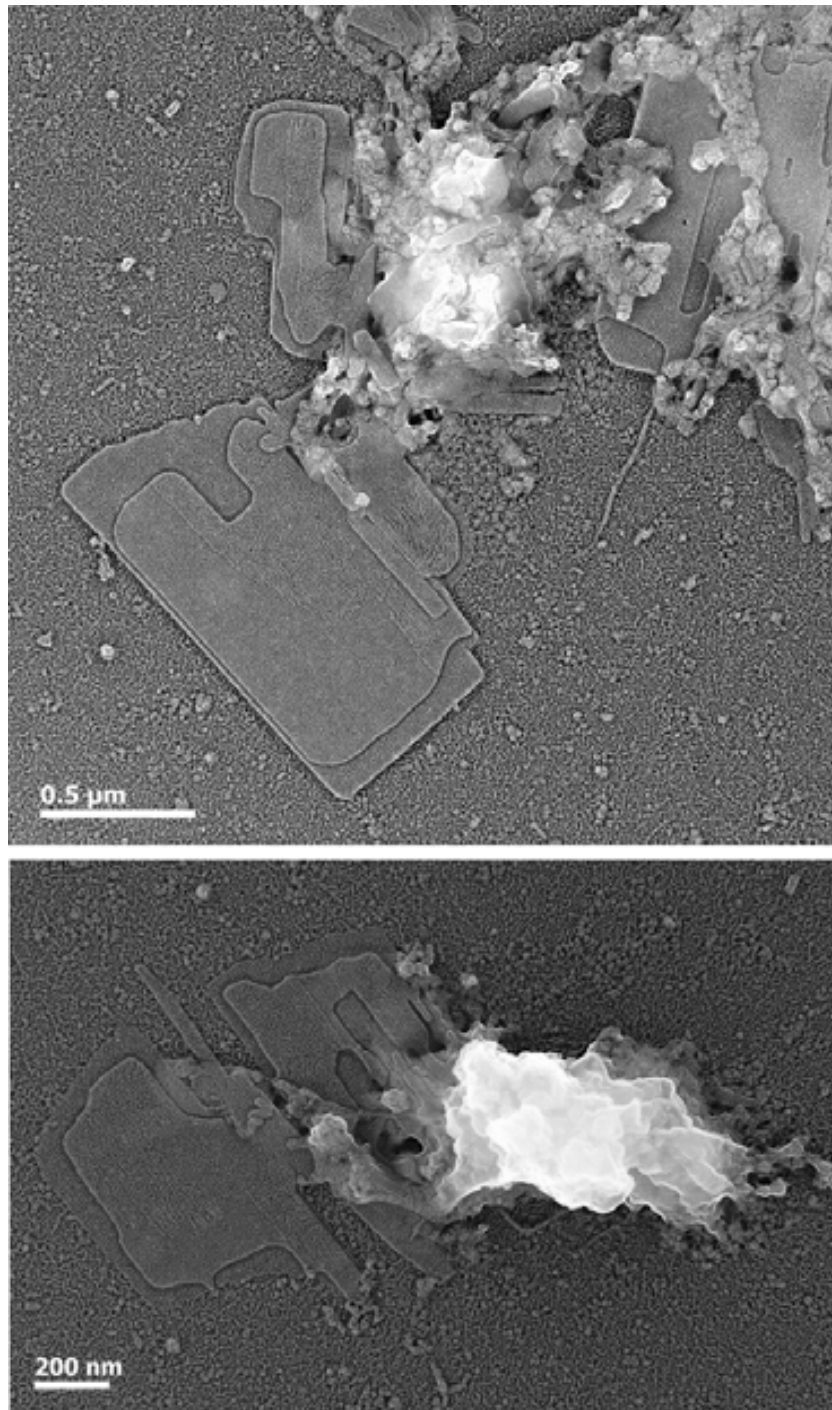


Figura 3.21. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió de plaques obtingudes a partir de l'autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics. Els fragments es van obtenir per digestió dels cromosomes amb nucleasa micrococcal 1:100 (15 min). L'autoassociació es va produir mitjançant una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4 °C. La mostra era estesa per centrifugació, fixada i platinada segons els protocols habituals del grup (apartats 2.12.4.b i 2.12.5.b).

