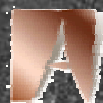


Elementos estructurales de la cromatina en los cromosomas mitóticos

Juan Manuel
Caravaca Guasch



Universitat Autònoma de Barcelona



**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Ciències
Universitat Autònoma de Barcelona**

Elementos estructurales de la cromatina en los cromosomas mitóticos

Memòria presentada per adquirir el grau de
Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular
per Juan Manuel Caravaca Guasch

Treball realitzat al Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Joan-Ramón Daban Balañà.

Juan Manuel Caravaca Guasch

Dr. Joan-Ramon Daban Balañà

Bellaterra, 11 de juny de 2004

Índice

Índice	I
Agradecimientos	VI
Abreviaturas más comunes	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El nucleosoma	1
1.2 La fibra de cromatina	3
1.2.1 Dinámica de la cromatina	3
1.2.1.1 Autoasociación de la cromatina	6
1.2.2 Modelos estructurales	7
1.2.2.1 Modelo de solenoide	7
1.2.2.2 Modelo de superbead	7
1.2.2.3 Modelos helicoidales de doble origen	8
1.2.3 Modelo de solenoide interdigitado compacto	9
1.2.3.1 Electroforesis de cromatina en geles no desnaturizantes de agarosa en presencia de MgCl ₂ 1.7 mM	9
1.2.3.2 Análisis de las fibras de cromatina por microscopía electrónica	10
1.2.3.3 Modelo de solenoide propuesto por nuestro grupo	11
1.3 El cromosoma	13
1.3.1 Ciclo celular y mitosis	13
1.3.2 Modelos estructurales propuestos para el cromosoma metafásico	15
1.3.2.1 Modelos basados en lazos de la fibra de cromatina anclados a un eje proteico	16
1.3.2.2 Modelos basados en diferentes grados de plegamiento helicoidal	18
1.3.2.3 Nuevos modelos	21
1.3.2.3.1 Modelos de plegamiento a través de cromómeros	21
1.3.2.3.2 Modelo de estructura reticular	23
1.3.2.3.3 Modelo Mixto	24
1.3.3 Restricciones físicas de los diferentes niveles de plegamiento del DNA para la formación del cromosoma metafásico	24
1.3.4 Proteínas involucradas en la estructura del cromosoma	26
1.3.4.1 Histonas	26
1.3.4.2 Topoisomerasa II	27
1.3.4.3 Proteínas SMC (Condensinas y Cohesinas)	28
1.4 Objetivos	30

2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1 Cultivos celulares	31
2.1.1 Establecimiento de un cultivo de células HeLa	31
2.1.2 Mantenimiento de un cultivo celular de células HeLa	32
2.1.3 Recuento de células	33
2.1.4 Cultivo celular en presencia de colcemida	35
2.2 Obtención del material biológico	36
2.2.1 Obtención de células	36
2.2.2 Obtención de cromosomas en diversos medios	37
2.2.2.1 Cromosomas obtenidos en hexylene glycol	37
2.2.2.2 Cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas	37
2.2.2.3 Cromosomas obtenidos en TeaKMC-MgCl ₂ 5mM	38
2.2.2.3.1 Cromosomas obtenidos en medio hipotónico y TeaKMC-MgCl ₂ 5 mM	38
2.2.2.3.2 Cromosomas obtenidos directamente en TeaKMC-MgCl ₂ 5 mM	38
2.2.2.4 Cromosomas obtenidos en TeaBM-MgCl ₂ 5 mM	39
2.2.2.5 Aislamiento y purificación de cromosomas mediante un gradiente de sacarosa escalonado	39
2.2.3 Procesamiento y observación del material biológico en el microscopio óptico	43
2.2.3.1 Tinción con yoduro de propidio	43
2.2.3.2 Tinción con colorante Giemsa	44
2.2.3.2.1 Fijación en metanol-ácido acético	44
2.2.3.2.2 Aplicación del colorante Giemsa	44
2.3 Microscopía electrónica de cromosomas	45
2.3.1 Eliminación de partículas contaminantes de los materiales y los medios empleados	45
2.3.2 Preparación de rejillas para microscopía electrónica	47
2.3.3 Evaporador de carbón y carbón-platino	47
2.3.4 Activación de las rejillas	49
2.3.5 Extensión de los cromosomas sobre rejilla	50
2.3.5.1 Cromosomas obtenidos en poliaminas, TeaKMC, TeaBM o aislados a partir de un gradiente de sacarosa	50
2.3.5.2 Cromosomas en metanol ácido-acético	51
2.3.5.3 Cromosomas obtenidos en hexylene glycol	52
2.3.6 Cambios de medio en rejilla	52
2.3.7 Digestiones con enzimas	58
2.3.7.1 Digestión de cromosomas metafásicos con tripsina	58
2.3.7.2 Digestión de cromosomas metafásicos con RNAsa	59
2.3.7.3 Digestión de cromosomas metafásicos con nucleasa micrococcal	60

2.3.7.3.1	Determinación de la actividad de la nucleasa micrococcal ...	60
2.3.7.3.2	Digestión en solución	61
2.3.7.3.3	Digestión en rejilla	62
2.3.8	Fijación de los cromosomas para microscopía electrónica	64
2.3.8.1	Cromosomas aislados y purificados mediante un gradiente de sacarosa.....	64
2.3.8.2	Cromosomas obtenidos en TeaKMC, poliaminas y TeaBM.....	65
2.3.8.3	Cromosomas en metanol-ácido acético	66
2.3.8.4	Cromosomas obtenidos en hexylene glycol	67
2.3.9	Platinación de las muestras	67
2.3.9.1	Platinado rotacional	68
2.3.9.2	Platinado unidireccional	68
2.3.10	Observación y fotografía de la muestra	69
2.4	Procesamiento de las imágenes de microscopía electrónica	70
2.4.1	Realización de medidas	70
2.4.2	Medición de alturas	71
2.4.2.1	Determinación del ángulo de platinación (α_{ap} y α_{real}).....	71
2.4.2.2	Determinación del ángulo β del evaporador de carbón y carbón-platino.....	73
2.4.2.3	Determinación de la altura de una cromátida (h_c y h_o).....	74
2.4.2.3.1	Cromátida de sección circular	74
2.4.2.3.2	Cromátida de sección en forma de óvalo	76
2.4.2.3.3	Factores de corrección para h_c y h_o	76
2.4.2.4	Determinación de la altura de una placa.....	78
2.4.3	Tratamiento informático de las imágenes	80
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
3.1	Obtención de células metafásicas	81
3.2	Obtención de cromosomas metafásicos	85
3.2.1	Cromosomas observados en el interior de las células metafásicas	85
3.2.2	Cromosomas fijados con metanol-ácido acético	86
3.3.3	Cromosomas obtenidos en <i>hexylene glycol</i>	87
3.3.4	Cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas	88
3.3.5	Cromosomas purificados mediante gradiente de sacarosa	90
3.3.6	Observación de cromosomas digeridos mediante diferentes enzimas	92
3.3.7	Resolución y contraste de cromosomas sin platinar	93
3.3.8	Características estructurales de los cromosomas obtenidos	94
3.3.8.1	Diámetro de las cromátida.....	94
3.3.8.2	Altura de las cromátidas	98
3.3.8.3	Concentración local de DNA.....	102

3.3 Estructura global de los cromosomas en diferentes medios.....	104
3.3.1 Cromosomas compactos.....	105
3.3.2 Cromosomas granulados.....	108
3.3.3 Cromosomas fibrosos	119
3.4 Elementos estructurales del cromosoma: la placa	128
3.4.1 La placa en el cromosoma.....	128
3.4.2 Características estructurales de la placa	135
3.5 Elementos estructurales del cromosoma: el gránulo	142
3.5.1 Presencia del gránulo en el cromosoma.....	142
3.5.2 Características estructurales del gránulo.....	148
3.6 Elementos estructurales del cromosoma: la fibra	148
3.6.1 Fibras gruesas	148
3.6.1.1 Formación de fibras	148
3.6.1.2 Características estructurales	157
3.6.2 Fibras delgadas	157
3.6.2.1 Presencia de las fibras delgadas en el cromosoma	157
3.6.2.2 Características estructurales de la fibra delgada.....	158
3.7 Relación entre los diferentes elementos.....	164
4. DISCUSIÓN GENERAL	170
4.1 Obtención de cromosomas metafásicos.....	170
4.1.1 Procedimiento estándar de obtención de cromosomas	170
4.1.2 Integridad física de los cromosomas obtenidos.....	171
4.1.3 Relación entre los diferentes tipos de estructura cromosómica	172
4.2 Elementos estructurales del cromosoma	174
4.2.1 La fibra	174
4.2.2 El gránulo	175
4.2.3 La placa	177
4.3 Relaciones estructurales entre los diferentes elementos	179
5. CONCLUSIONES	182
5.1 Métodos de preparación e integridad de los cromosomas obtenidos	182

5.2 Estructura global de los cromosomas	183
5.3 Estructura de la cromatina en el interior de los cromosomas metafásicos.....	184
6. BIBLIOGRAFÍA	185

Agradecimientos

Esta tesis ha sido posible gracias a la disponibilidad y la dedicación de mi director de tesis, el Dr. Joan Ramón Daban. A él también le agradezco su paciencia y los esfuerzos que tan amablemente ha dedicado a la formación de mi persona durante estos años.

Al *Servei de Anàlisis i Fotodocumentació* de la UAB (Salva Bartolomé) debo darle las gracias por su ayuda técnica e informática, y sobretodo por sus consejos en otros campos no científicos como el ciclismo o el submarinismo.

Al *Servei de Microscopia* de la UAB le agradezco su asesoramiento y asistencia, y también la amabilidad de todos sus miembros.

A la Dra. Paqui García, por haberme introducido en el mundo de los cultivos celulares.

Al Ministerio de Educación y Cultura por la concesión de una beca predoctoral FPI.

También quiero expresar mi agradecimiento al los compañeros del grupo de cromatina y a los colegas del Departamento (especialmente a Carol, Carme y Jordi) por su inestimable compañía y paciencia durante todo este tiempo.

Y sobretodo dedico esta tesis a mis padres, a mis hermanos, a mi tía Conchita y a todo el resto de mi familia.

Abreviaturas más comunes

A	amperios
Å	angstroms
ATP	adenosina trifosfato
cm	centímetros
cm ²	centímetros cuadrados
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	etilendinitrilotetraacetato de sodio
EGTA	ácido etilen glycol-bis [β-aminoetil eter]-N, N, N', N' -tetraacético.
<i>et. al.</i>	et alter, y colaboradores
<i>g</i>	fuerza centrífuga relativa
g	gramos
h	horas
Kb	kilobases
Kv	kilovoltios
l	litros
M	molar (moles/litro)
mA	miliamperios
mbar	milibares
Medio de Carnoy	metanol-ácido acético 3:1
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
nm	nanómetros
°C	grados centígrados
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
Pipes	piperazina-N, N' -bis [ácido 2-etanosulfónico]
PME-MgCl ₂ 5 mM	tampón definido en la página 42
PMSF	fluoruro fenilmetilsulfónico
ppi	puntos por pulgada
RNA	ácido ribonucleico
RNAsa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
TEA	trietanolamina
TEAB	tampón trietanolamina 90 mM, ácido bórico 90 mM, pH 8.6
TeaBM-MgCl ₂ 5 mM	tampón definido en la página 39
TeaKMC-MgCl ₂ 5 mM	tampón definido en la página 38
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano
v/v	volumen/volumen
µg	microgramos
µl	microlitros

1 INTRODUCCIÓN

El DNA en la cromatina eucariótica está compactado en el núcleo a través de diferentes niveles estructurales. Primero el DNA se enrolla formando dos vueltas alrededor de un núcleo de proteínas que consiste en 8 moléculas de histonas, para formar una unidad llamada partícula núcleo. El nucleosoma se completa cuando la partícula núcleo incorpora la histona H1 y el DNA de unión. El siguiente nivel de estructura esta formado por un empaquetamiento de los nucleosomas en una cadena en forma de súper hélice llamada fibra de 30 nm. En este nivel, la histona H1, juega un papel importante. El sistema mediante el cual la fibra de 30 nm se empaqueta hasta llegar al nivel máximo de compactación, el cromosoma, es aún poco conocido (van Holde, 1989).

1.1 *El nucleosoma*

Los resultados obtenidos a partir de la utilización de técnicas como la digestión con nucleasa, la centrifugación analítica y la microscopía electrónica han demostrado que la subunidad fundamental de la cromatina consiste en una estructura con una precisa estequiometría de histonas y DNA, llamada nucleosoma (Wolffe, 1998). El nucleosoma es el primer nivel de compactación de la cromatina y consiste en el enrollamiento del DNA alrededor de un cuerpo central formado por 8 moléculas de histona. Este octámero está formado por un tetrámero de histonas H3-H4 flanqueado por dos dímeros de H2A-H2B. Las histonas son pequeñas proteínas básicas con una región central altamente estructurada (denominada dominio de plegamiento de histona) y las colas N y C terminales que no adoptan una estructura secundaria definida. Las histonas se distribuyen en el octámero como una superhélice espiral de proteínas que forma una rampa sobre la que se coloca el DNA (Arents *et al.*, 1991; Arents y Moudrianakis, 1993).

Cada octámero tiene aproximadamente 1.7 vueltas de DNA alrededor suyo y cada nucleosoma es conectado al siguiente por un DNA de unión, la longitud del cual varía dependiendo de la especie o incluso del tipo de célula. Diferentes nombres han sido utilizados para diferentes tipos de estructura nucleosomal en función de la longitud del DNA unido a éste. El octámero de histonas con 146 pb de DNA enrollado a su

alrededor tiene el nombre de *partícula núcleo*. La misma estructura con una molécula de histona H1 (H5 en aves) unida al DNA en el punto donde éste entra y sale de la partícula núcleo (aproximadamente 170 pb de DNA) es conocido como el *cromatosoma*. La estructura completa, incluyendo el DNA de unión (aproximadamente 35 pb), la partícula núcleo y la histona H1/H5, forman el *nucleosoma sensu stricto* (ver figura 1.1.1A). La formación de la fibra nucleosomal compacta el DNA 7 veces, y produce una fibra de cromatina de 10 nm de diámetro correspondiente a lo observado por microscopía electrónica cuando las muestras están preparadas a baja fuerza iónica (Sumner, 2003).

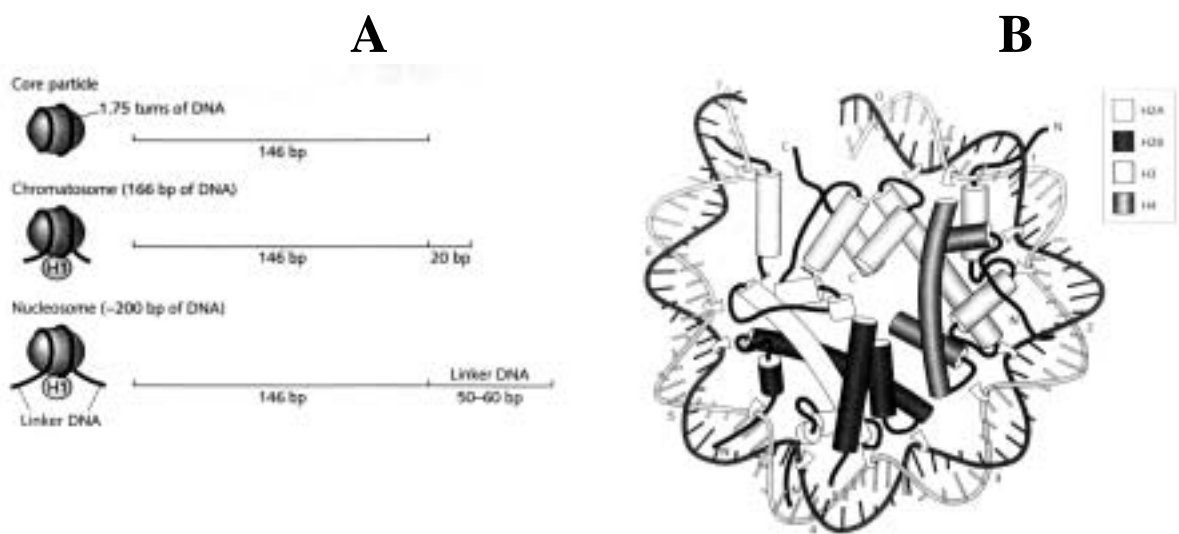


Figura 1.1.1 Estructura de la partícula núcleo, cromatosoma y nucleosoma (Sumner, 2003) (A). Estructura del nucleosoma a una resolución de 2.8 Å (Rhodes, 1997) (B).

La estructura del nucleosoma ha sido determinada a alta resolución, gracias a estudios realizados mediante cristalografía de rayos X (Luger *et al.*, 1997). La parte central de las moléculas de histona forman el núcleo del nucleosoma, mientras que las colas N y C terminales se extienden hacia fuera (ver figura 1.1.1B) (Rhodes, 1997). La unión entre el DNA y las histonas es de naturaleza electroestática entre los grupos cargados positivamente de las histonas y las cargas negativas de los fosfatos del DNA. De esta manera, al aumentar la fuerza iónica del medio podemos provocar la disociación de las histonas respecto al DNA (Burton *et al.*, 1978).

1.2 La fibra de cromatina

Mucha información acerca de la organización de orden superior de la cadena de nucleosomas se ha conseguido gracias a la visualización por microscopía electrónica de fragmentos de cromatina preparados bajo diferentes condiciones (Thoma *et al.*, 1979). Estas observaciones mostraron que a muy baja fuerza iónica (0.2 mM EDTA, 1 mM Trietanolamina-HCl) la cromatina aparecía como una cadena de nucleosomas en forma de zig-zag (ver también Woodcock *et al.*, 1993; Leuba *et al.*, 1994). Cuando se incrementaba la fuerza iónica hacia niveles más fisiológicos (aproximadamente 100 mM) el zig-zag de nucleosomas se condensaba formando una fibra irregular de 30 nm de diámetro. Esta fibra de 30 nm ha sido objeto de muchos estudios puesto que sus dimensiones y apariencia general son muy similares a las fibras observadas en cromatina obtenida a partir de núcleos interfásicos (Thoma *et al.*, 1979).

1.2.1 Dinámica de la cromatina

Es conocido que la cromatina participa activamente en un gran número de procesos celulares (e.g. transcripción y replicación), sin embargo, la función principal que se le atribuye es la del plegamiento del DNA.

Los primeros estudios sobre la importancia de las histonas de unión en la estructura de la fibra de 30 nm, revelaron que éstas tenían un papel esencial. Thoma y Koller (1981), vieron que la ausencia de solamente el 10% de las histonas H1/H5 impedía el plegamiento de la cromatina en la estructura condensada de 30 nm. Sin embargo, experimentos más recientes con *Tetrahynema*, demostraron que este organismo podía crecer normalmente con la ausencia total de las histonas de unión (Dasso *et al.*, 1994; Wolffe *et al.*, 1997). A pesar de esta observación, se pudo apreciar que el tamaño del núcleo se incrementaba dos veces. Este incremento en el tamaño sugiere una menor compactación de la cromatina debido a la ausencia de las histonas de unión. Por tanto, parece ser que las fibras de cromatina formadas sin la presencia de histonas de unión no presentan la misma estructura que las fibras de cromatina nativas. Este hecho viene confirmado por estudios realizados en nuestro laboratorio (Bartolomé, 1994), en los cuales fibras de cromatina sin histonas H1 tienen un comportamiento diferencial en geles de agarosa no desnaturalizados en presencia de 1.7 mM de Mg^{2+} ,

respecto a las fibras nativas. Otro elemento clave estructural para la fibra de cromatina son las colas N y C terminales de las histonas. Experimentos realizados mediante digestiones enzimáticas han demostrado que la integridad de dichas colas es absolutamente esencial para la formación de la fibra de 30 nm (Fletcher y Hansen, 1996; Widom, 1998).

El proceso de compactación de la cromatina es dependiente de la concentración y de la naturaleza de los iones presentes en el medio. Así, se ha observado que la concentración de iones monovalentes necesarios para provocar el plegamiento de la cromatina es mayor que la de iones divalentes (Thoma *et al.*, 1979; Ausió *et al.*, 1984; Widom, 1989; Hansen, 2002). Este efecto forma parte de un fenómeno más amplio que implica que cuanto mayor es la valencia del ion, mayor es su capacidad estructurante, siendo menor la concentración necesaria para plegar la cromatina (Koch *et al.*, 1988). Utilizando estas observaciones y la teoría de los polielectrolitos de Manning (1978), Clark y Kimura (1990) realizaron un estudio que les permitió concluir que el plegamiento de la cromatina es un proceso de naturaleza electroestática. En este mismo sentido, Subirana (1992) postuló que el plegamiento de la cromatina podía ser producto de la neutralización de las cargas del DNA. Así, al aumentar la fuerza iónica, la fibra de cromatina se plegaría buscando la estructura con un mínimo de energía.

Sin embargo, los fenómenos de plegamiento-desplegamiento en la cromatina *in vivo* debidos a una variación en la fuerza iónica, deben de ser diferentes respecto a lo observado *in vitro*, puesto que las condiciones iónicas del núcleo celular son suficientemente elevadas como para que la cromatina se encuentre empaquetada en forma de fibra de 30 nm (Alberts *et al.*, 2002). En la célula, muchos de los fenómenos locales de condensación-descondensación se producen gracias a la unión de factores de transcripción u otras proteínas en secuencias específicas iniciando la desestructuración de una zona concreta del genoma (ver por ejemplo Adams y Workman, 1995; Tsukiyama *et al.*, 1995). Estas proteínas, incluso pueden modificar químicamente a las histonas mediante procesos de acetilación (Marsmorstein y Roth, 2001), metilación (Zhang y Rheinberg, 2001), fosforilación (Wolffe y Hayes, 1999), ubiquitinización y ribosilación, ayudando así a la desestabilización de la fibra de 30 nm.

La fuerza iónica también juega un papel fundamental en la estructura de la cromatina cuando se encuentra en su nivel más elevado de compactación. Diversos autores han trabajado con cromosomas metafásicos, sometidos a diferentes cambios de concentración iónica (Maniotis *et al.*, 1997; Bojanowski y Ingber, 1998; Poirier *et*

al., 2002). En estos experimentos se apreció como los cromosomas se condensaban y descondensaban de forma reversible, confirmando que las interacciones electroestáticas en la cromatina son esenciales en el mantenimiento de la estructura del cromosoma metafásico. En el interior de la célula eucariota existe una gran cantidad de iones (tabla 1.2.1) que con toda probabilidad tienen un papel crucial en estas interacciones electroestáticas, especialmente los iones monovalentes (Na^+ y K^+) y divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}). Strick *et al.* (2001) investigaron la distribución tridimensional de estos iones en la célula durante la interfase y la mitosis celular. Estos estudios realizados por microscopía iónica de barrido han mostrado que los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} son específicamente requeridos por la célula para la condensación de la cromatina en cromosomas mitóticos.