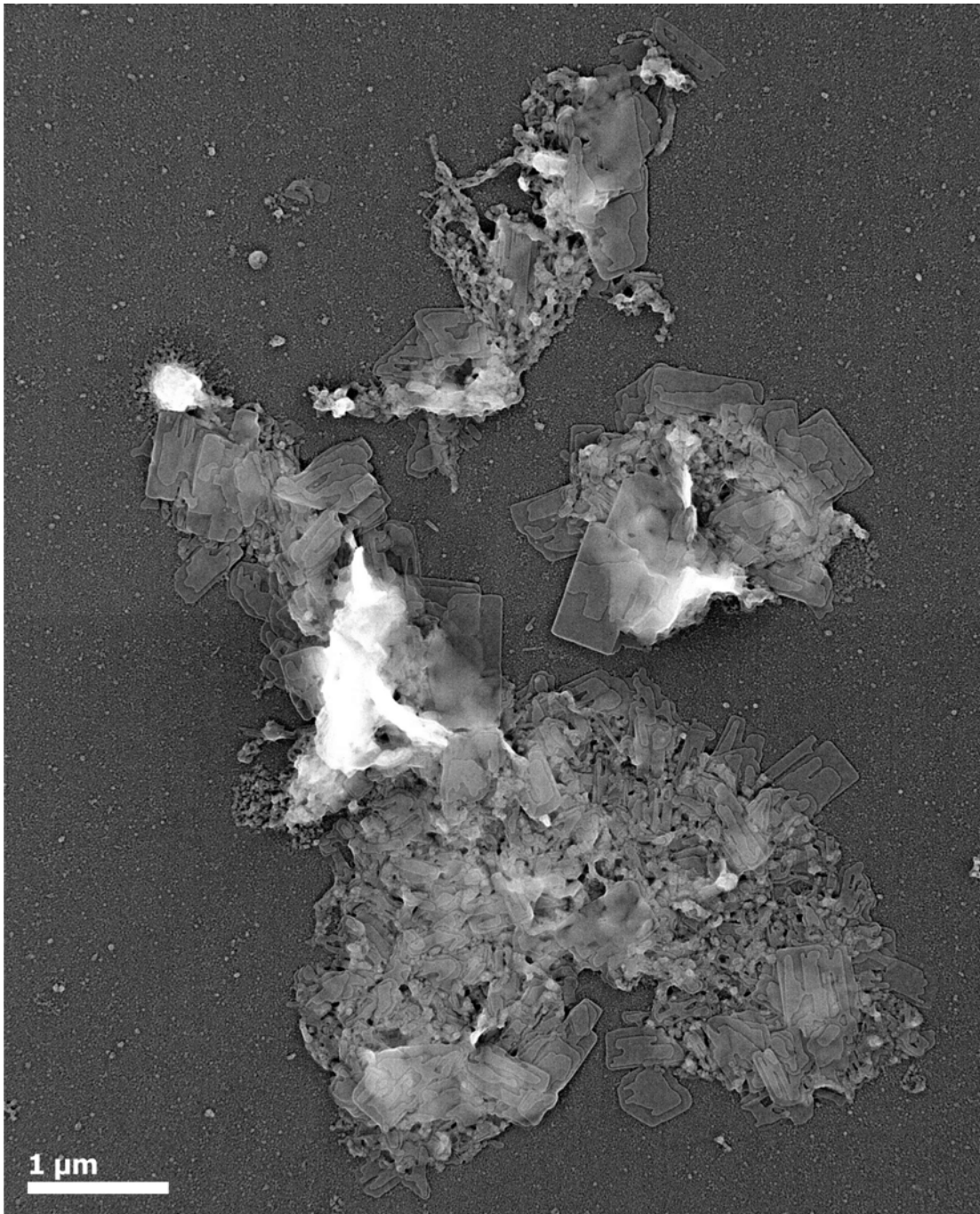


Figura 3.22. Plaques generades a partir de l'autoassociació de fragments de cromatina obtinguts per digestió amb nucleasa micrococcal de cromosomes metafàsics. Els fragments es van dialitzar amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4°C.

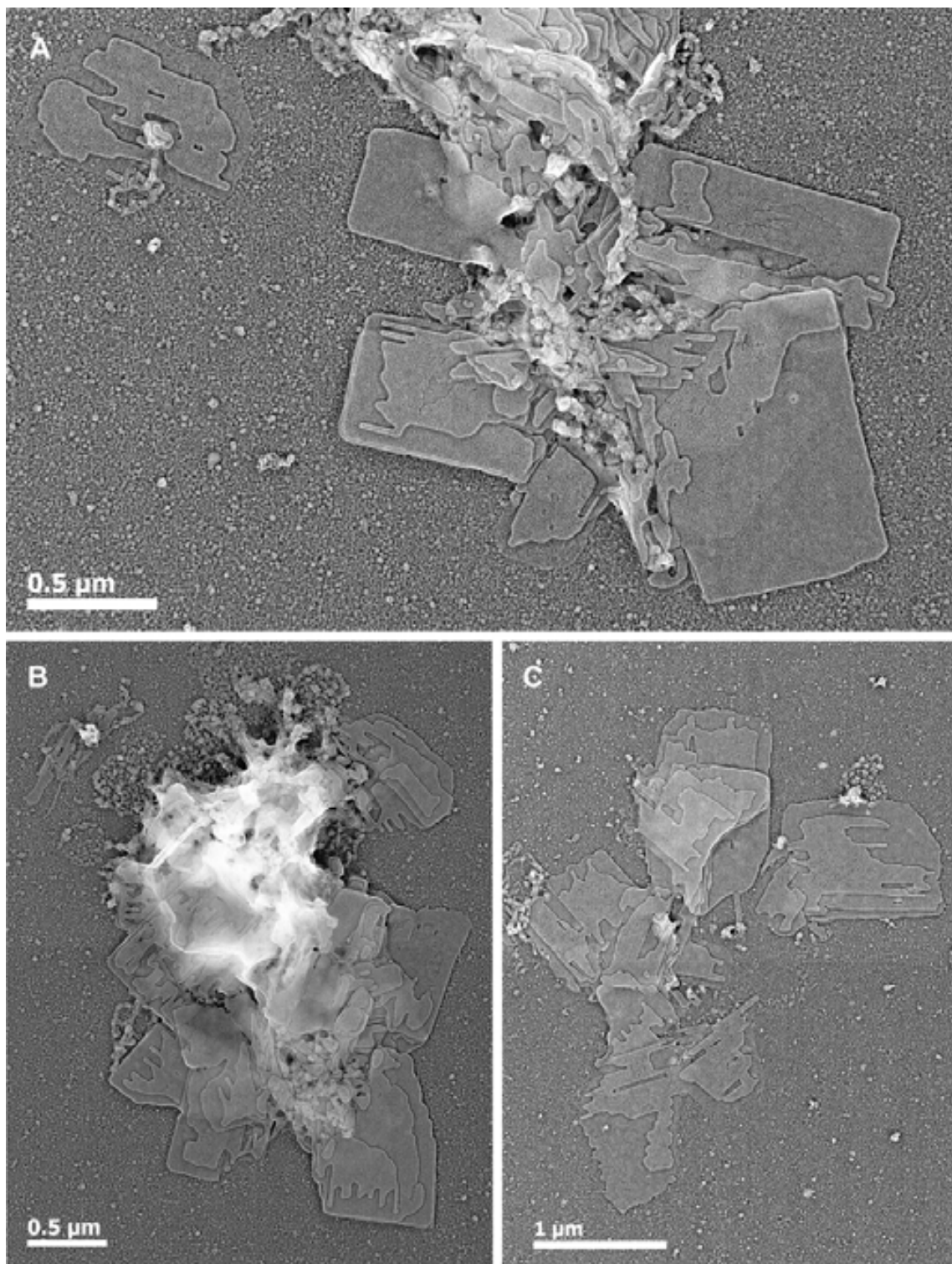


Figura 3.23. Exemples de plaques obtingudes per l'autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics dialitzats en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4°C.

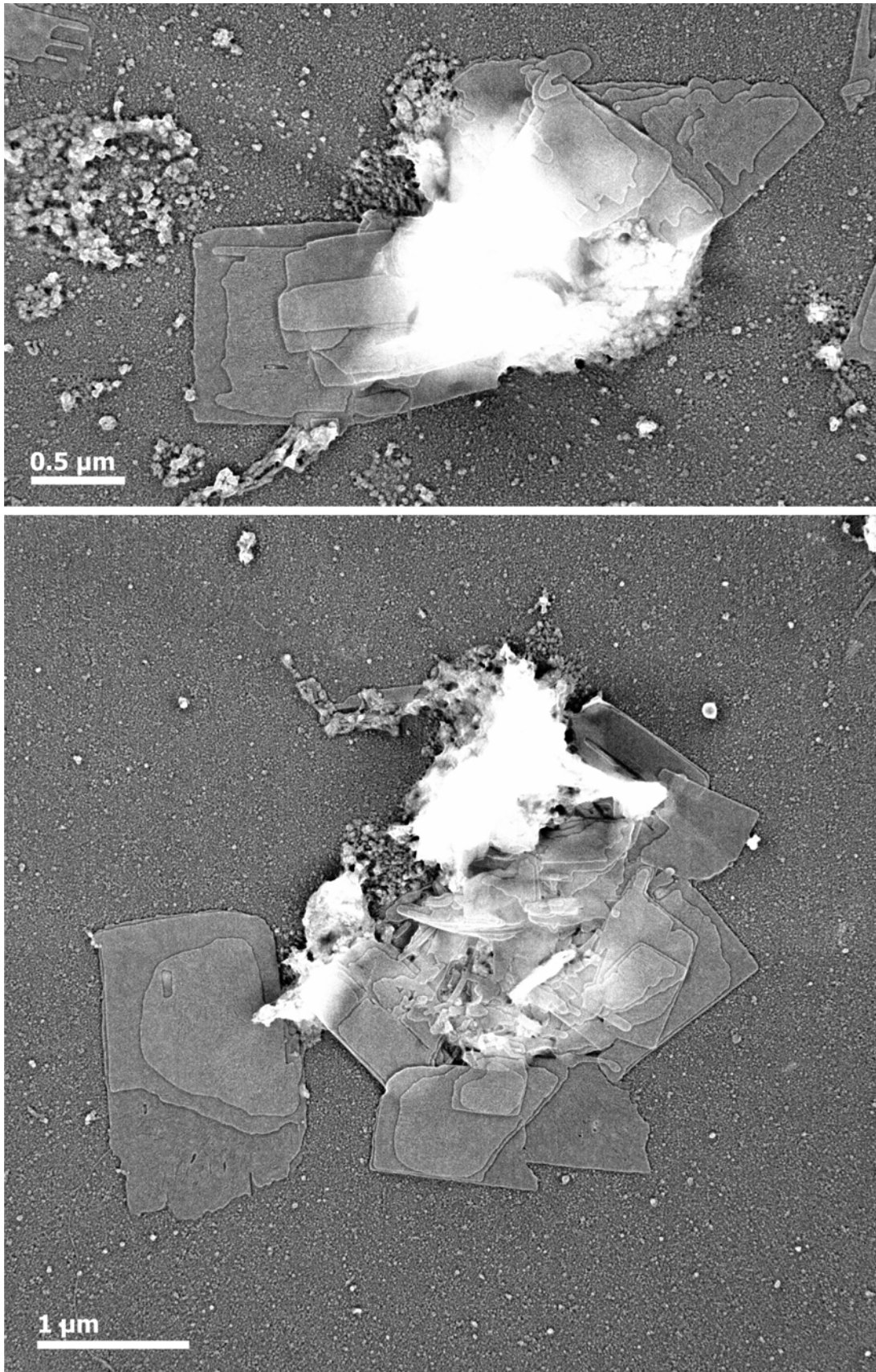


Figura 3.24. Més exemples de plaques obtingudes a partir de l'associació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics i dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4°C.