Tabla 1.2.1.

Composición iónica intracelular	
Componente	Concentración (mM)
Na^+	5-15 ^{a/b}
K^+	140 ^{a/b}
Mg^{2+} en núcleo interfásico	2-4 ^c
Mg^{2+} en cromosoma metafásico (1)	12-22 ^c
Ca^{2+} en núcleo interfásico	4-6 ^c
Ca^{2+} en cromosoma metafásico (2)	20-32 ^c
Cl^-	4-15 ^{a/b}
CO_3H^-	10 ^b
Fosfato	11 ^b
ATP	5-10 ^{b/c}

Se indican sólo las concentraciones de los principales iones intracelulares. Los datos mostrados en esta tabla se han obtenido de las siguientes referencias:

^a Alberts *et al.*, 2002.

^b Guyton y Hall, 2000.

^c Strick *et al.*, 2001. (1) La distribución del Mg^{2+} es homogénea en el conjunto del cromosoma; (2) El Ca^{2+} se encuentra localizado en el eje central de las cromátidas.

^d Nicholls y Ferguson, 2002.

1.2.1.1 Autoasociación de la cromatina

A diferencia de la enorme importancia de las histonas para conseguir un plegamiento correcto de la fibra de cromatina, la continuidad del DNA entre los diferentes nucleosomas no parece ser tan importante. Ruiz-Carrillo *et al.* (1980) observaron que la digestión de la cromatina con nucleasa micrococcal no afectaba a la estructura de la fibra. Este resultado indica que las interacciones histona-histona e histona-DNA son suficientes para mantener la estructura compacta de la cromatina. Evidencias a favor de la autoasociación de la cromatina han sido encontradas por diferentes grupos (Jorcano *et al.*, 1980; Pérez-Grau *et al.*, 1982). Más recientes son los trabajos de Bartolomé *et al.* (1994) en los cuales, mediante técnicas electroforéticas y de microscopía electrónica en condiciones estructurantes, se demostró que fragmentos de cromatina de 3-4 nucleosomas podían autoasociarse formando estructuras muy similares a las fibras nativas de cromatina.

Por otro lado, experimentos con microscopía de luz polarizada y con criomicroscopía electrónica han mostrado pruebas a favor del apilamiento de nucleosomas en columnas fuertemente empaquetadas formando hexámeros, en presencia de poliaminas y NaCl 100 mM (Leforestier *et al.*, 1999). También han sido observadas otras estructuras autoorganizadas en forma bicapas, bajo condiciones similares a las fisiológicas (Leforestier *et al.*, 2001). Presumiblemente estos resultados están directamente relacionados con otros trabajos previos procedentes de diferentes laboratorios que muestran que partículas núcleo aisladas tienen una fuerte tendencia para interactuar a través de sus caras formando arcos y hélices compactas (Finch *et al.*, 1977; Dubochet y Noll, 1978; Uberbacher y Bunich, 1985).

El apilamiento de partículas núcleo en estas estructuras podría ser debido a las interacciones electroestáticas entre las histonas del octámero. De hecho, los estudios por cristalografía de rayos X del nucleosoma (Luger *et al.*, 1997) han mostrado que las colas extendidas amino terminales de las histonas podrían interactuar entre sí entre nucleosomas adyacentes. A pesar de que las figuras autoasociadas observadas no se parecen a las fibras de cromatina nativas, algunos autores han sugerido que las interacciones cara-cara entre nucleosomas podrían ser la fuerza que llevara a la formación de estructuras de orden superior en la cromatina (ver por ejemplo Leforestier *et al.*, 2001).

1.2.2 Modelos estructurales

A diferencia de la fibra de cromatina no condensada, las imágenes de microscopía electrónica obtenidas de la cromatina plegada no permiten ver la colocación de los nucleosomas individuales, lo que hace muy difícil el estudio de su estructura (Widom, 1989; Woodcock y Horowitz, 1995; van Holde y Zlatanova, 1995, 1996). Este hecho ha propiciado la búsqueda de pruebas indirectas para determinar la colocación de los nucleosomas en la fibra de cromatina. A lo largo del tiempo, se han acumulado una gran cantidad de resultados experimentales que en muchos casos han conducido a interpretaciones contradictorias. El resultado ha sido la aparición de varios modelos estructurales.

1.2.2.1 Modelo de solenoide

Finch y Klug (1976), usando técnicas de microscopía electrónica de transmisión propusieron un modelo para la estructura de la fibra de 30 nm en la cual la cadena de mononucleosomas es compactada por enrollamiento en una estructura simple de solenoide. En este modelo habrían aproximadamente 6 nucleosomas por vuelta de hélice y un paso de rosca de 11 nm (equivalente al diámetro de un nucleosoma) (ver figura 1.2.1A). Este paso de rosca se estableció gracias a la observación en microscopía electrónica de estrías transversales separadas por 11 nm. Posteriormente, en estudios de difracción de rayos X de fibras de cromatina parcialmente orientadas (Widom y Klug, 1985) se encontraron una mancha meridional correspondiente a un espaciado de 11 nm que sugería la colocación radial de los nucleosomas con su eje de simetría perpendicular al eje de la fibra e inclinados entre 20 y 30°. Otros autores, a partir de estudios de dispersión de neutrones (Suau *et al.*, 1979) y de dicroísmo eléctrico (Yabuki *et al.*, 1982; McGhee *et al.*, 1983) han dado soporte al modelo solenoidal. En el modelo de solenoide, para construir la hélice sencilla de nucleosomas, hace falta que el DNA de unión entre nucleosomas se pliegue.

1.2.2.2 Modelo de superbead

En este modelo, los autores propusieron un plegamiento de la cromatina en el cual se formaban agrupaciones discontinuas de nucleosomas llamados superbolas

(superbeads). Este modelo se planteó a partir de la observación en microscopio electrónico de partículas esféricas con 12 nucleosomas por partícula y el mismo diámetro que la fibra de 30 nm en muestras de cromatina digeridas con nucleasa micrococcal (Kiryanov *et al.*, 1976; Franke *et al.*, 1976).

1.2.2.3 Modelos helicoidales de doble origen

Son modelos en los cuales se propone que la fibra de cromatina se pliega helicoidalmente a partir del zigzag de nucleosomas observado a baja fuerza iónica.

Woodcock *et al.* (1984), basándose en este tipo de modelo, propusieron que el zigzag de nucleosomas se condensaría helicoidalmente formando una doble hélice en la que el DNA de unión quedaría paralelo al eje de la fibra. Cada vuelta de la hélice estaría formado por 18 nucleosomas, la fibra tendría 30 nm de diámetro y un agujero central de 8 nm (ver figura 1.2.1B). Este modelo, llamado de cinta helicoidal, es más compacto que otros modelos, ya que presenta 11.6 nucleosomas por cada 11 nm en vez de los 6 nucleosomas por 11 nm del modelo solenoide. Diversos autores han aportado datos a favor de este tipo de modelo (ver revisión crítica realizada por Woodcock y Dimitrov, 2001).

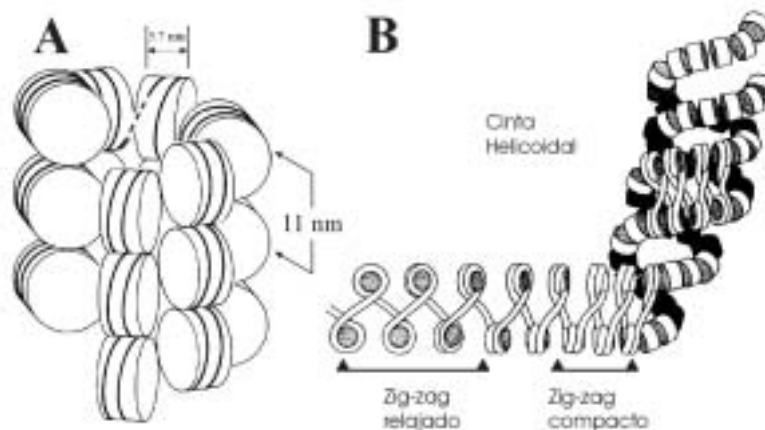


Figura 1.2.1 Modelo solenooidal de la cromatina (A). (Figura adaptada de Widom y Klug, 1985). Modelo de la cinta helicoidal (B). (Figura adaptada de Woodcock *et al.*, 1984).

Otra variante de los modelos helicoidales es el propuesto por Williams *et al.* (1986) a partir de observaciones en las cuales el diámetro de las fibras plegadas aumentaba al aumentar la longitud del DNA de unión (Williams y Langmore, 1991). En este modelo el zigzag de nucleosomas se empaquetaría sobre su propio eje formando una doble hélice con un paso de rosca de 26 nm y con un número de nucleosomas por vuelta que dependería de la longitud del DNA de unión (Smith *et al.*, 1990). Los nucleosomas están conectados por el DNA de unión, que atravesaría la fibra por el interior, de forma rectilínea con una trayectoria perpendicular respecto al eje de la fibra.

1.2.3 Modelo de solenoide interdigitado compacto

Nuestro grupo de investigación también ha sugerido un tipo de modelo para el plegamiento de la cromatina en fibras de 30 nm. Los resultados que han permitido sugerir este modelo se han obtenido a partir de estudios de electroforesis no desnaturalizante en geles de agarosa y de microscopía electrónica (Bartolomé *et al.*, 1995; Daban y Bermúdez, 1998).

1.2.3.1 Electroforesis de cromatina en geles no desnaturalizantes de agarosa en presencia de $MgCl_2$ 1.7 mM

Este tipo de electroforesis se ha utilizado por nuestro grupo para el estudio de la estructura de la cromatina. Concretamente se ha podido constatar que al analizar fragmentos de cromatina de eritrocitos de pollo de un tamaño de 6-50 nucleosomas se produce una banda bien definida. Esta banda tiene prácticamente la misma movilidad independientemente del peso molecular del fragmento. Este comportamiento no se observa en geles con fuerzas iónicas más bajas. Cuando se analizaba la movilidad de los fragmentos de entre 3-6 nucleosomas, se podían ver dos tipos de comportamiento electroforético. Los fragmentos de 3-6 nucleosomas daban una banda amplia y de movilidad electroforética creciente al disminuir el peso molecular, pero también se producía la típica banda de los fragmentos de cromatina de tamaño molecular más grande (a partir de ahora referida como banda retardada).

Cuando se analizó el contenido en histonas de estos fragmentos de 3-6 nucleosomas, se vio que los fragmentos que daban lugar a la banda retardada tenían un contenido típico en histonas de unión (H1-H5), mientras que los fragmentos que daban

lugar a las otras bandas de movilidad superior tenían un bajo contenido de este tipo de histonas (Bartolomé *et al.*, 1995) (ver figura 1.2.2).

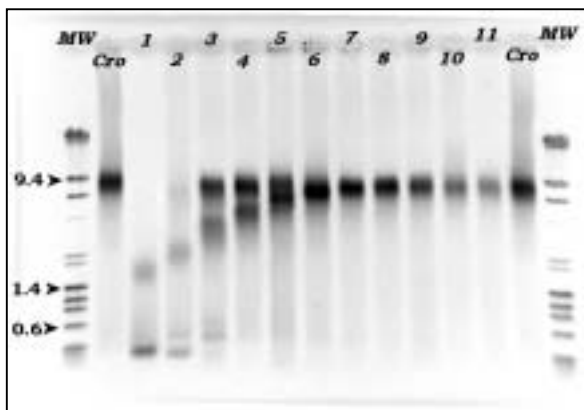


Figura 1.2.2 Electroforesis de agarosa al 0.5% (p/v) en tampón Tris 90 mM, Borato 90 mM con Mg^{2+} 1.7 mM. La muestra cargada es una distribución de fragmentos de cromatina de 1 a 11 nucleosomas (Cro) que se separaron en fracciones utilizando un aparato Prep Cell 491 de Bio-Rad Laboratories. Los pesos moleculares de los marcadores señalados están indicados en kb (figura extraída de Martin, 1999).

1.2.3.2 Análisis de las fibras de cromatina por microscopía electrónica

La cromatina extraída de la banda retrasada del gel de agarosa en presencia de $MgCl_2$ 1.7 mM, entrecruzada con glutaraldehído y platinada en rotación en un ángulo de 7° , cuando era observada por microscopía electrónica, daba lugar a estructuras circulares con una mayor acumulación de platino en la periferia que en el centro (Bartolomé *et al.*, 1995). Estas estructuras circulares tienen un diámetro constante (aproximadamente de unos 33 nm) para fragmentos de cromatina entre 10 y 36 nucleosomas. La altura de estas estructuras (medida cuando la platinación era unidireccional) aumentaba al aumentar el número de nucleosomas.

Por tanto, estos resultados indican que se trata de estructuras cilíndricas que se colocan verticalmente sobre la rejilla del microscopio. En las imágenes obtenidas, también se observan otros elementos estructurales:

- 1) Una periferia helicoidal.
- 2) Un anillo de 11 nm de grosor con una serie de barras radiales (aproximadamente seis) que podrían corresponder a nucleosomas.
- 3) Un agujero central de 7-12 nm.

En estudios de desnaturalización parcial (Bermúdez *et al.*, 1998) se consiguió generar lazos de DNA con longitudes correspondientes a 1, 2 o 3 nucleosomas consecutivos desnaturalizados que salían radialmente de las fibras, hecho que demuestra

una distribución radial de los nucleosomas. Otro punto que apoya la distribución radial de los nucleosomas es la observación de que los puntos de entrada y salida del DNA de los lazos correspondientes a dos nucleosomas consecutivos desnaturalizados están relativamente cercanos. Esta observación sugiere que los nucleosomas consecutivos no están en posiciones opuestas respecto al eje de la fibra.

Por lo que se refiere a los fragmentos de cromatina entre 3-6 nucleosomas que presentan dos tipos diferentes de comportamiento electroforético, se ha visto que los que generan la banda retardada (es decir, los que tienen un contenido normal de histonas de unión) también forman estas típicas estructuras circulares compactas. Por el contrario, la banda rápida no forma estas estructuras. Esto demuestra que los nucleosomas poseen las propiedades necesarias para formar estructuras plegadas tan estables que no requieren de la continuidad del DNA. Todas estas características estructurales son consistentes con el modelo solenoidal pero las alturas medidas de las fibras indican un grado de compactación mayor.

1.2.3.3 Modelo de solenoide propuesto por nuestro grupo

El conjunto de todos estos resultados ha permitido sugerir una familia de modelos estructurales para el plegamiento de las fibras de cromatina de eritrocito de pollo en presencia de $MgCl_2$ 1.7 mM.

Este tipo de modelos solenoidales empiezan con la formación de una hélice primaria, formada por un número de nucleosomas por vuelta no entero e igual o inferior a seis nucleosomas. La sucesiva formación de hélices primarias provoca la interdigitación de los diferentes pisos, formando hélices secundarias, las cuales están estabilizadas gracias a los contactos laterales entre las caras de los nucleosomas. El sentido del giro de las hélices secundarias es el mismo que en las hélices primarias (ver figura 1.2.3). La tendencia de los nucleosomas a interactuar lateralmente formando arcos y hélices ya ha sido descrita por otros laboratorios (recordar sección 1.2.1.1). El hecho que las hélices primarias se intercalen entre si formando hélices secundarias, provoca una mayor compactación de la fibra respecto a otros modelos solenoidales típicos. Concretamente, el modelo de solenoide estándar produce una reducción de la longitud del DNA de 40 veces, mientras que en nuestro modelo, la reducción es de 90 veces (Daban y Bermúdez, 1998).

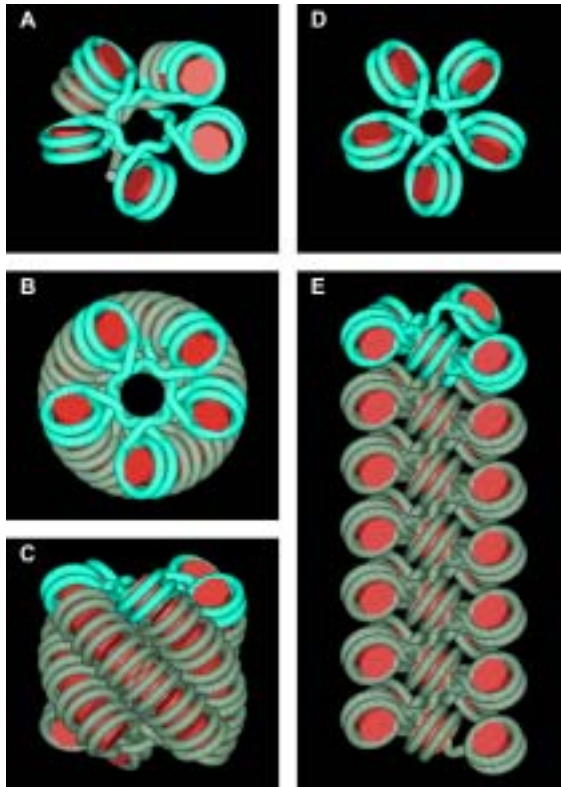


Figura 1.2.3 Modelo de solenoide interdigitado compacto (C) comparado con el modelo del solenoide normal (E). En ambos esquemas se representa la distribución de 35 nucleosomas con 4.74 nucleosomas por vuelta en el solenoide interdigitado y 5 en el solenoide normal. También se muestra la visión zenital (B y D) de las estructuras C y E. A muestra la primera vuelta completa de la hélice primaria y parte de la segunda vuelta. (Figura de Daban y Bermúdez, 1998).

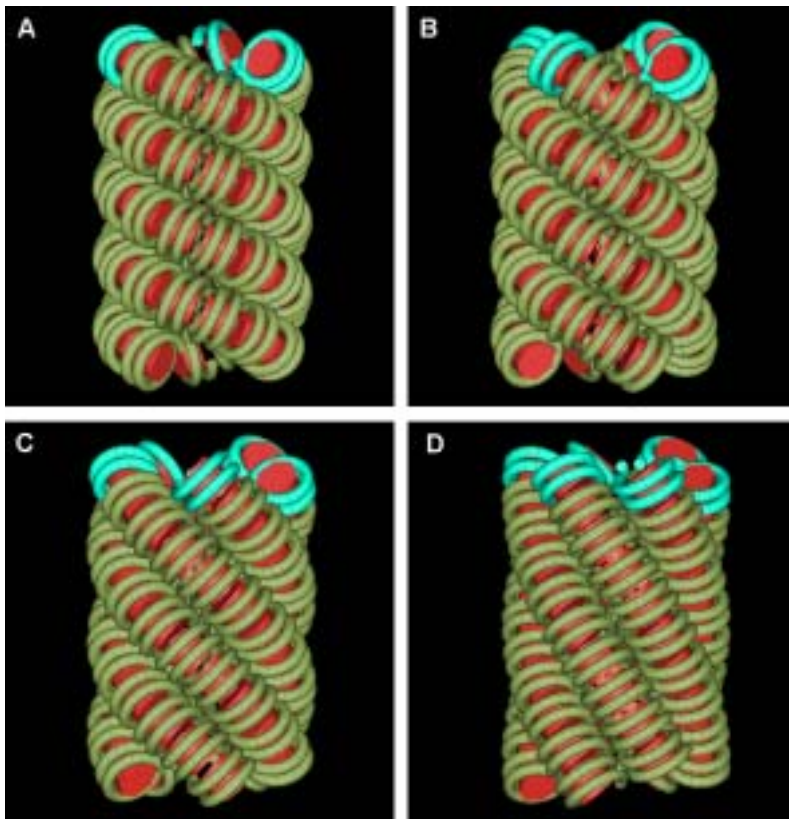


Figura 1.2.4 Familia de modelos del solenoide interdigitado compacto. (A) Fibra de 2.8 nucleosomas por vuelta, 2.35 nm de paso de rosca y con una orientación de sus nucleosomas con respecto al eje de 20° . En (B), (C) y (D) el número de nucleosomas por vuelta es de 3.76, 4.76 y 5.77, el paso de rosca de 3.08, 3.84 y 4.73 nm, y la orientación de 29, 40 y 52° respectivamente. (Figura de Daban y Bermúdez, 1998).

Los diferentes modelos del solenoide interdigitado compacto se diferencian entre sí por el número de nucleosomas en cada vuelta de hélice primaria (ver figura 1.2.4). En todos los casos el diámetro externo de las fibras es de 36 nm. En estos modelos se desconoce la trayectoria del DNA de unión, pero en el caso de eritrocito de pollo (60-64pb) se podría situar en el espacio dejado por el agujero central, sin ningún tipo de impedimento estérico. Esta familia de modelos es válida tanto para hélices dextrógiras como levógiras. De hecho, al observar las fibras por microscopía electrónica, se ha visto que ambos tipos de hélices coexisten (Daban y Bermúdez, 1998).

1.3 El cromosoma

1.3.1 Ciclo celular y mitosis

Las células se reproducen duplicando su contenido y luego dividiéndose en dos. El ciclo de división celular es el medio fundamental a través del cual todos los seres vivos se propagan. En especies unicelulares como las bacterias y levaduras, cada división de la célula produce un nuevo organismo. En especies pluricelulares se requieren muchas secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo organismo. Este proceso también es necesario en el cuerpo adulto para remplazar las células perdidas por desgaste, deterioro o por muerte programada. Los detalles del ciclo de división celular pueden variar, pero existen algunos requerimientos universales. Lo primero y principal para que se produzcan dos células hijas genéticamente idénticas es que el DNA se replique exactamente y que los cromosomas replicados se segreguen en dos células distintas (Alberts *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, el ciclo de división celular o ciclo celular se divide en cuatro partes: La *fase S* es el periodo del ciclo donde se da la replicación del DNA del núcleo. La *fase M* o *mitosis* es el proceso por el cual se da la división nuclear y finalmente la división de la célula. El intervalo entre la consumación de la mitosis y el comienzo de la síntesis del DNA se llama *fase G1* y el intervalo entre el final de la síntesis del DNA y el principio de la mitosis se denomina *fase G2*.

En la mayoría de las células, toda la fase M solo dura una hora aproximadamente, lo cual es solo una pequeña fracción de la duración total del ciclo. El

periodo que transcurre entre una fase M y la siguiente es mucho más largo (suma de las fases G₁, S y G₂) y se conoce como la *interfase* (ver figura 1.3.1). En este intervalo la célula tiene una gran actividad, aumentando de tamaño y preparándose para la división celular. Durante este periodo la estructura del cromosoma está posiblemente a nivel de fibra de cromatina (ver sección 1.2), hecho que permitirá la correcta regulación de los procesos de transcripción, replicación y recombinación que se dan durante la interfase (Widom, 1997).

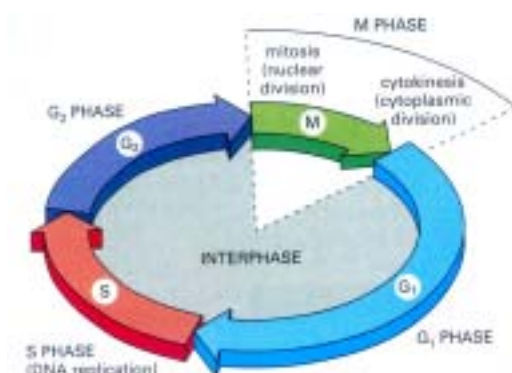


Figura 1.3.1 Fases del ciclo celular (figura adaptada de Alberts *et al.*, 2002).

Clásicamente la mitosis se ha dividido en seis partes: Profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.

En la *Profase* la cromatina se condensa lentamente formando cromosomas bien definidos, cuyo número exacto es característico de la especie en cuestión. Cada cromosoma se ha duplicado durante la fase S precedente y ahora consta de dos cromátidas hermanas. Cada una de las cromátidas contiene una secuencia de DNA específica conocida como centrómero, necesaria para la correcta segregación del cromosoma. Hacia el final de la profase empieza a formarse el huso mitótico.

La *Prometafase* se inicia bruscamente con la desintegración de la envoltura nuclear, la cual se rompe formando vesículas membranosas. Los microtúbulos del huso, que hasta el momento se hallaban fuera del núcleo, ahora pueden entrar en la región nuclear. Simultáneamente los cromosomas continúan condensándose y en cada centrómero aparecen unos complejos proteicos llamados cinetocoros. Parte de los microtúbulos del huso se unirán a estas estructuras proteicas, con la finalidad de mover los cromosomas hacia el centro de la célula.

En la *Metafase* los cromosomas llegan a su máximo grado de compactación, mientras son alineados por los microtúbulos cinetocóricos en un plano situado en la mitad de la célula.

La *Anafase* empieza cuando los cinetocoros apareados de cada cromosoma se separan, permitiendo que cada cromátida (ahora denominada cromosoma) sea arrastrada hacia un extremo de la célula.

En la *Telofase*, los cromosomas llegan a los polos de la célula y la envoltura nuclear reaparece de nuevo. Entonces la cromatina condensada vuelve a expandirse.

Finalmente, en la *Citocinesis*, la célula se divide en dos nuevas células, cada una de las cuales tendrá un número idéntico de cromosomas procedentes de la célula madre.

1.3.2 Modelos estructurales propuestos para el cromosoma metafásico

Durante la mitosis, la formación de cromosomas metafásicos requiere la compactación del DNA en niveles superiores de empaquetamiento. Concretamente, la longitud del DNA en el interior del cromosoma metafásico se encuentra reducida en un factor de 10^4 . Cada cromosoma contiene aproximadamente la misma proporción de DNA, histonas y no histonas. Debido a las interacciones entre las histonas y el DNA, este último se compacta sobre su longitud aproximadamente 40 veces para formar la fibra de cromatina (Earnshaw, 1988). El mecanismo por el cual esta fibra de cromatina se empaqueta las siguientes 250 veces hasta llegar al nivel máximo de compactación durante la formación del cromosoma metafásico, ha sido objeto de muchos estudios.

Se han propuesto diferentes modelos para explicar la condensación de la cromatina en cromosomas. Resultados obtenidos a partir de difracción de rayos X y microscopía electrónica sugieren que la fibra de 30-40 nm es la unidad básica en el plegamiento de la cromatina para formar cromosomas (ver por ejemplo Sedat y Manuelidis, 1978; Rattner y Lin, 1985). A partir de este punto, los diferentes modelos se diversifican en sus propuestas para justificar el empaquetamiento de las fibras de 30-40 nm hasta su máxima condensación.

Tradicionalmente los modelos se han dividido en dos grandes corrientes. La primera corriente sugiere una organización de la fibra de cromatina en forma de lazos, los cuales estarían radialmente unidos a un eje proteico en el interior de cada cromátida (Paulson y Laemmli, 1977). La segunda corriente propone un plegamiento helicoidal sucesivo de la fibra de 30-40 nm hasta formar la cromátida metafásica. (Sedat y Manuelidis, 1978).

1.3.2.1 Modelos basados en lazos de la fibra de cromatina anclados a un eje proteico

En esta corriente la formación de lazos a partir de la fibra de cromatina sería la unidad base a partir de la cual se daría el plegamiento. Estos lazos contendrían entre 50 y 100 kb de DNA y formarían fibras gruesas de 250 nm. En este modelo los lazos de DNA estarían anclados en un esqueleto proteico. Finalmente, la fibra de 200-300 nm acabaría plegándose helicoidalmente hasta formar las cromátidas metafásicas. Dentro de esta corriente destacaría sobretodo, el modelo clásico de Laemmli y colaboradores (Paulson y Laemmli, 1977; Boy de la Tour y Laemmli, 1988; Saitoh y Laemmli, 1994) basado en la visualización al microscopio electrónico de fibras de cromatina formando lazos alrededor de un cuerpo cromosómico rico en proteínas (figura 1.3.2). Según este modelo, la fibra de cromatina se une al eje proteico por regiones de DNA concretas ricas en los pares de bases A+T (SARs), que interaccionan específicamente con la topoisomerasa II, proteína mayoritaria del esqueleto proteico (revisado en Saitoh y Laemmli, 1993). Este modelo basado en un eje central proteico se ha visto reforzado gracias a los trabajos más recientes de este grupo. Maeshima y Laemmli (2003), mediante técnicas de inmunofluorescencia han mostrado la presencia de la topoisomerasa II y de la condensina (uno de los complejos proteicos mas abundantes del cromosoma, ver más adelante sección 1.3.4.3) localizados radialmente a lo largo del eje central de ambas cromátidas metafásicas.

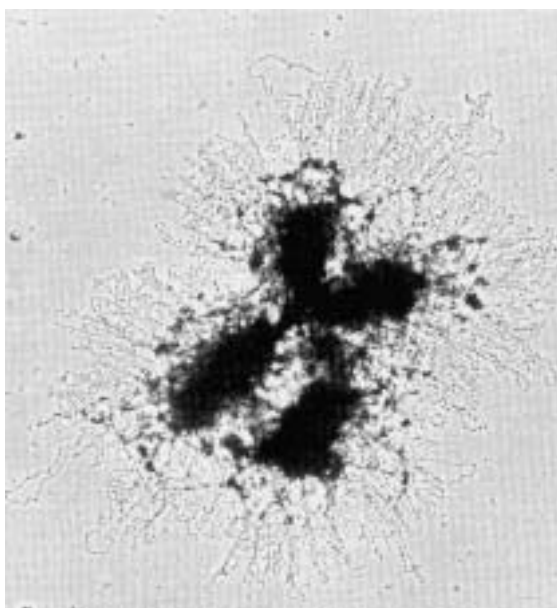


Figura 1.3.2 Micrografía electrónica de un cromosoma metafásico, mostrando lazos de cromatina que protuberan a partir de un eje proteico cromosómico (Earnshaw y Laemmli, 1983).

Otro modelo interesante dentro de esta corriente sería el de minibandas de Pienta y Coffy (1984). En este caso, en base a un estudio de la organización del DNA y su interacción con la matriz nuclear en el cromosoma IV humano, se sugirió que 18 lazos de 60 kb podrían distribuirse radialmente alrededor del esqueleto proteico, constituyendo una nueva unidad estructural, que los autores denominaron minibanda. 106 de estas minibandas ordenadas radialmente constituirían la cromátida de dicho cromosoma (ver figura 1.3.3).

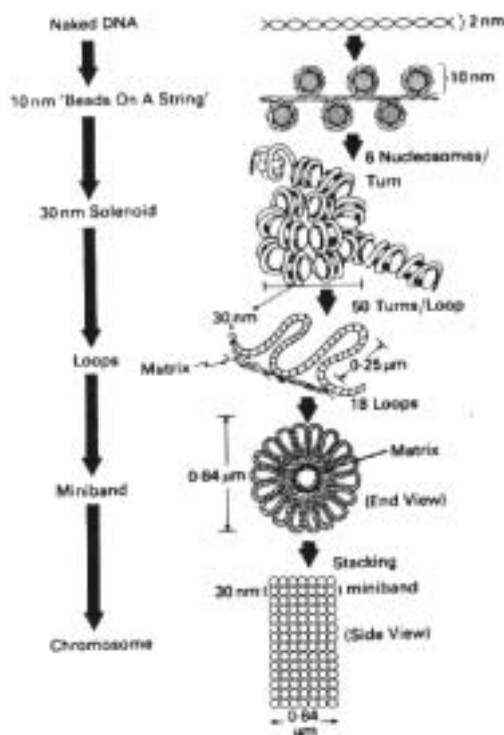


Figura 1.3.3 Diagrama esquemático de la condensación del DNA hasta llegar al cromosoma metafásico, según el modelo propuesto por Pienta y Coffey (1984).

La evidencia de que la fibra de cromatina se organiza en forma de lazos anclados a un eje proteico central ha venido a partir de diferentes aproximaciones experimentales. Por ejemplo, observaciones al microscopio electrónico de los cromosomas *lampbrush* en oocitos de anfibio, muestran claramente una sucesión de lazos emergiendo de un eje central cromosómico (Callan, 1986).

Benyajati y Worcel (1976) realizaron una serie de digestiones con DNasa I en cromosomas interfásicos de *Drosophila*. Al analizar el tamaño de los fragmentos obtenidos, vieron que en su mayoría eran de unas 85 kb de DNA unido a proteína. Esto sugirió que la fibra de cromatina estaba organizada en dominios de unos 100 kb de DNA.

Las evidencias más importantes han venido a través del estudio de cromosomas por microscopía electrónica. En estos estudios, a partir de cromosomas desprovistos de

histonas por tratamiento a altas concentraciones salinas, se pudo estimar el tamaño de los lazos entre 40 y 90 kb de DNA (Paulson y Laemmli, 1977).

Otros experimentos han utilizado la presencia de nucleasas endógenas de baja especificidad, cuya activación se puede dar bajo condiciones controladas (añadiendo Ca^{2+} o Mg^{2+} en el núcleo), para digerir la cromatina. Para poder interpretar estos trabajos fue imprescindible el desarrollo de la técnica de la electroforesis en campo pulsante (Schwartz y Cantor, 1984). Se observaron sitios de corte separados entre sí por 50-300 kb (Filipski *et al.*, 1990). Estos resultados fueron corroborados por una segunda aproximación experimental, en la cual se utilizaron inhibidores de la topoisomerasa II. Esta enzima introduce roturas en el DNA doble cadena que pueden ser estabilizadas mediante inhibidores.

Un análisis más detenido de los fragmentos obtenidos en ambos experimentos, reveló que los intermediarios de 300 kb se producían anteriormente a los de 50 kb. Esto sugiere que los fragmentos de 50 kb corresponderían al primer nivel de organización de la fibra de cromatina en lazos, mientras que los fragmentos de 300 kb representarían el siguiente nivel de organización (Filipski *et al.*, 1990).

Todos estos trabajos parecen indicar que el primer nivel de organización de la fibra de cromatina sería en forma de largos e independientes lazos de entre 50 y 100 kb de DNA, los cuales estarían unidos a un esqueleto proteico.

Pese a recibir muchas críticas (en especial la presencia de un eje proteico central) esta corriente es la más aceptada por la bibliografía (ver por ejemplo Sumner, 2003 o Alberts *et al.*, 2002).

1.3.2.2 Modelos basados en diferentes grados de plegamiento helicoidal

En la segunda corriente los modelos propuestos también parten de la fibra de 30 nm como unidad básica de plegamiento. En estos modelos la fibra de 30 nm no formaría lazos ni estaría anclada en ningún eje proteico y gracias a un plegamiento helicoidal darían a lugar al siguiente elemento estructural: la fibra de 150-300 nm. Una vez formadas estas fibras, también se condensarían helicoidalmente hasta formar la cromátida metafásica (ver por ejemplo Bak *et al.*, 1977).

Ya en 1965, Ohnuki pudo observar a través del microscopio óptico, que en ciertas condiciones los cromosomas claramente adoptaban una forma helicoidal. Sin embargo, la primeras evidencias claras a favor de esta segunda corriente vinieron a

partir de la obtención de imágenes mediante diferentes técnicas de microscopía óptica y electrónica (Sedat y Manuelidis, 1978). Estos autores mostraron la existencia de tubos de 200 nm plegados helicoidalmente, que a su vez se volvían a plegar para formar cromátidas de 600 nm. Más tarde, este grupo examinó cromosomas mitóticos de *Drosophila*, observando una jerarquía en los patrones de plegamiento de la fibra de 30 nm en estructuras de orden superior. Se pudo observar claramente intermediarios de 50, 100 y 130 nm de diámetro. Aunque en ciertas circunstancias algunas fibras de 30-50 nm de diámetro fueron detectadas en forma de lazos, aparentemente no se encontró ninguna evidencia a favor de un eje central proteico (Belmont *et al.*, 1987, 1989). Estos resultados han sido observados también en células de mamíferos (Belmont y Bruce, 1994).

Uno de los primeros modelos de esta corriente, sería el formulado por Taniguchi y Takayama en 1986. Estos dos autores observaron a partir de cromosomas de hámster chino y por microscopía electrónica de barrido, fibras de 200 nm unidas perpendicularmente al eje cromosómico. Esto les valió para proponer un modelo en el cual la fibra de 30 nm se pliega helicoidalmente para formar la fibra de 200 nm, la cual a su vez vuelve a plegarse helicoidalmente para formar la cromátida del cromosoma metafásico (ver figura 1.3.4).

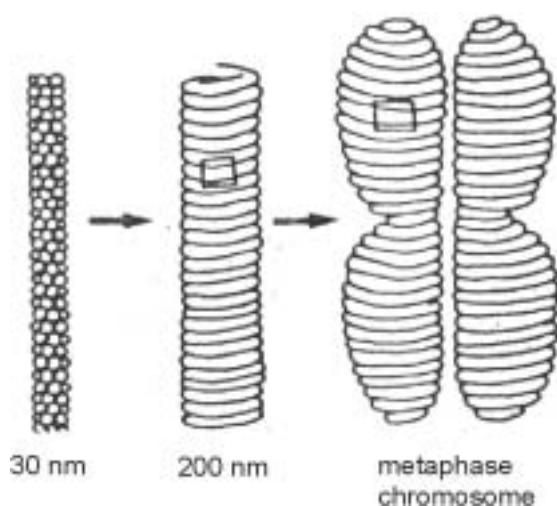


Figura 1.3.4 Modelo de la estructuración de la cromatina para la formación de los cromosomas metafásicos propuesto por Taniguchi y Takayama (1986).

Una herramienta muy eficaz para el estudio de la estructura del cromosoma, ha sido la utilización del microscopio de fluorescencia. En los últimos años la proteína de fluorescencia verde (GFP) ha revolucionado este tipo de microscopía. Para poder estudiar el plegamiento del cromosoma, se introdujo en cada uno de éstos, repeticiones

(256) del operón lac. Este segmento de DNA (10.1 kb) puede ser detectado utilizando una fusión de la proteína represora del operón lac con una GFP (Robinett *et al.*, 1996). En el momento en que la GFP puede ser detectada *in vivo* en el interior del cromosoma, entonces es posible seguir la dinámica de condensación cromosómica directamente bajo condiciones fisiológicas.

Esta técnica ha permitido observar la presencia de fibras de aproximadamente 150 nm durante las últimas fases de la formación del cromosoma metafásico. También se ha podido observar que el patrón de condensación de estas fibras era inconsistente con la presencia de un hipotético eje proteico (Dietzel y Belmont, 2001). Utilizando estos mismos métodos, en experimentos más recientes, se ha conseguido introducir en cromosomas de ovarios de hámster chino, secuencias con alto contenido de regiones AT unidas al operón Lac (Strukov *et al.*, 2003). La presencia de estas zonas ricas en secuencias SARS (ver sección 1.3.2.1) no alteró el patrón de plegamiento ni la estructura de los cromosomas modificados tal y como sería de prever si los cromosomas siguieran el modelo de plegamiento planteado por Laemmli y colaboradores (sección 1.3.2.1). En este mismo trabajo también se pudo observar la formación de intermediarios de 250 nm de diámetro que se condensaban de forma helicoidal.

También se han realizado experimentos con topoisomerasa II fusionada con GFP. Estos trabajos han dado resultados contradictorios. Tavormina *et al.* (2002) a partir de células a las cuales se substituyó la topoisomerasa II endógena por topoisomerasa II fusionada a GFP pudo comprobar que esta proteína se encontraba mayoritariamente distribuida en un eje lineal a lo largo de los brazos cromosómicos. Por otro lado, Christensen *et al.* (2002) en estudios similares en topoisomerasa II α y β fusionadas con GFP, pudo constatar que la isoforma α se encuentra unida al cromosoma metafásico de manera uniforme sin formar ningún eje, mientras que la isoforma β solo se encuentra durante el periodo interfásico.

Sin embargo, en estos dos artículos, también se estudió la dinámica de la topoisomerasa II durante el ciclo celular y ambos trabajos han coincidido que esta dinámica, durante la metafase, es demasiado rápida como para considerar la topoisomerasa II como un componente estructural inamovible en un hipotético eje central proteico.

Todos estos resultados no son contrarios con la existencia de una serie de proteínas no histona en las cuales se anclarían los lazos de la fibra de cromatina u otro

tipo de dominio estructural cromatínico. No obstante, sí son contrarios con la idea de que estas proteínas formen un eje central ininterrumpido. A favor de este concepto estarían una serie de experimentos con inmunofluorescencia en los cuales anticuerpos contra la topoisomerasa II estaban distribuidos en dominios separados entre sí por 120-200 nm (Di Nardo *et al.*, 1984) (ver sin embargo el trabajo de Maeshima y Laemmli, 2003, comentado en la sección 1.3.2.1).

1.3.2.3 Nuevos modelos

1.3.2.3.1 Modelos de plegamiento a través de cromómeros. Muchos estudios sobre la estructura del cromosoma mitótico han sido hechos por técnicas de microscopía electrónica. Estas técnicas tienen la ventaja de tener un poder de resolución lo suficientemente elevado como para poder observar los elementos estructurales de los cuales se compone el cromosoma. Desgraciadamente, no está muy claro si las estructuras vistas por microscopía electrónica son representativas de la estructura del cromosoma mitótico *in vivo*. La microscopía electrónica requiere una elaborada preparación de las muestras que implica la fijación, deshidratación y tinción de los cromosomas para poder ser observados al vacío. Sin embargo en los últimos años han aparecido nuevos tipos de microscopio, como por ejemplo el microscopio de fuerza de barrido. Este tipo de microscopía ha permitido obtener imágenes de cromosomas intactos en soluciones líquidas sin ningún paso previo de fijación, deshidratación ni tinción. Estas imágenes han revelado la existencia de una superficie en forma de gránulos de 200 nm de diámetro sobre cromosomas premetafásicos (Schaper *et al.*, 2000).

Anteriormente, gracias a la reconstrucción tridimensional de una serie de micrografías de cromosomas humanos, ya se había observado la existencia de estructuras de 200 nm de diámetro en las cuales había empaquetados diversos lazos de la fibra de cromatina de forma desorientada (Borland *et al.*, 1988). Estructuras similares también han sido descritas durante el proceso de condensación de la cromatina en núcleos profásicos tempranos (El-Alfy *et al.*, 1994). Todos estos datos han planteado la posibilidad de que el cromosoma metafásico llegue a su máxima condensación a través de la formación de estos nuevos elementos estructurales, llamados cromómeros.

Así por ejemplo, Cook (1995) plantea un modelo en el cual los lazos de la fibra de cromatina formarían radios a partir de factorías de transcripción, las cuales estarían

agrupadas en forma de cromómeros. Éstos, a su vez, se fusionarían entre si constituyendo un eje irregular central que sería la base de una cromátida cilíndrica. Este modelo, no obstante, tiene algunas objeciones. Sus detractores opinan que si el eje cromosómico está formado por factores de transcripción, entonces deberíamos encontrar gran cantidad de RNA polimerasa. Esta enzima, sin embargo, no se encuentra apenas presente en cromosomas mitóticos (Sumner, 2003).

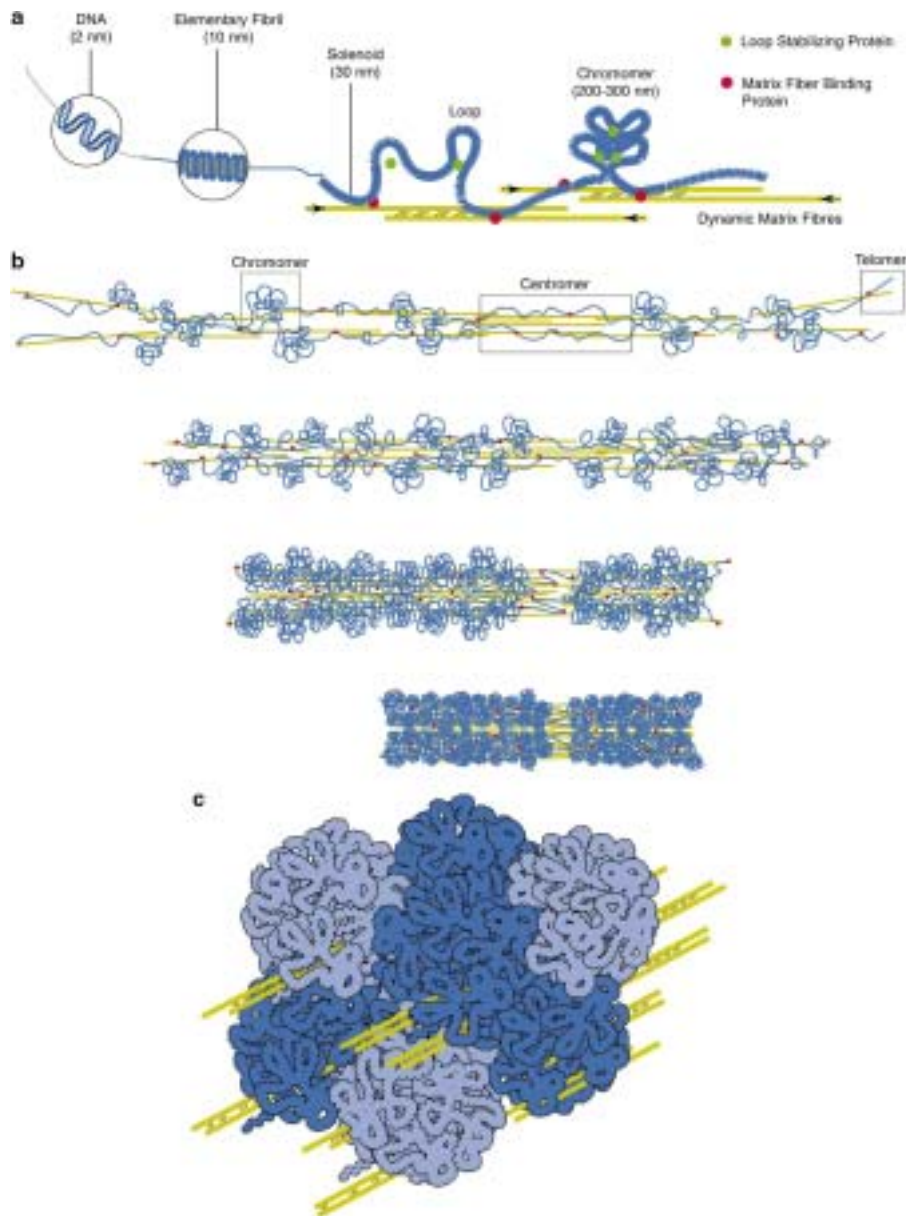


Figura 1.3.5 Mecanismo de compactación de la cromatina en el cromosoma metafásico propuesto por Wanner y Formanek (2000) (a y b). Agrupaciones de unos 50 lazos formarían un cromómero de 200 nm de diámetro (c).