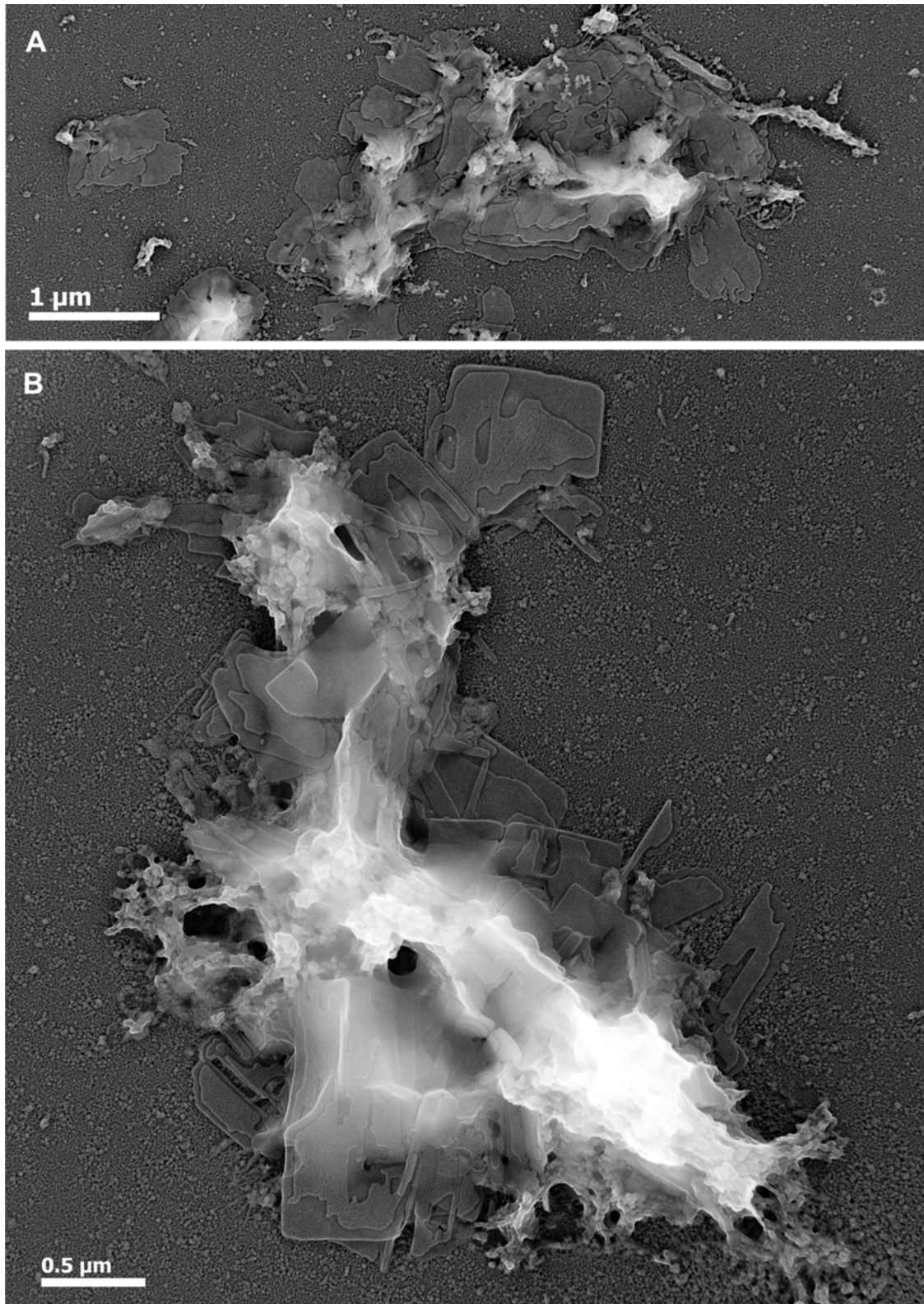


Figura 3.25. Més exemples de plaques obtingudes a partir de l'autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics i dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4°C.

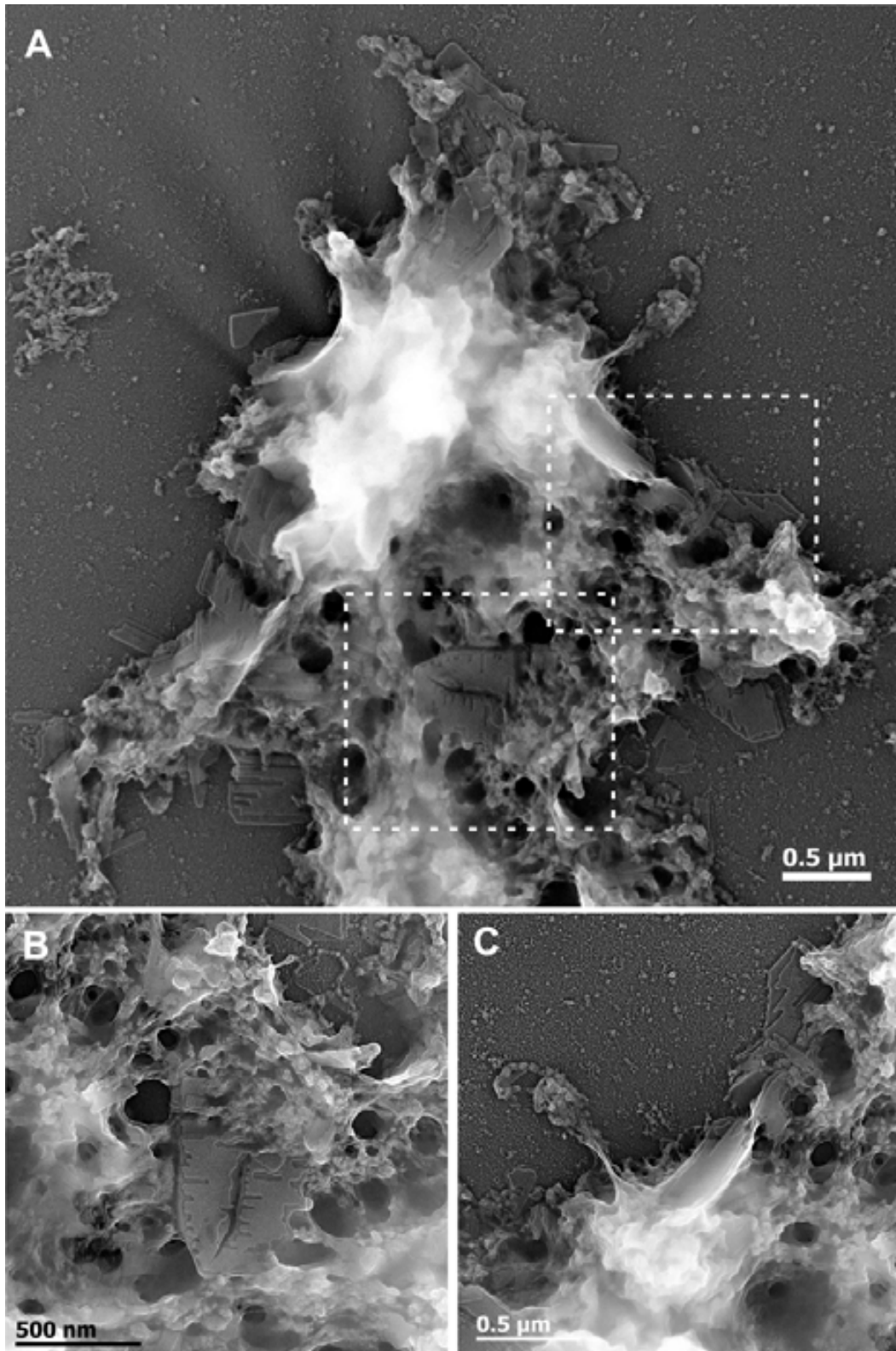


Figura 3.26. Plaques obtingudes a partir de la diàlisi de fragments de cromatina metafàsica amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4°C. (B) i (C) corresponen a les zones marcades a (A).