Un modelo más consistente es el propuesto por Wanner y Formanek (2000). Estos autores, basados en estudios de microscopía de barrido de alta resolución en combinación con tinciones diferenciales de DNA y proteína, proponen que el cromosoma metafásico estaría principalmente compuesto de DNA empaquetado en estructuras de 200 nm (cromómeros) y de una matriz dinámica formada por fibras paralelas de proteína. En este modelo la condensación del DNA formaría la fibrilla elemental de 10 nm (cadena de nucleosomas) la cual se plegaría de forma solenoidal para formar la fibra de 30 nm. Esta fibra se uniría en forma de lazos a la matriz de fibras proteicas mediante proteínas de unión. Durante la condensación de la matriz, se formarían los cromómeros gracias a proteínas que estabilizarían los lazos de la fibra de 30 nm (ver figura 1.3.5a). La compactación del cromosoma empezaría en el centrómero y finalizaría en los telómeros. Durante esta compactación el cromosoma se volvería muy corto y grueso a medida que se fueran formando los cromómeros (figura 1.3.5b).

1.3.2.3.2 Modelo de estructura reticular. Una prometedora aproximación para el estudio de la estructura de los cromosomas ha sido el desarrollo de técnicas biofísicas capaces de cuantificar las propiedades elásticas de los cromosomas (Houchmandzadeh *et al.*, 1997). Concretamente, estos métodos combinados con técnicas de micromanipulación, han permitido aplicar una tensión constante sobre cromosomas individuales. De esta manera ha sido posible monitorizar los posibles cambios en la estructura de los cromosomas cuando estos se ven sometidos a diferentes condiciones.

Poirier *et al.* (2002) utilizando estos métodos observaron que los cromosomas se podían hipercondensar y descondensar rápidamente y de forma reversible variando únicamente las condiciones iónicas. Estos resultados indican que las interacciones electrostáticas de la cromatina en el interior de la cromátida mitótica juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura del cromosoma mitótico (ver también Maniotis *et al.*, 1997; Bojanowski y Ingber, 1998).

Este grupo de investigadores realizó a continuación nuevos estudios con la misma metodología en la que se sometió a cromosomas de tritón a digestiones con nucleasa micrococcal y enzimas de restricción (Poirier y Marko, 2002). La digestión con nucleasa micrococcal provocó en primer lugar, la pérdida de la respuesta elástica de los cromosomas, seguido finalmente de su completa desestructuración. Esto respaldaría la idea de que la integridad mecánica de los cromosomas es debida principalmente a la propia cromatina a la vez que descartaría la presencia de un eje central proteico

continuo y bien definido. Las digestiones realizadas con diversos enzimas de restricción indicaron que los posibles elementos entrecruzadores (probablemente proteicos) dentro de la estructura cromosómica están separados aproximadamente 15 kb de DNA.

La unión de todos estos resultados ha hecho proponer a este grupo de investigadores un modelo estructural. En este modelo, el cromosoma mitótico tendría una estructura reticular estabilizada por interacciones electroestáticas de la propia cromatina y por una serie de elementos entrecruzadores proteicos separados entre si por aproximadamente 15 kb de DNA (ver figura 1.3.6).

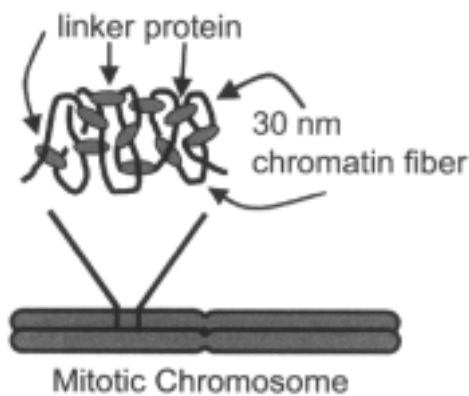


Figura 1.3.6 Modelo para la estructuración de la cromatina en el cromosoma metafásico propuesto por Poirier *et al.* (2002).

1.3.2.3.3 Modelo Mixto. Este modelo propuesto por Houchmandzadeh y Dimitrov (1999) y revisado por Woodcock y Dimitrov (2001) incorpora elementos de los modelos tradicionales basados en un eje central proteico (sección 1.3.2.1), junto con elementos del modelo más reciente de Poirier *et al.* (2002) (ver figura 1.3.6). Basado en el estudio de las propiedades elásticas de cromosomas formados a partir de extractos de *Xenopus* (Houchmandzadeh y Dimitrov, 1999), los autores proponen un modelo en el cual el cromosoma mitótico estaría constituido en base a un delgado eje proteico (20 nm) elástico y deformable alrededor del cual estaría anclada de forma suave y flexible la cromatina. Las propiedades elásticas del eje, serían similares a las de una proteína típica del tejido muscular llamada titina. De hecho, se ha podido constatar en *Drosophila* que mutaciones en genes homólogos a la titina inhiben la condensación y la consiguiente segregación de los cromosomas metafásicos (Machado y Andrew, 2000).

1.3.3 Restricciones físicas de los diferentes niveles de plegamiento del DNA para la formación del cromosoma metafásico

Las longitudes de las moléculas de DNA son mucho más grandes que la dimensiones de los cromosomas metafásicos donde están contenidas durante la mitosis. La bibliografía ha utilizado la razón de empaquetamiento lineal como medida del grado de compactación del DNA, definida como la relación entre la longitud del DNA extendido y la longitud de la estructura que contiene el DNA (Lewin, 2000). Sin embargo, para considerar las restricciones físicas que tienen las estructuras cromatínicas propuestas por los diferentes autores para llegar a los cromosomas metafásicos, es mejor considerar como medida de compactación, la concentración local del DNA. Esta se define como la masa de DNA por unidad de volumen de la estructura biológica que contiene este DNA.

La concentración local de DNA en los cromosoma metafásicos ha sido determinada por diversos tipos de células en diferentes laboratorios, utilizando diversas técnicas de microscopía (Bennett *et al.*, 1983; Bohrmann *et al.*, 1993; Heslop-Harrison *et al.*, 1989; Fritzsche y Henderson, 1996). La media de estos valores obtenidos es de 0.17 g/ml (Daban, 2000).

Sin embargo, los diferentes niveles de plegamiento planteados por los diferentes autores tienen una serie de restricciones físicas que impiden en muchos casos alcanzar la concentración local de DNA determinada para el cromosoma metafásico.

En la partícula núcleo del cromosoma, el DNA está enrollado sobre el octámero de histonas y en consecuencia solo ocupa la parte externa de la estructura. Esto hace que la concentración local de DNA estimada para estas estructuras sea baja (0.32-0.39 g/ml para nucleosomas con 20-80pb de DNA de unión) (Daban, 2000). Por tanto, todas las estructuras que se constituyan a partir de nucleosomas, la concentración local de DNA estará limitada a un valor máximo de 0.3-0.4 g/ml.

Las concentraciones locales de DNA estimadas para las tres modelos representativos de la fibra de 30-40 nm son las siguientes:

Modelo de zig-zag irregular (sección 1.2.2.3): 0.04-0.14 g/ml, dependiendo de las condiciones iónicas),

Modelo de solenoide (sección 1.2.2.1): 0.15 g/ml

Modelo de solenoide interdigitado (sección 1.2.3.3): 0.27 g/ml.

Así pues, en todos los modelos propuestos la concentración local de DNA en las fibras de 30-40 nm es inferior a la correspondiente a los nucleosomas aislados. Esto es debido a que la concentración de DNA está limitada por la disposición en el espacio de los nucleosomas en cada uno de los modelos.

A partir de la fibra de 30-40 nm, la cromatina se pliega en una serie progresiva de niveles hasta llegar al cromosoma metafásico. Han sido diversos los modelos propuestos para explicar este proceso de condensación (ver sección 1.3.2). Pero sea el modelo que fuere, hay que tener en cuenta que las estructuras que se empaquetan no pueden ocupar todo el espacio y que por tanto se va a producir en cada nivel de empaquetamiento una reducción de la concentración local de DNA.

Además, en muchos de los modelos planteados se sugiere la existencia de un agujero central a lo largo de todo el eje longitudinal de la cromátida, que representa una gran pérdida de eficiencia en la ocupación del espacio por parte de las fibras de la cromatina.

Daban (2000) efectuó un estudio a partir de los modelos estructurales más importantes del cromosoma metafásico propuestos hasta el momento, para determinar la disminución de la concentración local cuando la fibra de cromatina de 30-40 nm se pliega hasta formar la cromátida condensada. El promedio de los valores obtenidos para los diversos modelos corresponde a una reducción de la concentración del 40%.

Si se aplica esta reducción del 40% a cada una de las concentraciones de DNA local estimadas para los tres modelos básicos propuestos para la fibra de cromatina, se observa, que únicamente en el modelo de solenoide interdigitado se obtiene un valor de la concentración local (0.16 g/ml) similar al estimado para el cromosoma metafásico por métodos experimentales (0.17 g/ml).

1.3.4 Proteínas involucradas en la estructura del cromosoma

En estos últimos capítulos se ha descrito ampliamente el plegamiento de la cromatina para formar los cromosomas metafásicos. Sin embargo prácticamente no se ha comentado nada a cerca del papel estructural de las proteínas en los cromosomas mitóticos. Tradicionalmente existen tres tipos de proteínas implicadas en esta función: Las histonas, la topoisomerasa II y las proteínas SMC (*Stability and Maintenance of Chromosomes*).

1.3.4.1 Histonas

Además de las consideraciones básicas sobre las histonas en la cromatina presentadas anteriormente, hay otros aspectos que cabe destacar.

El papel de fosforilación de la histona de unión H1 en el cromosoma mitótico, está todavía poco claro. Tradicionalmente se ha creído que la función de esta modificación post-traducciona *per se*, ha sido la de dirigir la condensación cromosómica. Sin embargo, los resultados más recientes van contra esta posibilidad (ver por ejemplo, Guo *et al.*, 1995). Algunos estudios han sugerido que la fosforilación de la histona H1 podría provocar la activación de la fosforilación de la histona H3, la cual si tiene un claro papel a favor de la condensación mitótica. También cabría la posibilidad de que la propia fosforilación provocara la separación de la histona H1 con la cromatina, favoreciendo de este modo el acceso de otros factores de condensación (Hirano, 2000).

La histona H3 es fosforilada en la serina-10 durante la mitosis. Esta modificación está estrechamente unida temporal y espacialmente a la condensación cromosómica. Se han planteado dos posibles alternativas para explicar el papel de la fosforilación de la histona H3 en la condensación de los cromosomas mitóticos. En la primera alternativa, la histona H3 fosforilada actuaría como un receptor directo, reclutando factores de condensación. En la segunda posibilidad (al igual que uno de los dos posibles modelos para la histona H1) la fosforilación reduciría la afinidad de la histona H3 por el DNA, permitiendo la unión de factores de condensación a la cromatina (Hirano, 2000).

1.3.4.2 Topoisomerasa II

La proteína encontrada en el cromosoma mitótico de forma más abundante es la topoisomerasa II (Earnshaw *et al.*, 1985; Gasser *et al.*, 1986). La actividad de esta enzima consiste en pasar DNA doble cadena a través de otro DNA doble cadena, por tanto una de sus funciones sería la de resolver los entrecruzamientos de la fibra de cromatina durante la condensación y la segregación del cromosoma.

Debido a su amplia distribución en las cromátidas se ha hipotetizado que la topoisomerasa II podría tener también una función estructural en el cromosoma mitótico. Saiatoh y Laemmli en 1993 indicaron la posibilidad de que la topoisomerasa II

actuara como punto de anclaje de los lazos de DNA (ver sección 1.3.2.1). Sin embargo, experimentos a partir de cromátidas reasociadas *in vitro* y sin la presencia de la topoisomerasa II, sugirieron que ésta no era exclusivamente necesaria para el mantenimiento de la estructura cromosómica (Hirano y Mitchison, 1993). Por otro lado Bojanowski *et al.* (1998) mostraron que la topoisomerasa II podía provocar una morfología compactada en cromosomas descondensados después de un tratamiento con proteasas, sugiriendo de esta forma una posible función de condensación de la cromatina por parte de la topoisomerasa II.

Si bien el rol estructural de la topoisomerasa II ha sido ampliamente discutido, su localización exacta en el cromosoma no ha quedado aclarada. Diversos trabajos de microscopía de inmunofluorescencia han mostrado una distribución de la topoisomerasa II a lo largo del eje longitudinal de la cromátida (Earnshaw y Heck, 1985; Maeshima y Laemmli, 2003; Tavormina *et al.*, 2002). Sin embargo otros estudios realizados con técnicas similares (Christensen *et al.*, 2002) han localizado la topoisomerasa II distribuida de forma más uniforme en el brazo cromosómico. Una distribución similar fue encontrada en experimentos realizados a partir de cromátidas reasociadas en extractos de *Xenopus* (Hirano y Mitchison, 1993) o en estudios en células de insectos a las cuales se les inyectó topoisomerasa II marcada con rodamina (Swedlow *et al.*, 1993). Finalmente diversos grupos que han trabajado con técnicas de inmunomarcaje han detectado esta enzima en altas concentraciones en el cinetocoro (Rattner *et al.*, 1996; Summer *et al.*, 1996).

1.3.4.3 Proteínas SMC (Condensinas y Cohesinas)

En los últimos años ha sido posible el estudio de la constitución de cromosomas *in vitro*. Esto se ha logrado gracias a extractos de huevos de *Xenopus*. A partir de estos extractos, se ha podido convertir la cromatina del esperma de *Xenopus* en núcleos interfásicos o cromosomas metafásicos (Smythe y Newport, 1991). Este sistema ha permitido identificar a proteínas indispensables para la organización del cromosoma mitótico. El ejemplo más notable ha sido el hallazgo de la condensina y la cohesina, ambas pertenecientes a la familia de las SMC.

El complejo de la condensina ha sido identificado en el cromosoma mitótico (Strunnikov *et al.*, 1993). Este complejo esta formado por cinco subunidades proteicas, tres de las cuales no pertenecen a la familia de las SMC. El núcleo de la condensina

consiste en un heterodímero formado por las proteínas SMC2 y SMC4 (Hirano, 1998). La versión de estas dos proteínas en *Xenopus* se denomina XCAP-E y XCAP-C respectivamente. Ambas proteínas tienen dos dominios helicoidales antiparalelos conectados entre sí por una región bisagra. Los extremos N y C del heterodímero son globulares e interactúan con el DNA mediante un proceso en el cual se produce la hidrólisis de ATP (ver figura 1.3.7).

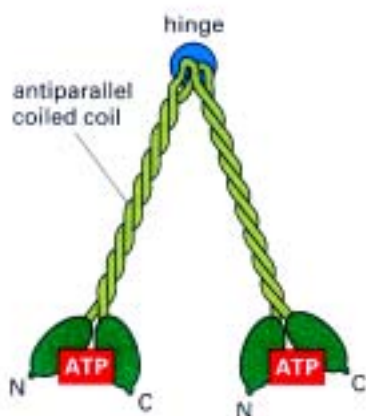


Figura 1.3.7 Estructura del heterodímero SMC2-SMC4 del complejo de la condensina. En la figura se puede apreciar el dominio helicoidal antiparalelo, la región bisagra y los dominios globulares de unión al DNA e hidrólisis de ATP (figura adaptada de Alberts *et al.*, 2002).

La estructura global de la condensina sugiere un papel en el plegamiento de la fibra de 30 nm. Una combinación de estudios genéticos en levadura y bioquímicos en huevos de *Xenopus*, han mostrado que la función de este complejo es la del mantenimiento de la estructura del cromosoma mitótico (Hirano, 2000). Sin embargo, el mecanismo por el cual la condensina desempeña esta función, es todavía desconocido.

El complejo de la cohesina es otro reciente descubrimiento en el cromosoma mitótico. Está compuesto por las proteínas SMC1 y SMC3. Este complejo proteico es necesario para mantener unidas las cromátidas humanas después de que los cromosomas se hayan duplicado durante la fase S (Hirano, 2000).

1.4 Objetivos

Nuestro grupo ha estudiado la estructura de la cromatina de núcleos de eritrocitos de pollo (Bartolomé *et al.*, 1994; Bartolomé *et al.*, 1995; Bermúdez *et al.*, 1998). La consecuencia de estos estudios ha sido la elaboración de un modelo para el plegamiento de la fibra de cromatina con una elevada concentración local del DNA (Daban y Bermúdez, 1998; Daban, 2000). Sin embargo, el nivel máximo de condensación en la cromatina, se encuentra en el interior de los cromosomas metafásicos. Aunque la bibliografía ha planteado diferentes modelos para el plegamiento de la cromatina en el interior de éstos, tal como se ha descrito en la introducción, existe un conocimiento muy escaso acerca de la estructura molecular de la cromatina en los cromosomas condensados.

En base a estos precedentes, los objetivos del presente trabajo han sido:

- La puesta a punto de técnicas de preparación de cromosomas a partir de células HeLa en cultivo paradas en metafase. Estas técnicas habrán de permitir la obtención de cromosomas en buen estado y en cantidades suficientes para posteriores estudios bioquímicos y estructurales con microscopía óptica y electrónica.

- Provocar una desnaturalización parcial de los cromosomas metafásicos con el fin de intentar poner de manifiesto elementos o propiedades estructurales que de otra forma pudieran permanecer ocultos en las cromátidas condensadas. Para conseguir este objetivo se desarrollarán métodos de desnaturalización parcial mediante tratamientos con medios poco estructurantes y mediante digestiones enzimáticas.

- El objetivo final de la tesis ha sido la caracterización estructural de los diferentes elementos observados a partir de la desnaturalización parcial de los cromosomas metafásicos y el estudio de las posibles relaciones estructurales entre dichos elementos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

Cuando se trabaja con cultivos celulares, se requieren condiciones de esterilidad para evitar la contaminación de los cultivos en cuestión, y en caso de las células HeLa (línea de origen tumoral), también para la protección del investigador. Por esta razón muchos de los procesos fueron realizados en una cabina de flujo laminar vertical (Faster Bio 48 Cultek) y, en los pocos pasos en que ésto no fue posible, se trabajó cuidadosamente para evitar la contaminación. Todo el material utilizado en las técnicas de cultivo fue previamente autoclavado.

2.1.1 Establecimiento de un cultivo de células HeLa

Se partió de un vial que contenía aproximadamente un millón de células de la línea celular humana HeLa, el cual estaba congelado en N₂ líquido en presencia de medio de congelación [suero fetal bovino y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, que actúa como crioprotector (Gibco)]. Este vial se descongelaba durante un minuto a 37°C en un baño María. Seguidamente se resuspendía en un tubo cónico de 15 ml al que previamente se le había añadido 10 ml de medio de cultivo [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) con Glutamax-1 y glucosa 4500 mg/l, suero fetal bovino al 10% y penicilina-streptomina al 1%, pH 7.3 (Gibco)]. Previamente, el tubo cónico había sido enfriado en hielo, ya que a partir de 4°C el DMSO empieza a ser tóxico para las células. Esta resuspensión en medio de cultivo, permite que el crioprotector salga de la célula hacia el medio por ósmosis. Seguidamente se centrifugó en el rotor 8160 de la centrífuga Megafuge 2.R (Heraeus) a 4°C y 400g durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el DMSO era eliminado mediante una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío. El pelet resultante se resuspendía en 15 ml de medio DMEM y luego se trasvasaba a un frasco de cultivo de 75 cm² (Becton Dickinson), dejándolo resbalar cuidadosamente por la pared del recipiente.

Una vez las células estaban en el frasco, se observaban al microscopio óptico Lobovat (Leitz) a 40 aumentos para ver su estado. Las células en buen estado tenían un

aspecto refringente y redondo. Finalmente las células se dejaban creciendo en un incubador de CO₂ con camisa de agua (Forma Scientific) a 37 °C, 90% de humedad y 10% de CO₂.

2.1.2 Mantenimiento de un cultivo celular de células HeLa

Cada 24-48 horas se iba controlando el estado del medio de cultivo. Cuando éste cambiaba su color rosa fuerte hacia un color amarillo anaranjado era indicativo de que el medio se había agotado. Entonces se procedía al cambio de este medio mediante la aspiración con una pipeta Pasteur, con el suficiente cuidado como para no tocar la monocapa de células. A continuación, con ayuda de una pipeta conectada a un aspirador Pipetboy Plus (Cultek) se introducía medio fresco por la parte del frasco donde no había células. El volumen de medio introducido dependía del tipo de frasco con que estuviéramos trabajando. Así, los volúmenes de trabajo oscilaban entre los 15 ml para frascos de 75 cm² y 48 ml para frascos de 225 cm² (Cultek).

Por otro lado, con la frecuencia indicada en el párrafo anterior, se comprobaba el estado de confluencia del cultivo (observación por microscopio óptico). Cuando las células estaban cerca del 100% de confluencia se procedía a la tripsinización de éstas. Gracias a la tripsinización podíamos separar las células largas y estrelladas pegadas a la superficie del frasco, recuperarlas, y volverlas a sembrar en el mismo frasco, pero en una concentración inferior. De esta manera las células podían seguir creciendo hasta llegar de nuevo al 100% de confluencia.

Para la tripsinización de los frascos de cultivo, primero se extraía el medio de cultivo con ayuda de una pipeta Pasteur. Después se realizaba un lavado del frasco con tampón fosfato Dulbecco's (PBS) (Gibco), sin magnesio, calcio ni bicarbonato sódico, con un volumen en función del frasco con que estuviéramos trabajando. Así, en un frasco de cultivo de 75 cm², poníamos 2-3 ml de PBS. La función del PBS era eliminar proteínas y restos de medio que podrían unirse a la tripsina e impedir su correcta actuación. Seguidamente se añadía la tripsina (solución comercial que contenía tripsina porcina 5 g/l y EDTA 2 g/l, y que diluíamos 10 veces con PBS) (Gibco). El volumen de tripsina era el mismo que el que habíamos añadido de PBS anteriormente. El frasco era introducido en el incubador durante 1 minuto y luego se sacaba y se golpeaba para ayudar a las células a

despegarse de la superficie. Para comprobar que las células se habían despegado se observaban al microscopio óptico. Las células despegadas flotaban y tenían un aspecto redondo, mientras que las células aún unidas a la superficie, eran largas y estrelladas. Rápidamente se procedía a añadir medio de cultivo (igual volumen que la disolución de tripsina que habíamos puesto) para inactivar a la tripsina. Se recuperaba todo el medio y se pasaba a un tubo cónico.

Este tubo se centrifugaba en un rotor H-400 de la centrífuga Sorvall TC6 (Dupont) a 200g y temperatura ambiente durante 8 minutos. Eliminábamos el sobrenadante (donde teníamos los restos de la tripsina) y resuspendíamos el pelet en un volumen pequeño. Según la cantidad que queríamos sembrar, sólo añadíamos una parte del volumen resuspendido en el frasco de cultivo. Finalmente añadíamos medio de cultivo fresco, hasta el volumen máximo que nos permitía el frasco con el que trabajábamos, y lo dejábamos en el incubador.

En algunas ocasiones nos interesaba aumentar en gran cantidad el número de células en nuestro cultivo. Entonces, a partir de un frasco sembrábamos en otros de mayor superficie. Para realizar este proceso el volumen obtenido en el párrafo anterior se repartía por igual en los diferentes frascos de cultivo en los cuales queríamos sembrar.

2.1.3 Recuento de células

En determinados pasos nos interesaba hacer un recuento de las células. Para hacer el recuento, se extraía una alícuota a partir del pelet resuspendido en medio de cultivo y se diluía 1:2 o 1:10 (en función del pelet obtenido) con el colorante *Trypan blue* (Sigma) al 0.4%. Este colorante penetra dentro de las células muertas, de tal manera que las células refringentes son las vivas. Una vez preparada la dilución, se introducía una gota dentro de la cámara de Neubauer, y se realizaba el recuento de los cuatro campos de la cámara, tal como se detalla en la figura 2.1.1.

Luego se hacía la media de los cuatro campos y se multiplicaba por el factor de dilución y por 10 (factor que tiene en cuenta el volumen real de la cámara).

$$\text{Células}/\mu\text{l} = X \times 10 \times \text{Factor de dilución.}$$

Donde,

$X \Rightarrow$ Media de los cuatro campos.

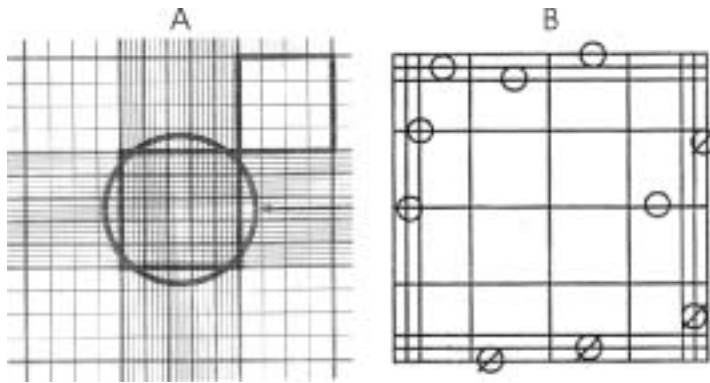


Figura 2.1.1 Diagrama de la cámara de Neubauer (A). El círculo indica el área aproximada cubierta por una magnificación de 100x al microscopio óptico. Ampliación de uno de los campos para el recuento de células (B). En el recuento se incluían todas las células que estaban dentro del cuadrante (o), excepto las que tocaban el borde izquierdo e inferior (∅).

Esto nos indicaba el número de células por microlitro. Para saber el número total de células, sólo había que multiplicar por el volumen de medio que teníamos en el tubo, del cual habíamos extraído la pequeña alícuota para hacer el recuento.

En algunas ocasiones era necesario determinar la viabilidad de las células del cultivo. Para este fin se aplicaba la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = X/(X+Y) \times 100$$

Donde,

X⇒ Media de los cuatro campos de las células vivas.

Y⇒ Media de los cuatro campos de las células muertas.

2.1.4 Cultivo celular en presencia de colcemida

El objetivo del crecimiento de las células HeLa en presencia de colcemida era obtener grandes cantidades de células paradas en metafase, para luego obtener sus cromosomas. La colcemida es una droga que provoca despolimerización de los microtúbulos durante la división celular.

Al necesitar grandes cantidades de células metafásicas frecuentemente el cultivo se realizaba en 5 frascos grandes de 225 cm². El cultivo se iniciaba la semana anterior a la realización del experimento. A partir de un vial congelado (sección 2.1.1) o a partir de otro cultivo de células HeLa ya existente (sección 2.1.2), se sembraba directamente sobre un frasco de 225 cm². Cuando las células llegaban a la confluencia, estas eran tripsinizadas y repartidas por igual (sección 2.1.2) en los 5 frascos de 225 cm². A continuación debíamos esperar a que el cultivo llegara a un 80-90% de confluencia. Durante este tiempo (2 o 3 días) era muy importante controlar que las células no agotaran el medio de cultivo (sección 2.1.2).

Cuando finalmente llegábamos a la confluencia deseada, se añadía la suficiente colcemida (Gibco), como para conseguir que las células crecieran a una concentración de 0.1 µg/ml. Antes de añadir esta droga, estimábamos visualmente el número de células que se estaban dividiendo en ese momento (células redondas, refringentes y flotantes), que solía ser aproximadamente el 30%. Las células se dejaban crecer en presencia de colcemida durante 12 horas. Este procedimiento fue adaptado a partir de Adolph (1980).

Al día siguiente, se observaban las células al microscopio óptico para ver su estado, el cual solía ser de un 80-90% de células en división. Finalmente se procedía a la extracción de dichas células. (ver más adelante sección 2.2.1).

Ocasionalmente los experimentos no requerían de cantidades tan grandes de células HeLa, por lo que el cultivo celular se realizaba a partir de un frasco de 225 cm². En estas ocasiones el cultivo podía iniciarse la misma semana del experimento ya que el tiempo requerido para que este llegara a una confluencia del 80-90% era sólo de 2-3 días.

2.2 Obtención del material biológico

2.2.1 Obtención de células

Doce horas después de haber añadido la colcemida, se procedía a la extracción de las células HeLa de los 5 frascos mediante la técnica de sacudida brusca (*shake-off*) (Narayansumi y Hamkalo, 1987), es decir, dando un par de sacudidas para que se acaben de despegar las células que se están dividiendo. Para evitar que durante este acto se formase espuma, con anterioridad sacábamos el medio de cultivo de los frascos y lo transferíamos a una serie de tubos cónicos. Seguidamente se añadían unos 8 ml de PBS por frasco de cultivo y entonces se procedía a la extracción por sacudida brusca. A medida que íbamos sacudiendo los frascos, se transferían los 8 ml de PBS en los mismos tubos cónicos donde teníamos el medio de cultivo, hasta rellenar por completo el volumen de cada tubo. Era importante no sacudir demasiado fuerte, ya que así evitábamos arrastrar células que no estuvieran en metafase. A continuación centrifugábamos los tubos cónicos en el rotor H-400 a temperatura ambiente y 200g durante 10 minutos y el sobrenadante lo aspirábamos con una pipeta Pasteur en la cámara de flujo laminar.

Los sedimentos resultantes de cada tubo eran resuspendidos en PBS y transferidos a un solo tubo cónico en un volumen final de 10 ml. En este punto se extraía una alícuota de 100 μ l y se preparaba una dilución 1/2 o 1/10 con el colorante *Trypan blue* al 0.4% en función de la cantidad de sedimento obtenido. Una vez preparada la dilución adecuada se realizaba un recuento de células, tal como se detalla en la sección 2.1.3.

El tubo cónico con los 10 ml finales de células HeLa, era centrifugado de nuevo en el rotor H-400 a temperatura ambiente y 200g durante 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante obtenido se eliminaba mediante una pipeta Pasteur y el sedimento con las células HeLa se resuspendía en el medio adecuado, en función del experimento a realizar.

Cuando trabajábamos con un solo frasco de cultivo, el proceso de obtención de células era el mismo que el detallado en esta sección, pero más simplificado debido a las cantidades de medio inferiores utilizadas. En estos experimentos no nos interesaba saber el número de células existentes por lo que no era necesario tampoco hacer un recuento de células.

2.2.2 Obtención de cromosomas en diversos medios

2.2.2.1 *Cromosomas obtenidos en hexylene glycol*

El cultivo celular se realizaba en un frasco de 225 cm². Una vez obtenidas las células del cultivo, antes de eliminar el sobrenadante de PBS, dejábamos reposar las células durante 30 minutos a 4°C. A continuación centrifugábamos en el rotor JA-20 a 200g a 4°C durante 8 minutos. Eliminábamos el sobrenadante de PBS, y las células sedimentadas eran resuspendidas en 5 ml del medio de aislamiento de cromosomas filtrado (filtro de 0.22 µm, Millipore) (*Hexylene glycol* 1 M, CaCl₂ 5×10⁻⁴ M, Pipes 0.1 mM pH 6.5) y se mantenía a 4°C. De nuevo volvíamos a centrifugar a 200g y 4°C durante 8 minutos para acabar de eliminar los posibles restos de PBS. Después de volver a resuspender las células en 5 ml de medio de aislamiento, éstas se dejaban incubando a 37°C durante 10-15 minutos.

El siguiente paso consistía en la rotura de las membranas celulares con el fin de liberar los cromosomas al medio de aislamiento. Colocábamos las células resuspendidas en el medio de *hexylene glycol* en una jeringuilla de 5 ml y las hacíamos pasar a través de una aguja de 22 gauge de diámetro. Para comprobar que el proceso de rotura tenía éxito, se extraían alícuotas de la muestra para su observación al microscopio óptico (ver más adelante sección 2.2.3).

Llegados a este punto, se centrifugaba la solución en el rotor JA-20 a 100g y 4°C durante 3 minutos para eliminar las células que no se habían roto, posibles núcleos de células interfásicas y restos celulares no cromosómicos. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se volvía a centrifugar, pero esta vez a 1500g, con el objetivo de sedimentar los cromosomas. Esta centrifugación se realizaba a 4°C durante 5 minutos. Finalmente los cromosomas sedimentados se resuspendían en un mililitro de tampón de aislamiento. Método modificado a partir de Stublifield y Wray (1971).

2.2.2.2 *Cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas*

El sedimento obtenido a partir de un cultivo celular realizado en un frasco de 225 cm² (sección 2.2.1) era resuspendido en 5 ml de KCl 75 mM durante 10 minutos a 37°C. La

función de este medio hipotónico era la de inflar las células para facilitar más tarde la rotura de sus membranas celulares. A continuación trasvasábamos la solución de células HeLa turgentes a un tubo de 15 ml corex[®] y se centrifugaba en el rotor de ángulo fijo de la centrífuga Jouan MR 18.12 a 300g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el sobrenadante, las células HeLa se resuspendían en 4.5 ml de un medio de poliaminas (TEA-HCl 7.5 mM pH 7.5, KCl 40 mM, EDTA-KOH 1 mM pH 7.4, espermina 0.1 mM, espermidina 0.25 mM, *thiodiglycol* al 1%, PMSF 0.1 mM) a 4°C.

Una vez teníamos las células en este medio, se procedía a la rotura de las membranas celulares. Gracias a las poliaminas, cuando las células se rompían y liberaban los cromosomas al medio, éstos quedaban estabilizados sin sufrir distorsiones en su estructura física. Para romper las membranas celulares, la suspensión de células HeLa se homogeneizaba pasando 10-12 veces el pistón de un Dounce de 5 ml (proceso realizado también a 4°C). Una vez homogeneizada la solución, ésta se centrifugaba en un rotor JA-20 a 200g y 4°C durante 5 minutos, para eliminar posibles núcleos interfásicos, restos celulares y células que hubiesen resistido la homogeneización. Finalmente, recuperábamos el sobrenadante con los cromosomas y los manteníamos a 4°C para su posterior estudio Método adaptado de Gasser y Laemmli, 1987.

2.2.2.3 Cromosomas obtenidos en TeaKMC-MgCl₂ 5mM

Los cromosomas en TeaKMC-MgCl₂ 5 mM (TEA-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 1 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 0.1 mM) se podían obtener de dos formas. En ambas, el cultivo celular era siempre de 225 cm².

2.2.2.3.1 Cromosomas obtenidos en medio hipotónico y TeaKMC-MgCl₂ 5 mM. El procedimiento para la obtención de estos cromosomas era exactamente igual al detallado en la sección 2.2.2.2, pero con la salvedad de utilizar el medio TeaKMC-MgCl₂ 5 mM en lugar del medio de poliaminas, en el paso anterior a la rotura de las células.

2.2.2.3.2 Cromosomas obtenidos directamente en TeaKMC-MgCl₂ 5 mM. En estos experimentos, el sedimento de células procedente del cultivo celular se resuspendía directamente en TeaKMC-MgCl₂ 5 mM (3-5 ml dependiendo de la cantidad de células). En algún caso también se resuspendieron células directamente en TeaKMC-MgCl₂ 1.7 mM. A

continuación se dejaba reposar la solución un cierto tiempo (0-6h) según el tipo de experimento a 4°C o a temperatura ambiente (también según el tipo de experimento) y se procedía a la rotura de las membranas celulares, homogeneizando la suspensión de células 10-12 veces en un homogenizador Dounce de 5 ml. La solución obtenida se mantenía a 4°C para su posterior observación y estudio por microscopía electrónica.

En ocasiones, antes de la rotura de las células se efectuaba un cambio de medio en TeaKMC-MgCl₂ 1.7 mM. Para este proceso las células resuspendidas en TeaKMC-MgCl₂ 5 mM, después de una hora a 4°C en dicho medio, se centrifugaba a 500g en el rotor JA-20 a 4°C durante 5 minutos. El pelet resultante de esta centrifugación se resuspendía en 2 ml del tampón TeaKMC-MgCl₂ 1.7 mM. Después de un cierto tiempo de incubación (0-6h) se realizaba la rotura de las células con el mismo procedimiento detallado en el párrafo anterior.

2.2.2.4 Cromosomas obtenidos en TeaBM-MgCl₂ 5 mM

Los cromosomas obtenidos en TeaBM-MgCl₂ 5 mM (TEAB 90 mM pH 8.6, MgCl₂ 5 mM, PMSF 0.1 mM) se obtenían directamente sin pasar por el medio hipotónico. Es decir, resuspendiendo el pelet del cultivo celular este tampón acabado de describir. A partir de aquí el protocolo seguido era exactamente igual al detallado en la sección anterior.

En estos experimentos también se podía realizar un cambio de medio. En esta ocasión el medio escogido era el TeaBM-MgCl₂ 1.7 mM y el protocolo era idéntico al utilizado en la sección 2.2.2.3 para cambios de medio.

2.2.2.5 Aislamiento y purificación de cromosomas mediante un gradiente de sacarosa escalonado

En los métodos de obtención de cromosomas descritos hasta el momento en la tesis, se han aplicado algunos sistemas para intentar separar los cromosomas del resto de componentes celulares (ver secciones 2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.2.3 y 2.2.2.4). Para lograr todavía una mayor purificación en la muestra de cromosomas, se decidió aplicar un gradiente escalonado de sacarosa.

Al aplicar una fuerza centrífuga sobre los diversos componentes de la muestra a purificar, éstos se distribuyen a través del gradiente escalonado según su tamaño y densidad. De este modo los cromosomas se concentran en una determinada zona del gradiente separándose del resto de estructuras celulares.

El inconveniente de esta técnica es la pérdida de rendimiento en la obtención de cromosomas. Para solventar este problema, en estos experimentos se utilizaban 5 frascos de cultivo de 225 cm².

El sedimento resultante del cultivo celular era resuspendido en un medio hipotónico de KCl 75 mM hasta obtener una concentración de 2×10^6 células/ml. Entonces las células se incubaban a 37°C durante 10 minutos. Este paso se realizaba en un tubo cónico de 50 ml. A continuación repartíamos la solución de células en 4 tubos de 15 ml corex[®] y se centrifugaban en el rotor de ángulo fijo de la centrífuga Jouan MR 18.12 a 275g y temperatura ambiente durante 5 minutos. Al acabar la operación eliminábamos el sobrenadante con ayuda de una pipeta automática y el sedimento se resuspendía con un medio a 4°C, que contenía poliaminas (TEA-HCl 15 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 80 mM, EDTA-KOH 2 mM pH 7.4, espermina 0.2 mM, espermidina 0.5 mM, EGTA 0.5 mM) y digitonina (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml. La digitonina es un detergente que ayuda a disgregar las membranas celulares. Esta solución se preparaba el mismo día del experimento y debía pasar previamente por una incubación a 37°C durante 15-20 minutos y finalmente era filtrada a través de una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore). La concentración final de las células en este medio debía de ser de 1×10^7 células/ml.

El siguiente paso consistía en transferir las células en un Dounce en 5 ml, y pasar 15 veces el pistón sobre la solución de células para provocar la rotura de sus membranas y la consiguiente liberación de los cromosomas al medio. Frecuentemente, para ayudar a romper las membranas celulares, la solución también era agitada a través de un vórtex. El homogenado resultante volvía a ser transferido a un tubo de 15 ml corex[®] para ser posteriormente centrifugado en el rotor JA-20 a 200g y 4°C durante 10 minutos. Después de la centrifugación, recuperábamos el sobrenadante con los cromosomas y los manteníamos a 4°C, mientras que el sedimento con los restos celulares, núcleos y las células que no se habían disgregado, se volvía a resuspender con un mililitro de la solución

poliaminas-digitonina para repetir de nuevo la homogenización y acabar de romper las células que aún no estaban disgregadas. Acabada la segunda centrifugación a 200g el sobrenadante obtenido se añadía al anterior y se mantenía a 4°C.

Una vez llegados a este punto se procedía a la preparación del gradiente escalonado de sacarosa. Se depositaban sobre un tubo de 7 ml (Nalgene centrifuge, Sigma) 4 soluciones cuyas composiciones variaban entre si únicamente en el % (p/v) de sacarosa. En el fondo del tubo colocábamos 1.3 ml de una solución al 60% de sacarosa, a continuación 0.87 ml de la misma solución al 50%, después 0.87 ml al 40% y finalmente 0.87 ml de la solución al 30% de sacarosa (ver figura 2.2.1). Para cada experimento se preparaban cuatro gradientes.

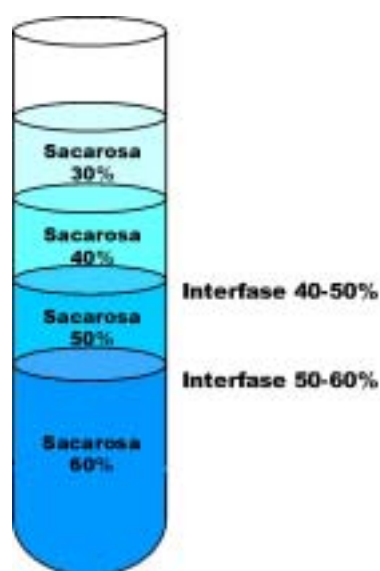


Figura 2.2.1. Gradiente escalonado de sacarosa. Una vez centrifugada la muestra, los cromosomas quedaban concentrados en la interfase 40-50% y 50-60%.

La composición de las soluciones de sacarosa podía ser de varios tipos en función del tipo del experimento (ver tabla 2.2.1).

Tabla 2.2.1**Composición de los diferentes medios de sacarosa**

Medio	Composición
Fosfato	Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 5 mM
Monovalentes ^a	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM
Monovalentes-Mg ^a	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM
Poliaminas	TEA-HCl 15 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 80 mM, EDTA-KOH 2 mM pH 7.4, espermina 0.2 mM, espermidina 0.5 mM, EGTA 0.5 mM,
PME-MgCl ₂ 5 mM	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM
PME-MgCl ₂ 1.25 mM	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 1.25 mM

^a La obtención de cromosomas para este tipo de gradientes era diferente al detallado en esta sección. Esta diferencia residía exclusivamente en la composición de los tampones utilizados:

Tampón monovalentes-Mg hipotónico: Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 10 mM, KCl 55 mM, MgCl₂ 5 mM.

Tampón monovalentes hipotónico: Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 10 mM, KCl 55 mM.

Tampón de lisis monovalentes: Digitonina 1 mg/ml disuelto en tampón monovalente hipotónico.

Tampón de lisis monovalentes-Mg: Digitonina 1 mg/ml disuelto en tampón monovalente-Mg hipotónico

Terminada la preparación de los 4 gradientes se aplicaba la muestra de cromosomas depositándolos con mucho cuidado encima de cada gradiente. Esta operación se hacía con la ayuda de una pipeta automática dejando resbalar la muestra gota a gota por una de las paredes del tubo. La muestra con los cromosomas se repartía por igual entre los 4 gradientes.

Una vez cargados los gradientes, éstos se centrifugaban en el rotor basculante JS-13.1 a 4000g y 4°C durante 15 minutos y con el freno de parada de la centrífuga al mínimo. En estas condiciones los cromosomas se concentraban sobre las interfases 40-50% y 50-60% de sacarosa (ver figura 2.2.1) formando un material con aspecto de pequeños flóculos blancos. Si se observaba el gradiente al trasluz este material blanquecino se apreciaba mejor, lo cual facilitaba su aspiración mediante una pipeta Pasteur de 230 mm. Finalmente

los cromosomas purificados se mantenían a 4°C o se congelaban a -80°C a la espera de posteriores experimentos. Este método se adaptó de Craig (1999).

2.2.3 Procesamiento y observación del material biológico en el microscopio óptico

En ciertos experimentos se requería la extracción de alícuotas de las diferentes muestras para su observación al microscopio óptico. Estas alícuotas habían de ser teñidas para lograr una correcta observación de la muestra. En función del tipo de observación requerido se escogió entre la tinción con yoduro de propidio o la tinción con Giemsa.

2.2.3.1 Tinción con yoduro de propidio

Debido a la capacidad de este colorante fluorescente para interactuar con la cromatina y los cromosomas, fue utilizado para la observación de las células metafásicas, células interfásicas, núcleos, cromosomas y fibras cromosómicas. La ventaja más importante de esta técnica era la simplicidad y rapidez con la cual se efectuaba la tinción. Este hecho, lo hacía idóneo para experimentos en los cuales se monitorizaba al microscopio óptico el proceso de rotura de las membranas celulares y la liberación de los cromosomas al medio, así como su consiguiente desestructuración.

Para la tinción con yoduro de propidio, cada alícuota extraída se diluía ½, con una solución 1/100 del colorante preparado en el medio en el cual estaba disuelta la muestra. La solución concentrada del yoduro de propidio estaba a una concentración de 1 mg/ml en agua milliQ que se preparaba el mismo día de su utilización. Este colorante fluorescente tiene un máximo de absorción a 538 nm y un máximo de emisión a 613 nm.

Una vez preparadas las muestras, se depositaba 25 µl de cada una sobre un portaobjetos y se cubría con un cubreobjetos cuidadosamente, evitando la formación de burbujas.

La observación final de las muestras se realizaba en un microscopio óptico DMRB (Leica) por contraste de fases y fluorescencia. Las imágenes fueron adquiridas con una

cámara de video C5310 Hamamatsu o con una cámara Leica DC 200 conectadas al microscopio.