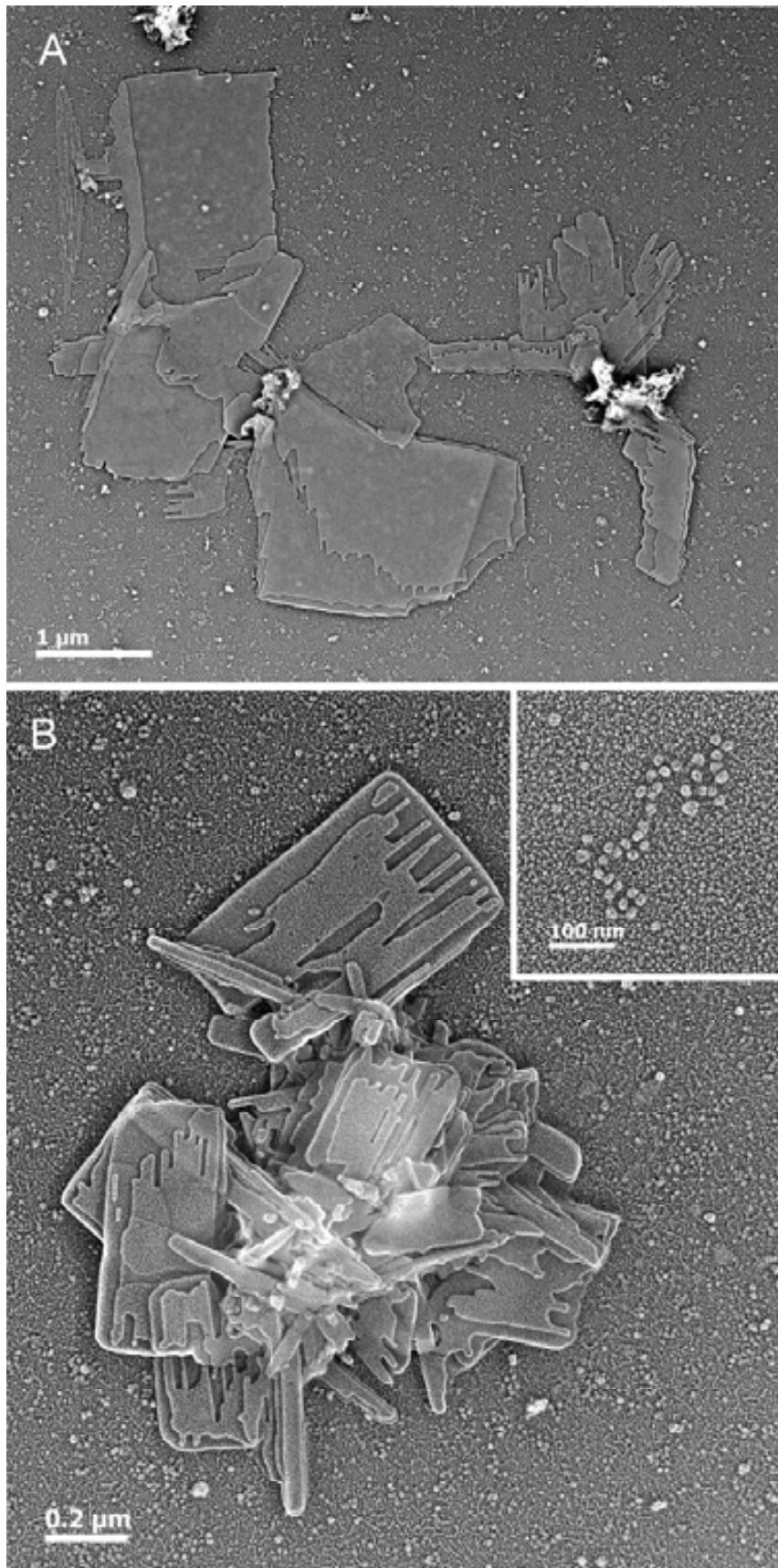


Figura 3.27. Més exemples de plaques obtingudes per l'autoassociació de fragments de cromatina dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM  $MgCl_2$  durant 5 h a 4°C. El requadre de B correspon a la mateixa mostra sense dialitzar, diluïda amb 1 mM Pipes (pH 7.2) i 1 mM EDTA.