2.2.3.2 Tinción con colorante Giemsa

Este tipo de tinciones requieren la fijación previa de las células en un medio de metanol-ácido acético 3:1 (medio de Carnoy). En los métodos convencionales para la fijación con Carnoy es habitual resuspender las células obtenidas del cultivo celular en un medio hipotónico (KCl 75 mM) durante 15 minutos a 37°C (ver por ejemplo Barch, 1991). Sin embargo en este trabajo también se realizaron fijaciones a partir de células resuspendidas en los diversos medios empleados para la obtención de cromosomas (sección 2.2.2). Una vez fijadas las células se procedía a la aplicación del colorante.

2.2.3.2.1 Fijación en metanol-ácido acético. El medio de metanol ácido acético se preparaba el mismo día del experimento y se mantenía a 4°C. Para que el proceso de fijación se realice correctamente, el medio en el cual se encuentra la célula debe de ser substituido gradualmente por el medio de Carnoy. Con este fin añadíamos un volumen pequeño del medio de fijación. (1/14 respecto el volumen total) sobre la muestra y centrifugábamos a 200g en el rotor JA.20 a 4°C. A continuación extraíamos el sobrenadante poco a poco y con la ayuda de una pipeta Pasteur, pero dejando como volumen residual 1/7 del volumen del sobrenadante obtenido.

Sobre el sobrenadante residual se añadía una cantidad igual de medio de fijación gota a gota utilizando una pipeta Pasteur, mezclando las dos soluciones con la ayuda de un vórtex. Seguidamente añadíamos el resto del medio de Carnoy, hasta alcanzar el volumen inicial de muestra que teníamos previamente.

A partir de este punto, el proceso acabado de describir se repetía 3-4 veces, según si la prioridad era obtener un elevado rendimiento de células metafásicas, o obtener una buena calidad en la tinción.

Una vez fijadas las células, estas podían teñirse con el colorante Giemsa o podían ser guardadas a - 20°C (Craig, 1999).

2.3.3.2.2 Aplicación del colorante Giemsa. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se dejaban caer 1 o 2 gotas de la muestra de cromosomas fijadas sobre un portaobjetos desde

una altura de 25 cm. Cuando se secaban las gotas, se cubría el portaobjetos con una solución de colorante Giemsa al 0.4% (v/v) (Sigma) durante 2 minutos. A continuación se introducía lateralmente el portaobjetos en un recipiente especial para la contención de portaobjetos, el cual a su vez, se sumergía en agua otros 2 minutos. Una vez pasado este tiempo el portaobjetos era lavado con agua corriente para eliminar el exceso de colorante durante 5 minutos. Finalmente, una vez seco el portaobjetos se depositaba una gota de DPX (*Neutral Mounting Medium*, Aldrich) sobre la gota seca de muestra y se cubría cuidadosamente evitando la formación de burbujas, con un cubreobjetos (Mc Donald, 1994).

La observación final de la muestra se realizaba en un microscopio óptico DMRB (Leica) por contraste de fases y por campo claro. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Leica DC 200 conectada al microscopio.

2.3 Microscopía electrónica de cromosomas

2.3.1 Eliminación de partículas contaminantes de los materiales y los medios empleados

Cuando se trabaja en el campo de la microscopía electrónica se requiere unas condiciones de limpieza y esterilidad para minimizar al máximo la cantidad de partículas contaminantes que pudieran depositarse sobre las rejillas de microscopía. En este sentido, la manipulación de rejillas siempre se realizaba en una zona limpia y provistos de una máscara quirúrgica.

Un foco posible de contaminación podía venir a través de los medios en los cuales estaba la muestra disuelta. Para evitarlo, todos los tampones que iban a estar en contacto con ésta eran filtrados a través de dispositivos de filtración estériles. La utilización de estas unidades de filtración garantizaba la eliminación de microorganismos, partículas, precipitados y polvos insolubles cuyas dimensiones sobrepasaran el tamaño de los poros de las membranas (0.22 μm). Según el volumen de medio preparado se utilizaban tres tipos diferentes de dispositivos (indicados en la tabla 2.3.1).

Tabla 2.3.1

Volumen filtrado	Tipo de unidad de filtración ^a
0-10 ml ^b	Millex [®] , con membrana ME-Millipore [™]
10-50 ml	Steriflip [™] , con membrana Millipore Express [™] PLUS
50-250ml ^c	Stericup [™] de 250 ml, con membrana Millipore GP Express

^a Las membranas utilizadas en los tres dispositivos tenían un tamaño de poro de 0.22 μm .

^b Para realizar la filtración con la unidad Millex[®], previamente se aspiraba el medio a filtrar con una jeringuilla de 10 ml. A continuación se colocaba la unidad de filtración en la boca de la jeringuilla y finalmente, presionando con los dedos el émbolo, se hacía pasar la solución a través del filtro colocado hacia un recipiente estéril.

^c Para la filtración de volúmenes superiores a 250 ml se utilizaban tantos Stericup[™] como fueran necesarios.

En la manipulación de las rejillas era imprescindible la utilización de pinzas de precisión (Sigma #5 y #7). Estas pinzas debían de estar totalmente limpias para evitar contaminar las rejillas con algún tipo de partícula o microorganismo. Previamente, antes de manipular las rejillas, las pinzas eran sonicadas en un aparato de ultrasonidos Bronson 1510, durante 10 minutos. La sonicación se realizaba en una solución que contenía SDS al 0.1% en agua corriente. Finalizados los 10 minutos, las pinzas se lavaban con abundante agua destilada.

Durante la realización de un experimento de microscopía electrónica la manipulación de rejillas se daba con elevada frecuencia, por lo que el número de pinzas disponible no era suficiente como para poder efectuar todas estas manipulaciones. Para solucionar este problema se reutilizaban las pinzas, las cuales se lavaban previamente para evitar la contaminación cruzada. El lavado consistía en dejarlas en agitación en una solución al 2% de SDS en agua destilada, durante 5 minutos. Pasado este tiempo, las pinzas se aclaraban con abundante agua destilada.

Sin embargo, en algunas ocasiones no disponíamos del suficiente tiempo para efectuar esta operación. Entonces se optó por la utilización de pinzas de plástico para microscopía electrónica (Ted Pella, Inc) de un solo uso. La desventaja de la utilización de este tipo de pinzas era la pérdida de precisión en el manejo de las rejillas de microscopía.

2.3.2 Preparación de rejillas para microscopía electrónica

Las muestras a analizar en el microscopio se depositaban sobre rejillas de cobre de 3 mm de diámetro (400 mesh, Balzers Union o Sigma Chemical). Sobre la cara mate de las rejillas (cara superior) se depositaba previamente una fina capa de carbón. La manipulación de las rejillas se efectuó con pinzas de precisión. Durante todo el proceso de manipulación, se trabajó con máscaras quirúrgicas para evitar la contaminación de las rejillas.

Antes de depositar la capa de carbón, las rejillas eran lavadas con acetona analítica sumergiéndolas en una cápsula de Petri durante 2-3 minutos. Después de secarlas con papel Wathman se dejaban cinco minutos sobre papel de filtro dentro de otra cápsula de Petri. Una vez acabadas de secar, las rejillas se colocaban sobre un soporte formado por un anillo de PVC (3 cm de diámetro interior y 4.5 cm de diámetro exterior) y una malla de nylon de 80 μm de diámetro de poro. Todo el conjunto estaba en el interior de una cápsula de Petri y sumergido con agua milliQ. La malla de nylon se encontraba tensa, de manera que se evitaba que las rejillas se movieran cuando se manipulaba con las pinzas.

El siguiente paso consistía en depositar la capa de carbón sobre las rejillas. La capa de carbón se había preparado previamente mediante evaporación de carbón sobre mica acabada de exfoliar hasta conseguir 2 nm de grosor (ver en la siguiente sección). Al introducir la mica en la placa de Petri donde teníamos las rejillas sumergidas en agua, la capa de carbón se desprendía y quedaba flotando sobre la superficie del agua. Este proceso se realizaba con mucho cuidado, introduciendo lentamente la mica en un ángulo inferior a 45° respecto la superficie del agua. Entonces el agua de la cápsula de Petri se aspiraba lentamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur conectada a una trompa de vacío, hasta que la capa de carbón se depositaba sobre las rejillas y sobre el soporte. El soporte con las rejillas se secaba dentro de un desecador conectado a una trompa de agua (al menos 12 horas) y se guardaba dentro de una cápsula de Petri sellada con Parafilm®.

2.3.3 Evaporador de carbón y carbón-platino

El evaporador (Bal-Tec) es un sistema modular formado por los aparatos QSG 060, EUM 030, MED 020 y EK 030. Es un sistema que provoca un vacío elevado que permite

que un cañón de electrones caliente una barra de carbón o carbón-platino hasta que empiezan a evaporarse partículas. Estas partículas se depositan sobre el objeto que queremos recubrir y, a la vez, sobre una pieza de cuarzo que mide el grosor de la capa depositada.

Este dispositivo tiene dos cañones: uno evapora carbón y el otro una mezcla de carbón y platino. Estos materiales se encuentran en forma de barra dentro del cañón. La barra es el ánodo (potencial tierra) y a su alrededor está situado el cátodo en forma de espiral (potencial negativo). El cátodo se calienta provocando que se desprendan electrones, que son acelerados por la diferencia de potencial hasta el ánodo. La barra recibe los impactos de los electrones transformando la energía cinética de éstos en calor que provoca la evaporación del material de la barra. El flujo de partículas evaporadas llega hasta el soporte que contiene las rejillas o la mica acabada de exfoliar. Este soporte es un disco que puede rotar opcionalmente a diversas velocidades.

El ángulo de incidencia de las partículas evaporadas sobre las rejillas o sobre la mica, está compuesto por la suma de dos ángulos diferentes. En primer lugar, hay que tener en cuenta la desviación de los cañones del evaporador respecto al eje vertical (ángulo β), y en segundo lugar, el ángulo de inclinación ($\alpha_{\text{inclinación}}$) del disco soporte respecto a la misma vertical. El ángulo β tiene un valor constante ($8.9^\circ \pm 2.6^\circ$) que se determinó de manera experimental (ver sección 2.4.2.1). El ángulo $\alpha_{\text{inclinación}}$ es una variable que nosotros cambiábamos según el tipo de evaporación realizado (ver tabla 2.3.2).

Para evaporar carbón, previamente se debía conseguir un vacío en la cámara del evaporador de por lo menos $2 \cdot 10^{-3}$ mbar (30 minutos). En cambio, si se quería evaporar carbón-platino sobre rejillas con muestra fijada, el vacío necesario era como mínimo de $6 \cdot 10^{-3}$ mbar (3 horas). Una vez hecho el vacío se seleccionaba el cañón del carbón o del carbón y platino, y se especificaba la diferencia de potencial y la intensidad al aparato que controla el cañón (ver tabla 2.3.2).

Para llevar un control visual de la evaporación, en cada experimento se introdujo un papel de filtro en el soporte donde teníamos la mica o las rejillas.

Tabla 2.3.2

Tipo de evaporación	β^a	$\alpha_{\text{inclinación}}^b$	Voltaje	Intensidad
Carbón	8.9°	90°	1.8 kv	80 mA
Carbón-platino rotacional	8.9°	6°	1.6 kv	60 mA
Carbón-platino unidireccional	8.9°	5-25°	1.6 kv	60 mA

^a Ángulo existente entre los cañones del evaporador y el eje de la vertical.

^b Ángulo existente ente el disco soporte de las rejillas o la mica y el eje de la vertical.

2.3.4 Activación de las rejillas

Las muestras con cromosomas se extendían sobre las rejillas que contenían una película de carbón. Esta capa de carbón se preparaba tal como se describe en la sección 2.3.2. Una vez habíamos depositada dicha capa, las rejillas se activaban para que éstas adquiriesen cargas positivas que ayudaran a los cromosomas a unirse con más afinidad.

La activación se realizaba utilizando el colorante *Alcian blue* (Fluka). Se pesaba 1 mg del colorante y se disolvía con 0.5 ml de ácido acético al 3% (v/v) para tener una concentración final de 2 mg/ml. De esta solución se extraía 50 μl y se disolvía en 4.95 ml de agua milliQ. A continuación, 500 μl de esta última solución, se depositaban en un cubreobjetos, que a su vez estaba sobre una lámina de Parafilm[®]. El carácter hidrofóbico del Parafilm[®] evitaba que el volumen depositado de la solución de *Alcian blue* pudiera desparramarse fuera del cubreobjetos. Seguidamente colocábamos las rejillas con la cara carbonatada tocando la superficie de la solución, con cuidado de no estropear el film de carbón. Al cabo de 5 minutos se sacaban las rejillas de la solución de *Alcian blue* y se situaban con la misma orientación en otro cubreobjetos donde en esta ocasión teníamos 500 μl de agua milliQ. De esta manera eliminábamos los restos del colorante durante 5 minutos. Pasado este tiempo, las rejillas estaban preparadas para recibir la muestra.

2.3.5 Extensión de los cromosomas sobre rejilla

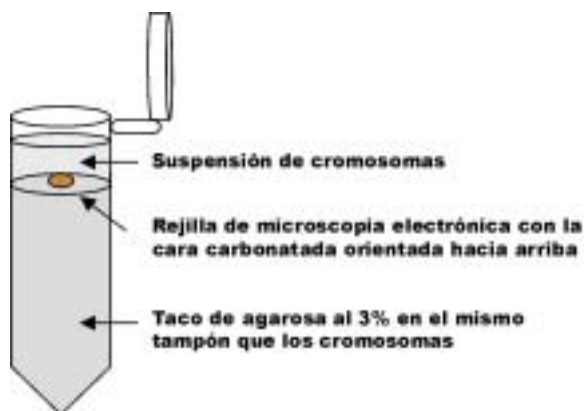
2.3.5.1 Cromosomas obtenidos en poliaminas, TeaKMC, TeaBM o aislados a partir de un gradiente de sacarosa

La técnica utilizada para la extensión de la muestra sobre las rejillas es un procedimiento adaptado del método de Miller y Beatty (1969). Esta técnica consiste en extender los cromosomas sobre las rejillas de microscopía por centrifugación. Esta centrifugación era necesaria para aumentar el rendimiento de depositación de la muestra sobre la rejilla.

Para evitar que durante la centrifugación las rejillas quedaran dañadas era imprescindible que éstas estuvieran sobre una superficie plana. Con esta finalidad, se preparaban una serie de tubos eppendorf (tantos tubos como rejillas se utilizaban) que contenían en el fondo un taco de agarosa solidificado. La agarosa se preparaba al 3% (p/v) disuelta en el mismo medio en el cual se encontraban los cromosomas aislados. Se preparaban en tubos eppendorfs de 1 o 0.5 ml, dependiendo de la cantidad de muestra disponible.

En caso de la muestra purificada por gradiente, era necesario además preparar los tacos de agarosa con un 50% de sacarosa. De esta manera evitábamos que la densa solución en la cual se encontraba la muestra penetrara a través de los tacos.

Una vez preparados los tubos eppendorf con el soporte de agarosa, se añadía un volumen de 100-200 μ l (según el recipiente fuera de 0.5 o 1 ml, respectivamente) de la muestra con los cromosomas sobre la superficie de los tacos. A continuación, con la ayuda de unas pinzas de precisión, se introducía una rejilla activada (sección 2.3.4) perpendicularmente a la superficie de la solución y con mucho cuidado de no estropear el film de carbón. Ésta última, debía quedar depositada sobre la superficie de la agarosa con su cara carbonatada orientada a la solución (ver figura 2.3.1).

**Figura 2.3.1**

Extensión de cromosomas sobre una rejilla de microscopía electrónica. La extensión se efectuaba sobre un soporte de agarosa al 3% (p/v) en el interior de un tubo eppendorf.

Finalizada la colocación de las rejillas en los eppendorfs, éstos eran centrifugados a 1500g en el rotor basculante JS-13.1 a 4°C durante 10 minutos (cuando las muestras procedían de un gradiente de sacarosa) o 5 minutos (en el resto de las muestras). Acabada esta operación, de nuevo con pinzas de precisión, se sacaban las rejillas cuidadosamente para mantener intacta la cara carbonatada.

Paralelamente a la preparación de las rejillas *muestra*, también se preparaban rejillas *blanco*. Éstas se preparaban de forma idéntica a las rejillas *muestra* pero con 100-200 µl del medio de interés sin la presencia de cromosomas.

Una vez llegados a este punto, las rejillas *muestra* y las rejillas *blanco* eran fijadas con glutaraldehído (ver más adelante sección 2.3.8) o previamente a este proceso, podían someterse a otros tratamientos (secciones 2.3.6 y 2.3.7).

2.3.5.2 Cromosomas en metanol ácido-acético

Las células resuspendidas en metanol-ácido acético (sección 2.2.3.2.1) no sólo se estudiaron por microscopía óptica, sino que también se prepararon para su observación por microscopía electrónica.

En este caso la extensión de la muestra se realizaba tirando una gota de la solución de cromosomas en metanol-ácido acético, sobre una rejilla de microscopía previamente activada (sección 2.3.4), la cual a su vez, se encontraba sobre un portaobjetos. La gota se dejaba caer desde una altura de 30 cm con la ayuda de una pipeta Pasteur. La muestra se

dejaba secar y después se procedía a efectuar la fijación de la muestra (ver más adelante sección 2.3.8.3). También en esta ocasión se preparaban rejillas *blanco*.

2.3.5.3 Cromosomas obtenidos en hexylene glycol

Para los cromosomas obtenidos en presencia de *hexylene glycol* (sección 2.2.2.1) se escogió un método muy sencillo para extender la muestra sobre las rejillas. Este consistía en depositar 10 μ l del tampón de aislamiento con los cromosomas sobre una rejilla previamente activada con *Alcian blue* (sección 2.3.4) durante un minuto. Pasado este tiempo, la rejilla era introducida unos segundos en el interior de un pequeño recipiente (tapón de polipropileno de un tubo de 5 ml) que contenía un pequeño volumen de tampón de aislamiento. De esta manera conseguíamos eliminar el exceso de muestra. Como en la sección anterior también se preparaba paralelamente una rejilla *blanco*. Después se procedía a su fijación (ver más adelante sección 2.3.8.4).

2.3.6 Cambios de medio en rejilla

De acuerdo con los objetivos de esta tesis (sección 1.4) se procedió a la observación de los cromosomas bajo diferentes medios y condiciones que provocan su desestructuración parcial. Con este propósito, los cromosomas fueron sometidos a diferentes cambios de medio. Estos cambios de medio se realizaban con los cromosomas ya extendidos sobre las rejillas (ver sección anterior), para evitar que la estructura de éstos no se viera demasiado desmoronada al utilizar condiciones poco estructurantes antes de la extensión.

Para realizar el cambio de medio, se diseñó un dispositivo que consistía en enganchar sobre una bandeja de acero una lámina de Parafilm[®]. Encima de esta lámina se colocaban tantos cubreobjetos como medios se iban a utilizar. A continuación añadimos a los diferentes cubreobjetos 500 μ l del medio de interés correspondiente.

Una vez preparado el dispositivo, éste se colocaba en un baño para que los medios se equilibraran a 37°C. Más tarde, con la ayuda de una pinzas, se colocaban las rejillas con la muestra extendida, sobre cada cubreobjetos con los 500 μ l de medio correspondiente. La rejilla se colocaba de manera que la cara carbonatada, en la cual se encontraba la muestra,

quedara flotando en el medio de interés orientada hacia abajo (ver figura 2.3.2). El cambio de medio solía durar entre 10 y 60 minutos, dependiendo del tipo del experimento. Algunas de las rejillas *blanco* preparadas en la sección anterior eran destinadas a realizar cambios de medio, de forma paralela.

Los cambios de medio en rejilla se hicieron sólo con cromosomas aislados a partir de un gradiente de sacarosa. Los medios y tiempos utilizados se especifican en la tabla 2.3.3.

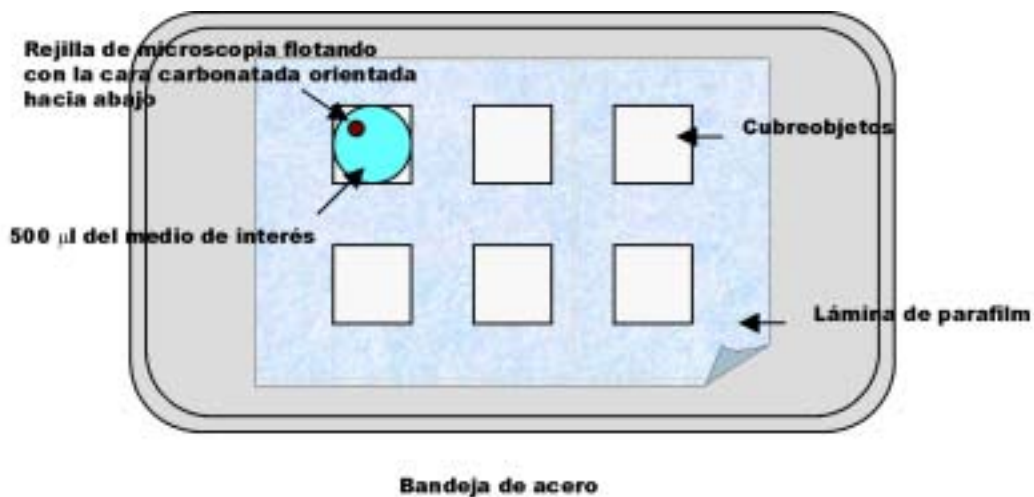


Figura 2.3.2. Dispositivo diseñado para realizar cambios de medio en cromosomas ya extendidos sobre rejillas de microscopía electrónica. Para más detalles ver sección 2.3.6.

Tabla 2.3.3.

Cambios de medio utilizados			
Experimento	Medio del gradiente de sacarosa	Tiempo (minutos)	Medio final
1.0	PME-MgCl ₂ 5 mM ^a	10	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 1.7 mM, sacarosa 50%.
1.1			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 0.5 mM, sacarosa 50%.
1.2			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 5 mM, sacarosa 50%.
1.3			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, citrato sódico 26 mM, sacarosa 50%.
2.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	20	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM, sacarosa 50%.
2.1	PME-MgCl ₂ 5 mM	20	TEAB 90 mM pH 8.6, NaCl 80 mM, sacarosa 50%.
2.2			TEAB 90 mM pH 8.6, NaCl 80 mM.
3.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	30	H ₂ O.
3.1			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 50%.
3.2			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 0.5 mM, sacarosa 50%.
3.3			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM, sacarosa 50%.
3.4			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 10 mM, sacarosa 50%.
3.5			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 40 mM, sacarosa 50%.
3.6			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 100 mM, sacarosa 50%.

4.0 (1)	PME-MgCl ₂ 5 mM	10	TEAB 90 mM pH 8.6, MgCl ₂ 1.7 mM.
4.1 (1)		5	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM.
4.2 (1)		5	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM.
5.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	35	Pipes 0.1 mM pH 7.2.
5.1			Pipes 0.1 mM pH 7.2, MgCl ₂ 0.1 mM.
5.2			Pipes 0.1 mM pH 7.2, EDTA 10 mM.
5.3			Citrato sódico 26 mM pH 7.8.
5.4			Acetato sódico 55 mM, KCl 55 mM (0.8:4) pH 7.2.
5.5			Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
5.6			Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.
5.7			Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.
6.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	30	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM.
6.1			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 1.7 mM.
6.2			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
6.3			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.
6.4			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.
6.5			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM, CaCl ₂ 20 mM.
6.6			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, CaCl ₂ 20 mM.
7.0	Poliaminas ^b	30	Poliaminas diluidas 1/2 en H ₂ O.
7.1			Poliaminas diluidas 1/10 en H ₂ O.

7.2			Poliaminas diluidas 1/100 en H ₂ O.
7.3			H ₂ O.
8.0 (1)	PME-MgCl ₂ 5 mM	10	Pipes 5 mM pH 7.2, espermina 0.1 mM, espermidina 0.25 mM.
8.1 (1)			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM espermina 0.1 mM, espermidina 0.25 mM.
8.2 (1)			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM.
9.0	Monovalente ^c	30	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.
9.1			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, CaCl ₂ 20 mM.
9.0	Fosfato ^d	30	Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 1.7 mM.
9.1			Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
9.2			Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.
9.3			Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.
10.0 (2)	PME-MgCl ₂ 5 mM	60	Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 5 mM.
10.1			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 1.7 mM.
10.2			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 5 mM.
10.3			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
10.4			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, KCl 120 mM, NaCl 20 mM, MgCl ₂ 20 mM.
10.5			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.
11.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	40	Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 3 mM.

11.1			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
11.2			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.
11.3			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.
11.4			Fosfato 5 mM pH 7.5, ATP 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 40 mM.
11.5			Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 3 mM.
11.6			Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
11.7			Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.
11.8			Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.
11.9			Fosfato 10 mM pH 7.5, ATP 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 40 mM.
12.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	35	H ₂ O.
12.1			Pipes 0.1 mM pH 7.2.
12.2			Pipes 5 mM pH 7.2.
12.3			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 0.5 mM.
12.4			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 1.7 mM.
12.5			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM.
12.6			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 10 mM.
13.0	PME-MgCl ₂ 5 mM	60	Pipes 0.1 mM pH 7.2.
13.1			Pipes 0.1 mM pH 7.2, EDTA 10 mM.
13.2			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM.
13.3			Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.

13.4	Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.
------	--

^a **PME-MgCl₂ 5 mM.** Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM.

^b **Poliaminas.** TEA-HCl 15 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 80 mM, EDTA-KOH 2 mM pH 7.4, espermina 0.2 mM, espermidina 0.5 mM, EGTA 0.5 mM.

^c **Monovalentes.** Pipes 5 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM.

^d **Fosfato.** Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM.

(1). La incubación en estos experimentos se efectuó a temperatura ambiente.

(2). En el experimento 10.0, la muestra a continuación fue sometida a otro cambio de medio en agua durante 40 minutos.

2.3.7 Digestiones con enzimas

Los cromosomas metafásicos aislados y purificados mediante un gradiente de sacarosa de PME-MgCl₂ 5 mM (ver sección 2.2.2.5) eran tratados con diversas enzimas con el fin de provocar su desestructuración parcial y poder observar su estructura interna en el microscopio electrónico. A continuación se describen estas digestiones, así como las enzimas utilizadas.

2.3.7.1 *Digestión de cromosomas metafásicos con tripsina*

Se preparaba una solución de tripsina de 1 mg/ml disuelta en PME-MgCl₂ 5 mM y sacarosa al 50% (tampón en el cual se encontraban los cromosomas después de ser purificados mediante el gradiente de sacarosa). A partir de esta solución concentrada se elaboraba un banco de diluciones en el mismo tampón, de tal manera que la concentración final de tripsina fuera de 1 mg/ml (dilución 1/1), 0.5 mg/ml (dilución 1/2), 0.2 mg/ml (dilución 1/5) y 0.1 mg/ml (dilución 1/10). La preparación de este banco de diluciones debía realizarse inmediatamente antes de iniciar las digestiones de las muestras, para evitar que la tripsina se autodigiriera.

Al igual que en la sección anterior, las digestiones se realizaban con los cromosomas extendidos sobre las rejillas de microscopía. De esta manera, evitábamos la desmoronación total de su estructura.

El procedimiento utilizado era muy similar al detallado en la sección 2.3.6. En una bandeja de acero enganchábamos una lamina de Parafilm[®] sobre la cual colocábamos 4

cubreobjetos (uno por cada dilución preparada). En cada cubreobjetos depositábamos 500 µl de la dilución de tripsina correspondiente y dejábamos todo el sistema en el baño para que se equilibraran las soluciones a 37°C. A continuación, las rejillas con la muestra se colocaban flotando con la cara carbonatada hacia abajo, durante 10 minutos. También en esta ocasión se preparaban paralelamente rejillas *blanco* sin cromosomas, para someterlas a las mismas condiciones de digestión que las rejillas con muestra.

2.3.7.2 Digestión de cromosomas metafásicos con RNAsa

Las digestiones con RNAsa se realizaron también sobre cromosomas ya extendidos en rejillas de microscopía (sección 2.3.5.1). Durante la digestión, estos cromosomas también eran sometidos a la vez a cambios de medio.

Se prepararon un total de tres concentraciones de RNAsa disueltas en los diversos medios de interés en un volumen final de 0.5 ml. Los medios en los cuales se efectuaron las digestiones así como las concentraciones de RNAsa utilizadas, están indicadas en la tabla 2.3.4.

El proceso de digestión y cambio de medio simultaneo se perpetro mediante el mismo sistema de bandeja de acero descrito en el último apartado. El tiempo empleado fue de 30 minutos en el primer experimento, mientras que en el segundo fue de 60 minutos. Sin embargo, en este último experimento, la RNAsa no se añadió hasta pasados 30 minutos. Paralelamente también se digirieron rejillas *blanco* sin muestra

Tabla 2.3.4

Digestión con RNAsa		
Experimento	Medio utilizado en la digestión	RNAsa ($\mu\text{g/ml}$)
1.0	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 1.7 mM.	1
1.1		20
1.2		100
2.0	Pipes 0.1 mM pH 7.2.	100
2.1	Pipes 0.1 mM pH 7.2, EDTA 10 mM.	100
2.2	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, EDTA 10 mM.	100
2.3	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.	100
2.4	Fosfato 10 mM pH 7.5, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.	100

2.3.7.3 Digestión de cromosomas metafásicos con nucleasa micrococcal

Las digestiones efectuadas con nucleasa micrococcal se efectuaron mediante dos sistemas diferentes: *digestión en solución* o *digestión en rejilla*. En ambos sistemas era necesario determinar previamente la actividad de la enzima.

2.3.7.3.1 Determinación de la actividad de la nucleasa micrococcal. La solución concentrada de nucleasa micrococcal se preparaba disolviendo 1.8 mg de proteína (de un vial Sigma guardado a -20°C) en 1 ml de agua destilada. Después de ser preparada, esta solución se podía guardar a 4°C durante un máximo de un año.

Previamente a cada experimento se realizaba un ensayo de actividad para asegurar que la enzima estaba en buenas condiciones. Este ensayo se llevaba a cabo midiendo la hipercromicidad creciente a 260 nm provocado por el enzima sobre el DNA doble cadena de timo de ternera (Cuatrecasas *et al.*, 1967). El DNA de timo de ternera del ensayo se encontraba disuelto en Tris-HCl 10 mM pH 8.8, EDTA 0.2 M, a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ guardado a 4°C y condiciones estériles. La determinación de la actividad se realizaba con 1 ml de DNA, 10 μl de CaCl₂ y 5 μl de una dilución 1:100 del enzima disuelto en agua destilada. La hipercromicidad creciente era seguida gracias a la

programación de una cinética de 3 minutos en el espectrofotómetro CECIL 3000. El proceso se repetía con 10 y 15 μl de la solución 1:100 del enzima. Para calcular la actividad expresada en unidades arbitrarias, en la zona donde la absorbancia aumentaba linealmente en función del tiempo, se aplicaba la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = (A_{\text{max}} - A_{\text{min}}) / t \times V$$

A_{max} \Rightarrow Absorbancia máxima a 260 nm en el intervalo escogido.

A_{min} \Rightarrow Absorbancia mínima a 260 nm en el intervalo escogido.

t \Rightarrow Tiempo (minutos) del intervalo escogido.

V \Rightarrow Volumen (μl) de la nucleasa micrococcal añadida.

Se consideraba que la enzima estaba en buenas condiciones, cuando su actividad era igual o superior a las 2×10^{-4} unidades/ μl .

2.3.7.3.2 Digestión en solución. La digestión se efectuó en tubos eppendorf de 0.5 ml en los cuales añadimos 100 μl de muestra procedente del material purificado a partir de un gradiente en PME-MgCl₂ 5 mM (sección 2.2.2.5). Se efectuaron diferentes digestiones con diferentes concentraciones de nucleasa micrococcal. Concretamente se preparó una batería de tubos en los que se añadió enzima hasta alcanzar una concentración final que osciló entre $2.7 \cdot 10^{-2}$ y $7.9 \cdot 10^{-6}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A continuación se colocaban los tubos flotando en un baño a 37°C y se llevaba a cabo la digestión durante 30-50 minutos dependiendo del experimento.

Aunque nuestro grupo, en experimentos anteriores, determinó que la nucleasa micrococcal tenía una actividad importante en presencia únicamente de iones Mg²⁺, se decidió realizar una variación en este tipo de experimentos. Se mezclaron 50 μl de muestra en 50 μl de Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, CaCl₂ 5 mM. El objetivo de esta variación era obtener una concentración final de iones calcio de 2.5 mM en el medio donde se efectuaba la digestión. De esta manera garantizábamos una mayor actividad de la enzima.

La tabla 2.3.5 detalla las condiciones finales en las que se realizaron las digestiones, el tiempo invertido y las concentraciones de nucleasa micrococcal utilizadas para cada experimento de digestión en solución.

Tabla 2.3.5

Digestión con nucleasa micrococal en solución

Experimento	Tiempo (minutos)	Condición	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1.0	30	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM, sacarosa 50%.	$2.7 \cdot 10^{-2}$
1.1			$2.7 \cdot 10^{-3}$
1.2			$2.7 \cdot 10^{-4}$
1.3			$2.7 \cdot 10^{-5}$
2.0	50	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM, sacarosa 25%.	$7.9 \cdot 10^{-2}$
2.1		Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 2.5 mM, CaCl ₂ 2.5 mM, sacarosa 25%.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
2.2		Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM, sacarosa 25%.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
2.3			$7.9 \cdot 10^{-4}$
2.4		Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 2.5 mM, CaCl ₂ 2.5 mM, sacarosa 25%.	$7.9 \cdot 10^{-4}$
2.5			$7.9 \cdot 10^{-5}$
2.6			$7.9 \cdot 10^{-6}$

2.3.7.3.3 *Digestión en rejilla.* En este caso se procedió a aplicar la técnica ya detallada en los apartados 2.3.7.1 y 2.3.7.2 es decir, a la digestión de los cromosomas cuando éstos ya están extendidos sobre las rejillas. Al igual que en la sección 2.3.7.2, la muestra eran sometida a cambios de medio de forma paralela al proceso de digestión.

Se prepararon un total de seis concentraciones de nucleasa micrococal disueltas en los diferentes medios en donde se iba a perpetrar la digestión, en un volumen final de 300 μl . Estos medios, así como el tiempo empleado y las concentraciones utilizadas en la digestión, están indicadas en la tabla 2.3.6, para cada uno de los experimentos realizados.

Tabla 2.3.6

Digestión con nucleasa micrococcal en rejilla

Experimento	Tiempo (minutos)	Condición	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1.0	30	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM.	$2.4 \cdot 10^{-2}$
1.1			$2.4 \cdot 10^{-3}$
1.2			$2.4 \cdot 10^{-4}$
1.3			$2.4 \cdot 10^{-5}$
1.4			$2.4 \cdot 10^{-6}$
2.0	50	Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 2.5 mM, CaCl ₂ 2.5 mM.	$7.9 \cdot 10^{-2}$
2.1			$7.9 \cdot 10^{-3}$
2.2		Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 5 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
2.3			$7.9 \cdot 10^{-4}$
2.4		Pipes 5 mM pH 7.2, NaCl 5 mM, MgCl ₂ 2.5 mM, CaCl ₂ 2.5 mM.	$7.9 \cdot 10^{-4}$
3.0	35	Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 1.7 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
3.1		Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 5 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
3.2		Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 10 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
3.3		Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 20 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
3.4		Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 30 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
4.0	60	Fosfato 10 mM pH 7.4, NaCl 20 mM, KCl 120 mM, MgCl ₂ 5 mM.	$7.9 \cdot 10^{-3}$
4.1 ^a			$7.9 \cdot 10^{-3}$

^a La muestra posteriormente fue sometida a un cambio de medio en agua durante 40 minutos a 37°C.

El método utilizado para la digestión fue el mismo que el detallado en la sección 2.3.7.1. En el experimento 4, la nucleasa no se añadió hasta pasados 30 minutos. Paralelamente a cada uno de estos experimentos, se efectuaron tratamientos de digestión en rejillas *blanco* sin muestra.

Finalizados los tiempos de digestión, las rejillas se lavaban durante 5 minutos en sus respectivos tampones para finalizar la reacción.

2.3.8 Fijación de los cromosomas para microscopía electrónica

Una vez extendida la muestra sobre las rejillas de microscopía electrónica y finalizadas (en caso de haberlos realizado) los procesos de cambio de medio y/o digestión, la cromatina procedente de los cromosomas y los propios cromosomas, eran sometidos a un proceso de fijación. El objetivo de la fijación en microscopía electrónica es el de proteger y preservar la estructura de la muestra durante los procesos de deshidratación y platinación y su posterior exposición al haz de electrones.

En este trabajo, la fijación de los cromosomas se daba por entrecruzamiento con glutaraldehído. Esta molécula es un agente entrecruzador que reacciona con los grupos amino primarios de las histonas adyacentes, quedando de esta manera la estructura de la muestra preservada (Sommerville y Scheer, 1987; Bozzola y Rusell, 1992).

2.3.8.1 Cromosomas aislados y purificados mediante un gradiente de sacarosa

Los cromosomas obtenidos mediante un gradiente de sacarosa (sección 2.2.2.5) se extendían sobre rejillas de microscopía (sección 2.3.5.1), y se sometían a cambios de medio (sección 2.3.6) y/o a digestiones enzimáticas (sección 2.3.7). En ambos casos, el entrecruzamiento con glutaraldehído se efectuaba en el mismo tampón en el cual se habían dado estos procesos.

Algunas de la rejillas con cromosomas extendidos se fijaban directamente (sin pasar por las operaciones antes mencionadas), con el propósito de estudiar la forma y la estructura de los cromosomas inmediatamente después de ser purificados. Estas rejillas se preparaban en todos los experimentos en los que se hiciera uso de un gradiente escalonado

de sacarosa y tenían la función de mostrar el nivel de integridad de los cromosomas antes de someterlos a cualquier tratamiento posterior. Estos controles se entrecruzaban en el medio con el cual se había preparado el gradiente de sacarosa, manteniendo la misma proporción de sacarosa que la fracción del gradiente donde quedaban concentrados los cromosomas (interfase 40-50% y 50-60%, ver sección 2.2.2.5).

Dado que el gluteraldehído es una sustancia muy tóxica el entrecruzamiento se efectuaba con mucha precaución. En esta operación era necesaria la utilización de mascarilla y guantes de látex.

En una superficie plana se extendía una lámina de Parafilm[®] sobre la cual se colocaban una serie de cubreobjetos. En cada cubreobjetos se depositaban 500 µl del medio en el cual se iba a desarrollar la fijación, con una concentración final de gluteraldehído del 2.5%. En el caso de gradientes con poliaminas, si los cromosomas no eran sometidos a cambios de medio, la concentración de agente entrecruzador era del 13.5%. Este exceso era necesario para contrarrestar la gran cantidad de grupos amina existentes en el medio de poliaminas. El gluteraldehído se añadía pocos segundos antes de iniciar la reacción.

A continuación colocábamos las rejillas flotando cara abajo sobre los 500 µl de cada uno de los cubreobjetos, durante 10 minutos. Pasado este tiempo, el exceso de gluteraldehído se eliminaba repitiendo esta operación, pero en este caso colocando las rejillas sobre cubreobjetos que contenían gotas de agua milliQ, durante 5 minutos. Para evitar contaminación cruzada, en una misma gota de agua, no podían coincidir dos o más rejillas que tuvieran muestra de diferente procedencia.

Finalmente cada una de las rejillas se deshidratava durante 2-3 segundos en etanol absoluto y se dejaban secar sobre papel de filtro un mínimo de 2 minutos. Una vez secas las rejillas, éstas se guardaban en un portarejillas donde quedaban debidamente identificadas.

2.3.8.2 Cromosomas obtenidos en TeaKMC, poliaminas y TeaBM

Los cromosomas obtenidos en estos medios (sección 2.2.2.2, 2.2.2.3 y 2.2.2.4), se extendían en rejillas (sección 2.3.5.1) y a continuación se entrecruzaban en gluteraldehído siguiendo un proceso idéntico al explicado en el punto anterior. El gluteraldehído se añadía al mismo tampón en el cual estaban los cromosomas durante su extensión, hasta llegar a

una concentración final del 2.5%. La concentración de gluteraldehído en los cromosomas obtenidos en presencia de poliaminas era del 13.5%.

2.3.8.3 Cromosomas en metanol-ácido acético

La fijación de los cromosomas en el medio de Carnoy para su observación al microscopio electrónico era un proceso complicado, en el cual además, se efectuaron algunas variaciones.

Terminada la extensión de los cromosomas sobre la rejilla (sección 2.3.5.2), éstas eran fijadas colocando las rejillas en cuestión en el interior de un tapón de polipropileno de un tubo de 10 ml, el cual contenía fosfato 0.1 M pH 7.4 con una concentración final de gluteraldehído del 2% (v/v), durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las rejillas eran lavadas durante 5 minutos en el mismo tampón. En una de las variaciones de este protocolo, las rejillas directamente sin pasar por el proceso de lavado, eran sumergidas además, durante 10 minutos en fosfato 0.1 M pH 7.4, tetróxido de osmio 1%. También en este caso el tratamiento se llevaba a cabo en tapones de tubos de 10 ml.

El tetróxido de osmio se utiliza habitualmente como fijador secundario de la estructura celular. Este metal pesado resulta reducido confiriendo densidad y contraste al tejido biológico (Bozzola y Rusell, 1992). Debido a la toxicidad de los vapores desprendidos, todos los procesos realizados en presencia de este producto se efectuaron en una campana de extracción de gases. También se evitó el contacto directo, utilizando guantes de látex.

Las muestras que habían estado en contacto con el tetróxido de osmio, antes de pasar por el proceso de deshidratación, debían pasar por tres lavados consecutivos en agua durante 5 minutos.

Para la deshidratación de las muestras, era necesario pasar las rejillas por un gradiente de acetona escalonado (30, 60, 90, y 100% (v/v) en agua). Las rejillas se colocaban en el interior de un tapón de tubo de 10 ml para cada una de las sucesivas concentraciones ascendentes de acetona. El tiempo empleado para cada concentración era de 3 minutos.

Si quiéramos realizar una deshidratación de forma más cuidadosa, después de pasar las muestras por el gradiente de acetona, éstas podían deshidratarse por la técnica de *Critical Point Drying* (Bozzola y Rusell, 1992).

Este método se aplicaba introduciendo las rejillas en el interior de un recipiente especial con acetona fría (recipiente para gases comprimidos). Después de sellar este compartimento, el agente deshidratante (acetona) era desplazado por un fluido de transición presurizado (dióxido de carbono líquido). A continuación la temperatura de este fluido era lentamente elevada por aplicación de calor. Como respuesta a este calor, la presión en el interior del recipiente se iba incrementando, hasta llegar a un punto crítico (*critical point*) en el cual la densidad de la fase líquida se igualaba con la densidad de la fase vapor. Entonces se producía la transición del dióxido de carbono líquido a gas.

Debido a la complejidad de la técnica, todos estos pasos se realizaban de forma semiautomática por un aparato EMITECH K-850. El éxito de esta técnica reside en que la muestra durante el punto crítico está totalmente inmersa en una fase de vapor densa, evitando así la formación de artefactos debidos a la interfase líquido/aire.

2.3.8.4 Cromosomas obtenidos en hexylene glycol

Las muestras obtenidas en *hexylene glycol* (sección 2.2.2.1) después de ser extendidas sobre rejilla (sección 2.3.5.3) no requerían de entrecruzamiento con glutaraldehído. Sin embargo el proceso de deshidratación de la muestra era más complejo que en los casos anteriores. Este consistía en sumergir sucesivamente las rejillas con muestra unos 30 segundos en un gradiente escalonado de etanol absoluto en agua [40, 85 y 100% (v/v)] y a continuación en un gradiente escalonado de amyl acetato en etanol [10, 40 y 70% (v/v)]. Este proceso gradual de deshidratación, junto al efecto anticólapsante del *hexylene glycol*, garantizaban que la estructura de la muestra no se viera afectada previamente y durante su observación al microscopio electrónico.

2.3.9 Platinación de las muestras

El microscopio electrónico de transmisión genera las imágenes debido a la incidencia de un haz de electrones sobre la muestra. Los electrones que chocan con la muestra son desviados en función de la densidad local de ésta. Para solucionar el problema de la baja densidad de las muestras biológicas se realiza una tinción con metales pesados. Estos metales pesados aumentan la densidad local, incrementando el contraste de la imagen (Bozzola y Rusell, 1992). En nuestro caso, se escogió efectuar la tinción con una mezcla de carbón-platino.

2.3.9.1 *Platinado rotacional*

Una vez cargada la muestra sobre las rejillas con la película de carbón, se procedía a la platinación en el evaporador de carbón y carbón-platino. Las rejillas se colocaban en cuidadoso orden sobre el soporte del evaporador, el cual se inclinaba para que el ángulo de inclinación fuera de 6° (ver tabla 2.3.2). Finalmente se hacían girar las muestras a unas 100 rpm aproximadamente y se realizaba la platinación hasta conseguir un grosor de aproximadamente 1 nm en la capa de carbón-platino.

El material evaporado se condensa en finas partículas al chocar contra un objeto y las superficies encaradas al cañón reciben una cantidad de partículas superior a las zonas escondidas, generando así un contraste diferencial necesario para obtener imágenes (Bartolomé *et al.*, 1994; Bartolomé *et al.*, 1995; Bermúdez, 1997).