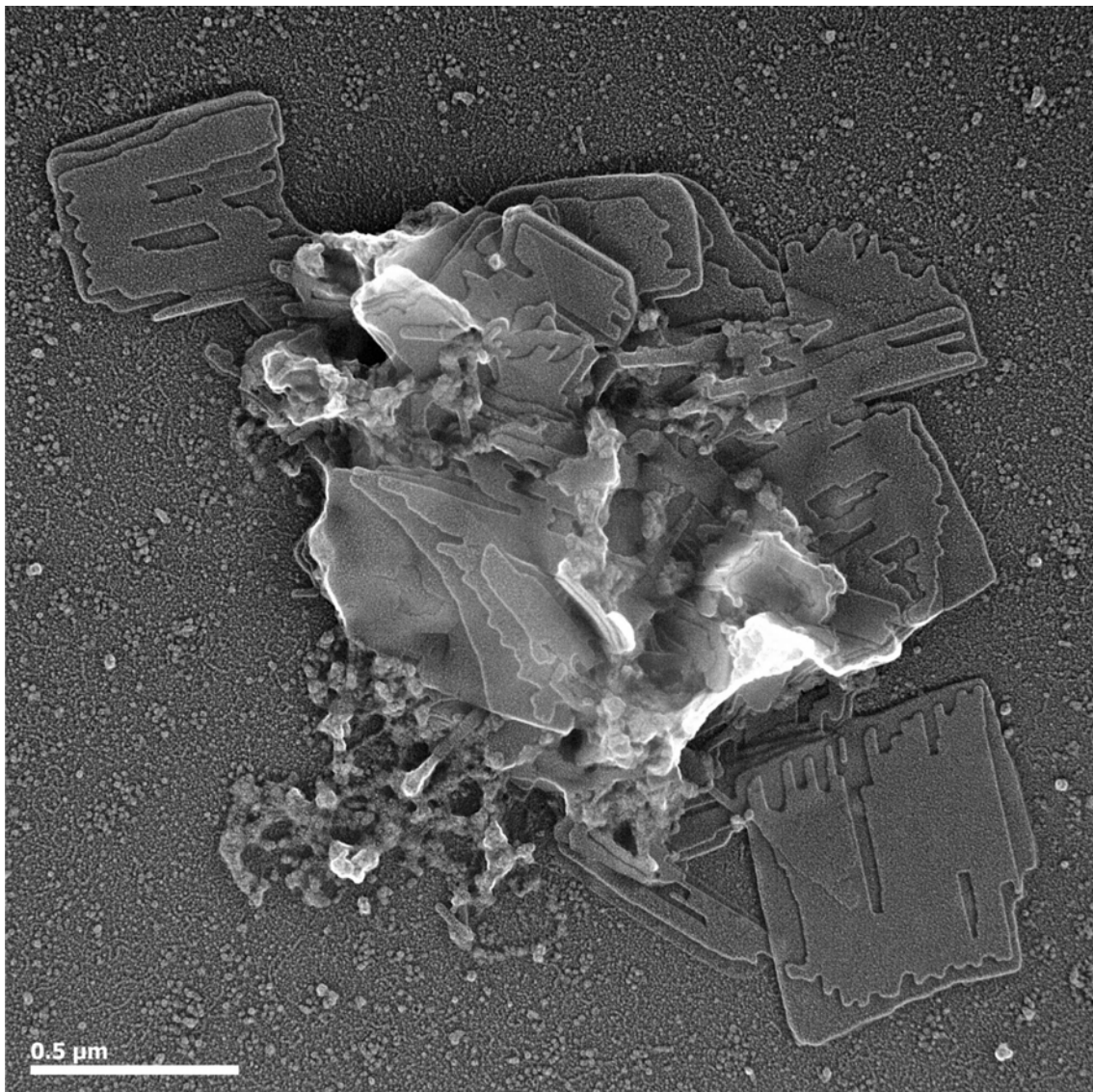


Figura 3.28. Més exemples de plaques formades per autoassociació de fragments de cromatina metafàsica dialitzats durant 6 h a 4°C amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub>.

Tal com s'aprecia en les figura anteriors, les plaques estan normalment formades de varies capes, apilades entre elles donant lloc a estructures estratificades. Són estructures idèntiques a les plaques emanades de cromosomes parcialment desnaturalitzats que s'han estudiat prèviament al nostre laboratori (Caravaca et al., 2005; Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann, 2009).

La majoria de les estructures laminars observades presenten una superfície molt llisa, però tal com s'observa a les figures 3.29 i 3.30, s'ha vist que algunes de les plaques presenten petites estriacions a la seva superfície. Donat que aquestes zones irregular tenen una estructura granular amb unes dimensions compatibles amb la mida dels nucleosomes, probablement es tracta de nucleosomes que no estan tan perfectament associats com quan estan en plaques completament ben formades.



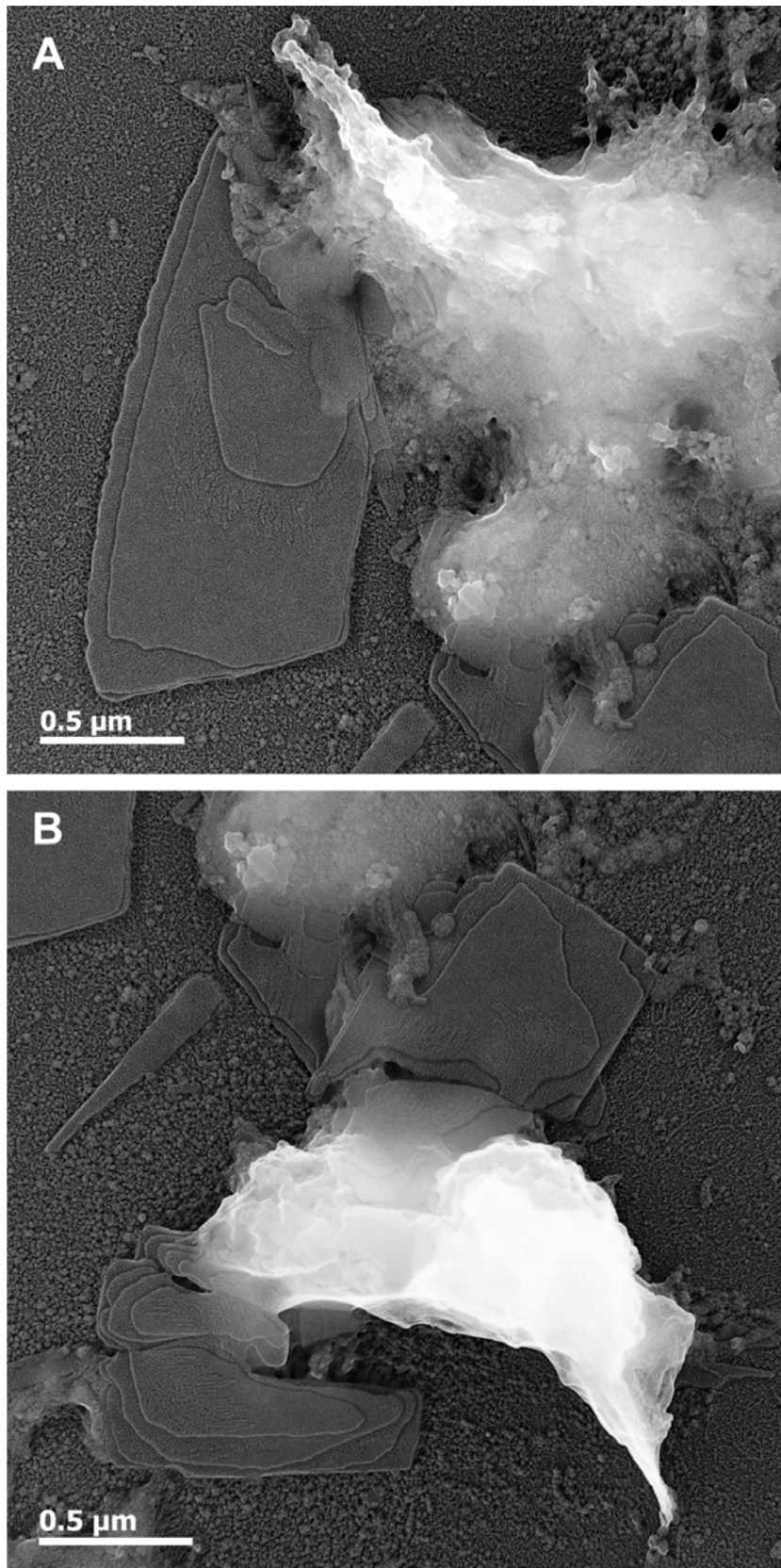


Figura 3.29. Exemples de plaques amb estriacions obtingudes per l'autoassociació de fragments de cromatina dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 5 h a 4°C.

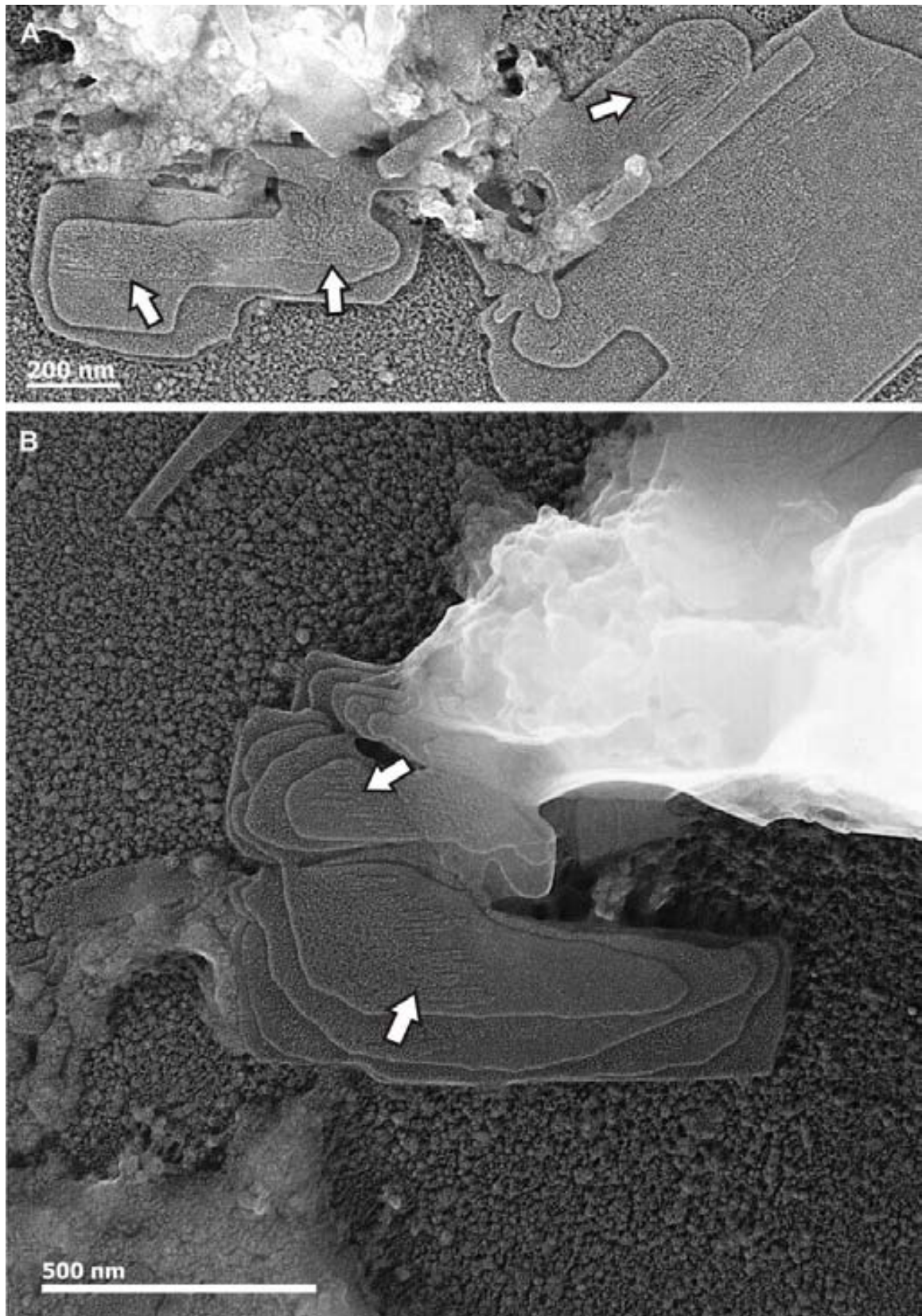


Figura 3.30. Imatges d'estriacions observades sobre plaques formades per autoassociació de fragments de cromatina metafàsica dialitzats durant 6 h a 4°C amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub>. Les fletxes indiquen les estriacions a la superfície de les plaques. (B) Detall de les estriacions de les plaques observades a la figura 3.29.B.

En molts camps es visualitzen petites zones laminars que emergeixen d'agregats de cromatina aparentment molt heterogenis (figures 3.31.A i 3.32.A). Sobre aquestes estructures laminars s'observen fragments en procés d'associació, que a la vegada formen una nova placa sobre l'anterior (figura 3.31.B i 3.32.B). Es tracta de plaques en formació que probablement podrien arribar a ser més grans.

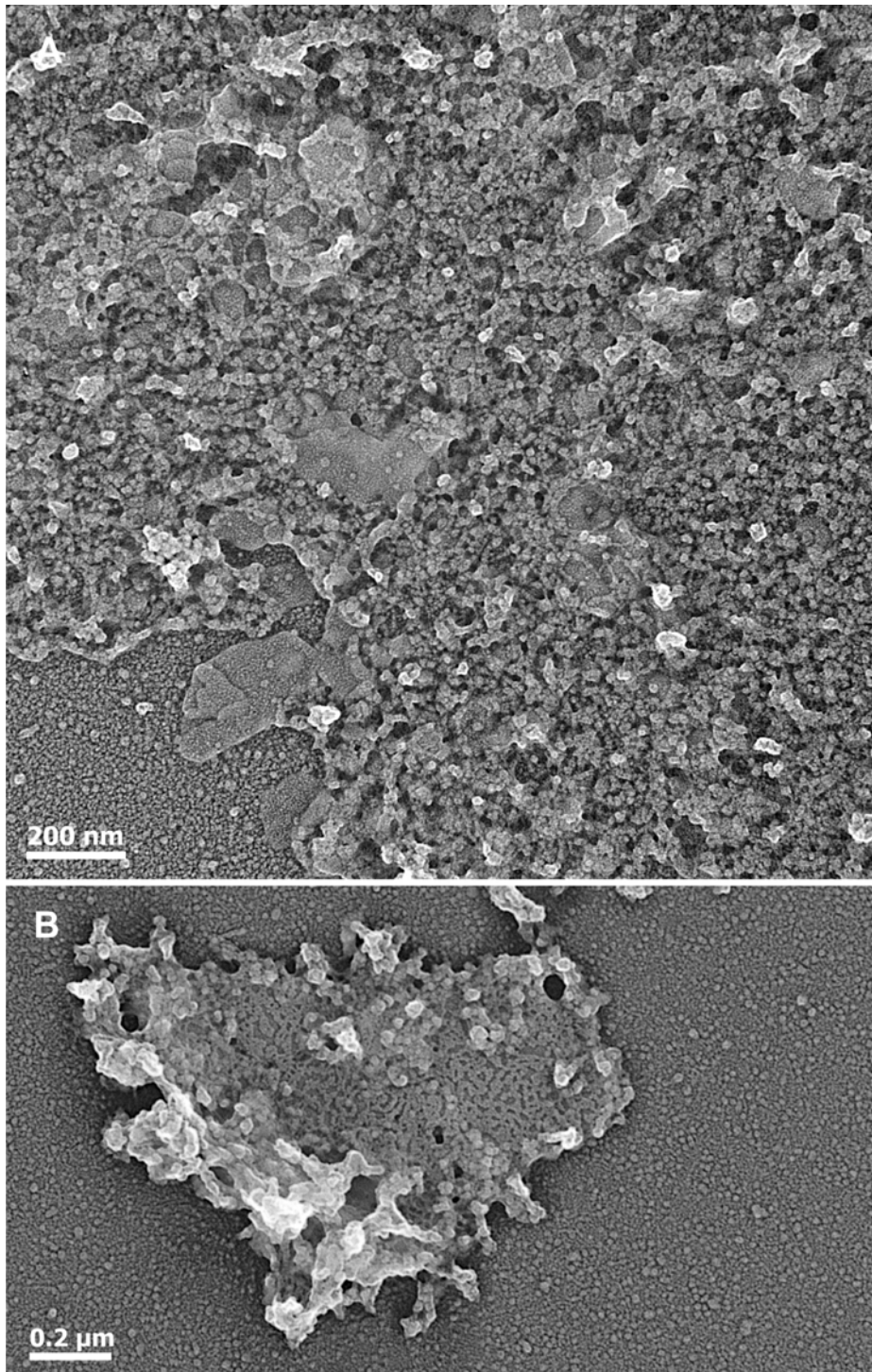


Figura 3.31. Plaques en formació obtingudes després de dialitzar els fragments de cromatina amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> a 4°C durant 6 h (A) i 5 h (B).

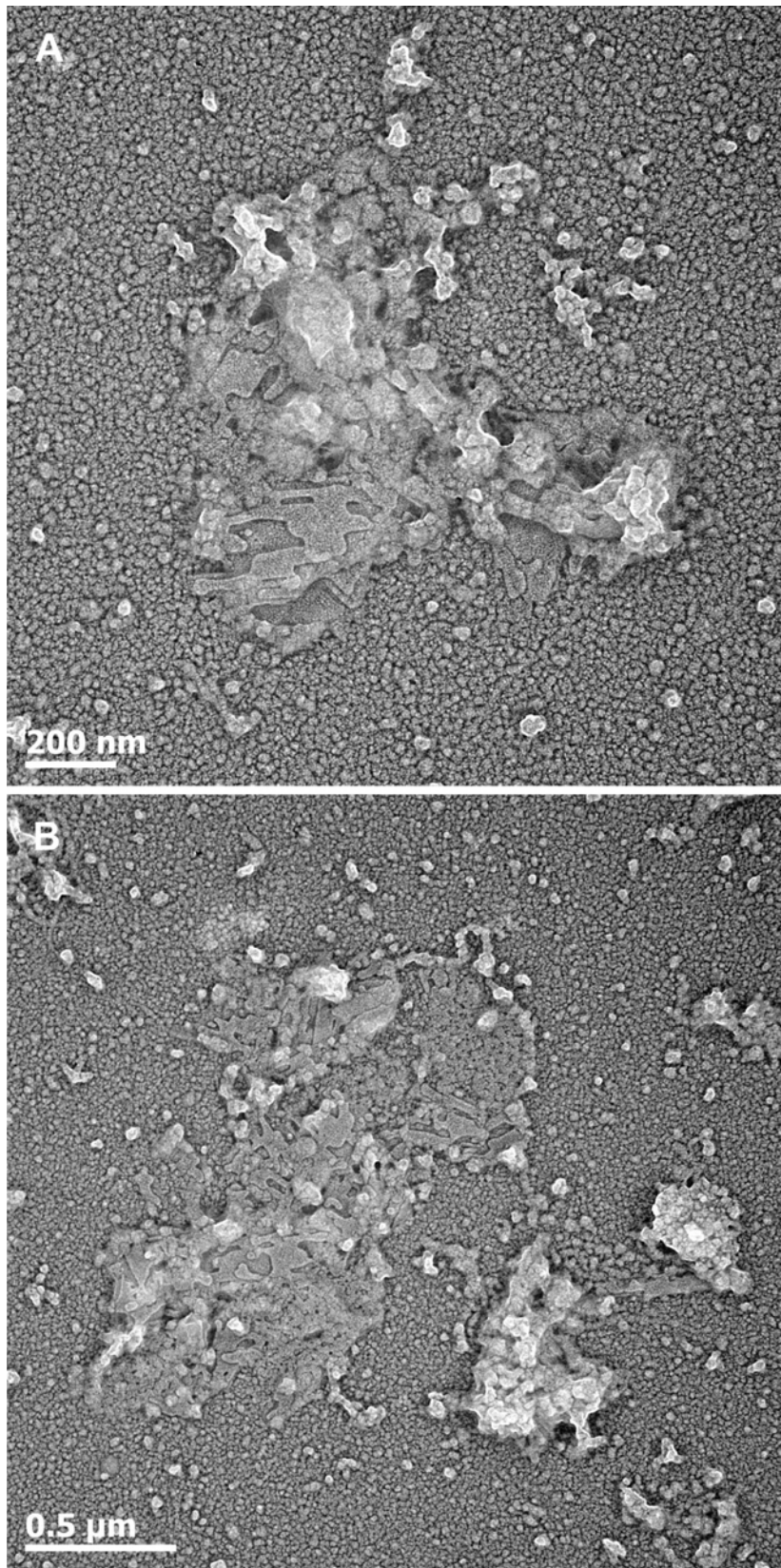


Figura 3.32. Agregats laminars en formació obtinguts per la diàlisi de fragments de cromatina metafàsica amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl<sub>2</sub> durant 10 h a 37°C.