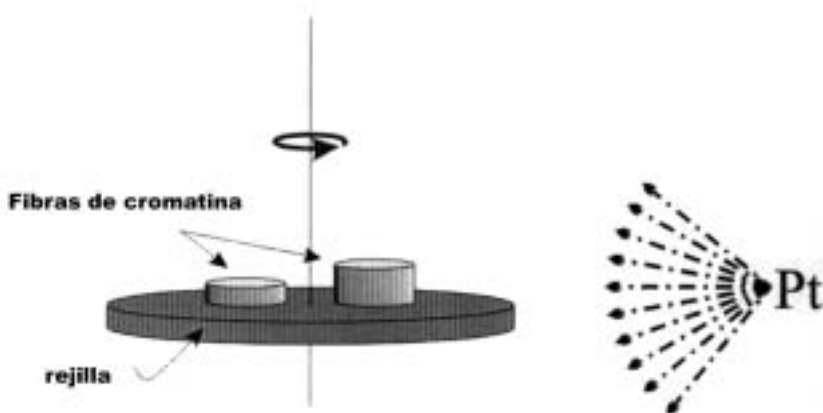


Figura 2.3.2. La figura es un esquema de este proceso de platinación para fibras cortas de cromatina de 30-40 nm de diámetro. Su disposición vertical y el ángulo de platinación hace que el platino se acumule mayoritariamente en la cara lateral del cilindro que representa la fibra (figura adaptada de Martín, 1999).

2.3.9.2 *Platinado unidireccional*

En el platinado unidireccional la plataforma en la que se depositaban las rejillas se dejaba inmóvil durante el proceso de evaporación de platino. Con ésto se conseguía que los átomos de platino se depositasen sobre la muestra siempre desde el mismo sentido, hecho que provocaba que detrás de cada partícula se generara una zona totalmente inaccesible al metal. La altura de un determinado cuerpo se puede conocer midiendo la longitud de la sombra que ha generado (ver sección 2.4.2).

Según el tamaño de los cuerpos, era conveniente obtener sombras más o menos largas. Para este fin, se variaba el ángulo de inclinación de la plataforma en más o menos grado.

2.3.10 Observación y fotografía de la muestra

Las muestras platinadas se observaban en un microscopio electrónico H7000 (Hitachi) a 100 Kv. Los aumentos utilizados oscilaban entre los 5000 y los 30000 en función del tamaño del cuerpo observado. Así por ejemplo, para la visualización idónea de un cromosoma íntegro se trabajaba a 10000 aumentos. Para facilitar la observación en la pantalla fosforescente del microscopio, se utilizaba una lupa que aumentaba 10 veces la imagen.

Los aumentos del microscopio eran calibrados cada experimento con unas rejillas de 54000 líneas por pulgada (Bal-Tec). En la determinación de medidas se consideró las diversas magnificaciones del microscopio (5000, 10000 y 30000) como correctas ya que la desviación estándar de las medidas observadas en la rejilla de calibración, y en cada experimento era muy pequeña (ver tabla 2.3.7).

La aplicación de un factor de corrección a estas magnificaciones se descartó definitivamente, al comprobar que los valores de las medidas determinados por nosotros de las rejillas de calibración, eran muy parecidas a las medidas establecidas por el fabricante (ver tabla 2.3.7).

La impresión del negativo requería de un tiempo de exposición de 1.5 segundos, aunque ocasionalmente, este tiempo se incrementaba hasta 12 segundos con el fin de vislumbrar parte de la estructura interna de algunos cuerpos de gran densidad.

El número total de micrografías realizadas en esta tesis fue de 4410. Estas micrografías proceden de 552 rejillas de microscopía electrónica obtenidas durante la realización de los diferentes experimentos de este trabajo.

Tabla 2.3.7

Experimento	Valores medios y desviaciones estándar (nm) ^a			Desviaciones respecto a la magnificación ^b		
	5×10 ³	10×10 ³	30×10 ³	Δ ₅ %	Δ ₁₀ %	Δ ₃₀ %
1		465 ± 12 (2.5)	460 ± 12 (2.6)		0.4	-0.6
2		481 ± 9 (1.8)	467 ± 3 (0.6)		3.9	0.9
3		471 ± 7 (1.6)	457 ± 7 (1.6)		1.7	-1.2
4		484 ± 7 (1.4)	460 ± 9 (1.9)		4.5	-0.6
5	446 ± 10 (2.1)	454 ± 8 (1.9)	435 ± 5 (1.2)	-3.7	-1.9	-5.9
6		460 ± 5 (1.0)	447 ± 11 (2.5)		-0.6	-3.3
7	464 ± 13 (2.7)	465 ± 11 (2.3)		0.2	0.4	
8	470 ± 11 (2.3)	463 ± 5 (1.0)		1.5	0.0	
9	456 ± 16 (3.4)	460 ± 7 (1.4)		-1.5	-0.6	
10	476 ± 8 (1.8)	480 ± 12 (2.4)		-2.8	3.7	
11		469 ± 17 (3.5)			1.3	
12	456 ± 18 (4.0)	458 ± 4 (0.9)		-1.5	-1.1	
13	468 ± 14 (3.0)	463 ± 8 (1.8)		1.1	0.0	
14	438 ± 6 (1.4)	450 ± 0 (0.0)		-5.4	-2.8	
15		464 ± 8 (1.8)	457 ± 11 (2.4)		0.2	-1.4
16		470 ± 12 (2.4)	455 ± 9 (2.0)		1.5	-1.7
17		477 ± 12 (2.4)	452 ± 12 (2.6)		1.3	-2.5
18		471.5 ± 8 (1.7)	451 ± 13 (2.8)		1.9	-2.5
19		472 ± 7 (1.4)	453 ± 9 (2.0)		1.9	-2.0
20		458 ± 6 (1.4)	451 ± 12 (2.8)		-1.1	-2.5

^a Valores medios y desviaciones estándar obtenidas a partir de 10 medidas del espaciado entre líneas de una rejilla de calibración a 5000, 10000 y 30000 aumentos. Entre paréntesis se encuentran los valores de la desviación porcentuada respecto a la media.

^b Diferencia expresada en % entre el valor medio indicado anteriormente y el valor de esta misma medida establecida por el fabricante (463 nm).

2.4 Procesamiento de las imágenes de microscopía electrónica

2.4.1 Realización de medidas

Uno de los objetivos de este estudio era conocer las dimensiones de los cromosomas y de las partículas cromatínicas desprendidas de éstos. Con este fin los negativos de las fotografías se colocaban sobre un transiluminador VaryQuest 100 (Photodyne) y se efectuaban las medidas de interés con una lente de 10 aumentos graduada (Peak) en caso de partículas pequeñas, o con una regla graduada en caso de objetos grandes.

2.4.2 Medición de alturas

Para la determinación de la altura de un cuerpo se aplicó la técnica del platinado unidireccional (Bozzola y Rusell, 1992; Bartolomé *et al.*, 1994; Bermúdez, 1997). En esta técnica, el platino proveniente de una sola dirección provoca que las diferentes partículas de la muestra proyecten una sombra que es proporcional a la altura de dichas partículas.

$$h = \operatorname{tg}\alpha \times L \quad (1)$$

Donde,

h \Rightarrow Altura de un cuerpo determinado.

$\operatorname{tg}\alpha$ \Rightarrow Tangente ángulo de platinación.

L \Rightarrow Longitud de la sombra.

Por tanto, para realizar este cálculo se debía conocer con precisión el ángulo de platinado (α).

2.4.2.1 Determinación del ángulo de platinación (α_{ap} y α_{real})

El cálculo exacto de este ángulo se efectuó a partir de unas partículas de látex esféricas con un diámetro conocido (diámetro promedio de 91 nm, Balzers Union). Estas

bolas se añadían sobre las rejillas con muestra una vez finalizado el proceso de fijación (sección 2.3.8). Este paso consistía en depositar 10 μl de una solución a una concentración de 5×10^9 bolas/ml sobre la rejilla durante 5 minutos. Finalizado este tiempo las rejillas se lavaban con agua y se secaban en etanol, de la forma habitual (sección 2.3.8).

Al ser las bolas de látex una esfera (Bermúdez, 1997), resulta que su diámetro es igual a su altura (ver figura 2.4.1A). El cálculo del ángulo de platinado se realizó midiendo el diámetro de la esfera (ϕ) y la longitud de la sombra desde el centro de la bola (AB):

$$\text{tg}\alpha = AC/AB = \phi/L \quad (2)$$

Donde,

$\text{tg}\alpha \Rightarrow$ Tangente del ángulo de platinación.

$AC = \phi \Rightarrow$ Altura y diámetro de la bola de látex platinada, respectivamente.

$AB = L \Rightarrow$ Longitud de la sombra.

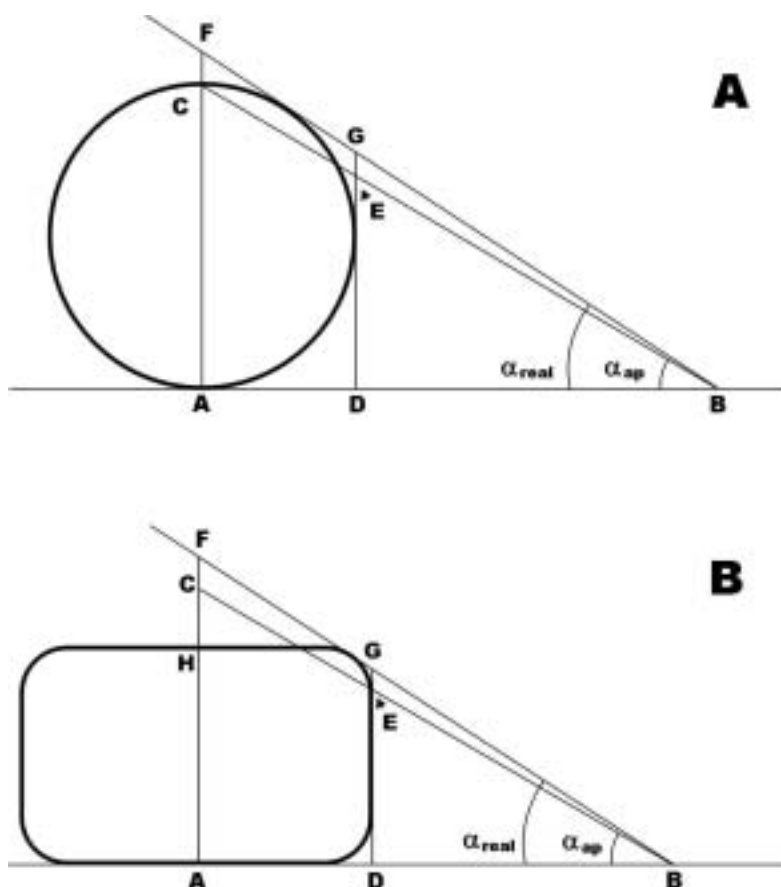


Figura 2.4.1. Representación gráfica de la recta tangente aparente y real a una esfera (A) o a un óvalo (B).

Sin embargo, si nos fijamos en la figura 2.4.1A podemos ver que el ángulo de platinación calculado a partir del diámetro (ϕ) y por tanto de la altura (AC) [*ángulo de platinación aparente* (α_{ap})] es inferior al ángulo de platinación real (α_{real}). Esto es debido a que la recta tangente a la bola de látex determinada por el haz de platino (FB) no coincide con la superficie de la bola en el mismo punto que la altura (AC) o diámetro de dicha bola (ϕ).

En el caso de un cuerpo esférico, α_{ap} sería el ángulo correcto para el cálculo de la altura (AC), puesto que si se utilizara α_{real} estaríamos calculando una altura superior (AF).

Para evitar problemas relacionados con la posición de la rejilla respecto a la fuente de platino o irregularidades en la superficie del carbón, la medición de la altura de los cuerpos de interés se realizaba calculando α_{ap} a partir de bolas de látex presentes en el mismo campo fotográfico.

2.4.2.2 *Determinación del ángulo β del evaporador de carbón y carbón-platino*

En el evaporador de carbón y carbón-platino, los dos cañones evaporadores tienen una cierta desviación respecto a la vertical. Esta desviación forma un ángulo que nosotros denominamos β . El valor de este ángulo se calculó de forma experimental, restando el ángulo de inclinación del soporte de las rejillas en el momento de la platinación, al ángulo aparente calculado en diversas micrografías ($\beta = \alpha_{ap} - \alpha_{inclinación}$) (ver tabla 2.4.1). El ángulo aparente de cada micrografía se calculó a partir de las diversas bolas de látex existentes en la micrografía en cuestión.

Tabla 2.4.1

Micrografía	α_{ap} ^a	$\alpha_{inclinación}$ ^b	β ^c
3466	26.9°	20°	6.9°
3467	29.9°	20°	9.9°
3468	27.7°	20°	7.7°
3469	27.2°	20°	7.2°
3514	18.3°	10°	8.3°
3517	17.5°	10°	7.5°
3520	18.7°	10°	8.7°
3549	24.9°	20°	4.9°

3556	27.2°	20°	7.2°
3558	34.9°	20°	14.9°
3559	32.2°	20°	12.2°
3561	29.9°	20°	9.9°
3562	31.8°	20°	11.8°
3752	18.9°	10°	8.9°
3573	17.3°	10°	7.3°
3576	16.4°	10°	6.4°
3579	28.2°	20°	8.2°
3582	33.9°	20°	13.9°

$$\beta = \alpha_{\text{ap}} - \alpha_{\text{inclinación}} = 8.9^\circ \pm 2.6^\circ$$

^a Ángulo aparente de platinación.

^b Ángulo existente entre el disco soporte de las rejillas y el eje vertical.

^c Ángulo existente entre los cañones del evaporador y el eje vertical.

2.4.2.3 Determinación de la altura de una cromátida (h_c y h_o)

2.4.2.3.1 *Cromátida de sección circular.* Si consideramos la sección de las cromátidas como una sección circular (figura 2.4.1A), entonces la altura de este cuerpo se podría determinar fácilmente aplicando la siguiente expresión:

$$h_c = \text{tg}\alpha_{\text{ap}} \times L_0 \quad (3)$$

O si miramos la figura 2.4.1A:

$$AC = \text{tg}\alpha_{\text{ap}} \times AB$$

$h_c = AC \Rightarrow$ **Altura de la cromátida en caso de que su sección fuera circular.**

$\text{tg}\alpha_{\text{ap}} \Rightarrow$ **Tangente del ángulo aparente de platinación.**

$L_0 = AB \Rightarrow$ **Longitud de la sombra medida a partir del centro de la cromátida.**

Sin embargo, debido a la gran dificultad en determinar con exactitud el centro de una cromátida a través de las micrografías obtenidas, se optó por medir la sombra de la cromátida a partir de su base:

$$h_{\text{ap}} = \text{tg}\alpha_{\text{ap}} \times L_1 \quad (4)$$

O lo que es lo mismo:

$$DE = \operatorname{tg}\alpha_{\text{ap}} \times DB$$

$h_{\text{ap}} = DE \Rightarrow$ **Altura aparente de la cromátida**

$\operatorname{tg}\alpha_{\text{ap}} \Rightarrow$ **Tangente del ángulo aparente de platinación.**

$L_1 = DB \Rightarrow$ **Longitud de la sombra medida a partir de la base de la cromátida.**

Tal como podemos ver en la figura 2.4.1A, esta altura aparente es inferior a la verdadera altura de la cromátida:

$$h_{\text{ap}} = DE < AC = h_c$$

Si queremos calcular h_c a partir de L_1 , entonces es necesario modificar la expresión (3):

$$h_c = \operatorname{tg}\alpha_{\text{ap}} \times (L_1 + r) \quad (5)$$

O según la figura 2.4.1A:

$$AC = \operatorname{tg}\alpha_{\text{ap}} \times (DB + AD)$$

$r = AD \Rightarrow$ **Radio de la cromátida.**

El valor que se utilizó como r , corresponde al promedio final del radio de las cromátidas en presencia de Mg^{2+} ($0.265 \mu\text{m}$) (ver más adelante en sección 3.2.8.1). Para cada una de las cromátidas en las que se determinó su altura (h_c) se realizaron diversas medidas de la longitud de la sombra partiendo de su base (L_1) y se efectuó un promedio de éstas (L_{ex}). Así pues, para calcular la altura de una cromátida de sección circular se aplicó esta última expresión matemática:

$$h_c = \operatorname{tg}\alpha_{\text{ap}} \times (L_{\text{ex}} + r) \quad (6)$$

Y para el cálculo de la altura aparente (es decir, sin tener en cuenta el radio de la cromátida), esta otra:

$$h_{\text{ap}} = \operatorname{tg}\alpha_{\text{ap}} \times L_{\text{ex}} \quad (7)$$

2.4.2.3.2 *Cromátida de sección en forma de óvalo.* Es muy probable que los cromosomas al depositarse por centrifugación sobre las rejillas de microscopía electrónica (sección 2.3.5.1) resulten un tanto aplanados, de manera que la sección de sus cromátidas no fuera circular, sino en forma de óvalo (figura 2.4.1B). En este caso la mejor aproximación sería aplicar la fórmula:

$$h_o = \text{tg}\alpha_{\text{real}} \times L_1 \quad (8)$$

O si miramos la figura 2.4.1B:

$$DG = \text{tg}\alpha_{\text{real}} \times DB$$

Ya que:

$$DG \cong AH$$

$h_o = AH \cong DG \Rightarrow$ **Altura de la cromátida con sección en forma de óvalo.**

$\text{tg}\alpha_{\text{real}} \Rightarrow$ **Tangente del ángulo real de platinación.**

$L_1 = DB \Rightarrow$ **Longitud de la sombra medida a partir de la base de la cromátida.**

Si hubiéramos utilizado α_{ap} , habríamos calculado una altura inferior a la altura real del óvalo ($DE < AH$) (ver figura 2.4.1B).

El cálculo de α_{real} se efectuó por métodos gráficos a partir de los resultados obtenidos para las bolas de látex.

También en esta ocasión, h_o se determinó a partir de L_{ex} . Así pues:

$$h_o = \text{tg}\alpha_{\text{real}} \times L_{\text{ex}} \quad (9)$$

2.4.2.3.3 *Factores de corrección para h_c y h_o .* Cuando las muestras son platinadas unidireccionalmente, las bolas de látex que estamos utilizando como referencia, también son platinadas. Esto provoca que se acumule una pequeña cantidad de platino alrededor de las bolas. Por tanto, el diámetro que estamos midiendo en las micrografías es ligeramente superior al de las bolas sin platinar.

Para corregir esta diferencia de diámetros se procedió a medir diversas bolas situadas en la sombra de los cromosomas, y por tanto que no estaban platinadas. Los diámetros obtenidos eran de $0.090 \pm 0.03 \mu\text{m}$. Este dato además coincide con el diámetro dado por el fabricante ($0.091 \mu\text{m}$, Bal-Tec, 1992).

Los cromosomas también tienen la misma acumulación de platino en su superficie que las bolas de látex (aproximadamente $0.01 \mu\text{m}$). Sin embargo este valor en los cromosomas representa un % muy bajo respecto al tamaño del cuerpo que estamos midiendo (aproximadamente $0.6 \mu\text{m}$), mientras que en las bolas de látex la diferencia representa el 10%. Teniendo en cuenta que esta diferencia nos daría un error elevado en el cálculo de la $\text{tg}\alpha_{\text{ap}}$ y consecuentemente de las alturas calculadas a partir de este parámetro, decidimos aplicar un factor de corrección a las alturas obtenidas, utilizando el verdadero diámetro de las microesferas.

Altura corregida para h_c ($h_{c'}$)

$$\text{tg}\alpha'_{\text{ap}} = \phi' / L \quad (10)$$

$$\text{tg}\alpha_{\text{ap}} = \phi / L \quad (11)$$

$\text{tg}\alpha'_{\text{ap}} \Rightarrow$ Tangente del ángulo de platinación aparente corregida.

$\text{tg}\alpha_{\text{ap}} \Rightarrow$ Tangente del ángulo de platinación aparente sin corregir.

$\phi' \Rightarrow$ Diámetro corregido ($0.090 \pm 0.003 \mu\text{m}$) (bolas sin platinar).

$\phi \Rightarrow$ Diámetro sin corregir ($0.098 \pm 0.005 \mu\text{m}$) (bolas platinadas).

$L \Rightarrow$ Longitud de la sombra proyectada por la bola de látex.

$$\left. \begin{array}{l} \text{tg}\alpha'_{\text{ap}} = 0.090 / L \\ \text{tg}\alpha_{\text{ap}} = 0.098 / L \end{array} \right\}$$

De donde resulta:

$$\text{tg}\alpha'_{\text{ap}} = 0.92 \text{tg}\alpha_{\text{ap}}$$

Es decir:

$$h_{c'} = 0.92 h_c \quad (12)$$

Altura corregida para h_o (h_o')

A partir de $\text{tg}\alpha'_{\text{ap}}$, se determinó por un método gráfico teniendo en cuenta los datos obtenidos con bolas de látex, la $\text{tg}\alpha'_{\text{real}}$ (tangente del ángulo de platinación real, corregido). El factor de corrección se obtuvo a través del cociente:

$$\text{tg}\alpha'_{\text{real}} / \text{tg}\alpha_{\text{real}} = 0.91$$

Y por tanto:

$$h_o' = 0.91 h_o \quad (13)$$

Aun teniendo en cuenta estos factores de corrección, hay otro aspecto que nos influye sobre el cálculo de la altura de un cromosoma. Durante la platinación, la altura crece la mitad ($0.005 \mu\text{m}$) respecto del crecimiento del diámetro de la bola ($0.01 \mu\text{m}$). Esto hace que desconozcamos si la longitud de la sombra medida corresponde al diámetro total de la bola platinada ($0.1 \mu\text{m}$) o bien al grueso del platino en la parte norte de la bola ($0.95 \mu\text{m}$).

2.4.2.4 Determinación de la altura de una placa

Al igual que en la sección anterior, el cálculo de la altura de una placa se efectuó utilizando la técnica del platinado unidireccional. Con este fin, se determinó primero el ángulo de platinado aparente a partir de la medición del diámetro de las bolas de látex presentes en cada micrografía, y sus sombras proyectadas. Con estos datos se aplicó la expresión (2) descrita en la sección 2.4.2.1 y se obtuvo la tangente del ángulo aparente. Finalmente la altura aparente de las placas se calculó a través de la siguiente fórmula matemática:

$$h_{\text{ap}} = \text{tg}\alpha_{\text{ap}} \times L_{\text{ex}} \quad (14)$$

$h_{\text{ap}} \Rightarrow$ Altura aparente de la placa.

$\text{tg}\alpha_{\text{ap}} \Rightarrow$ Tangente del ángulo aparente de platinación.

$L_{ex} \Rightarrow$ Longitud de la sombra proyectada por la placa. La medición se efectuó desde la base de la placa hasta el final de la sombra, teniendo en cuenta la dirección del haz de platino.

Sin embargo, el ángulo aparente no es el apropiado para realizar el cálculo de la altura de una placa, puesto que este ángulo es inferior al ángulo de platinación real (ver figura 2.4.2)

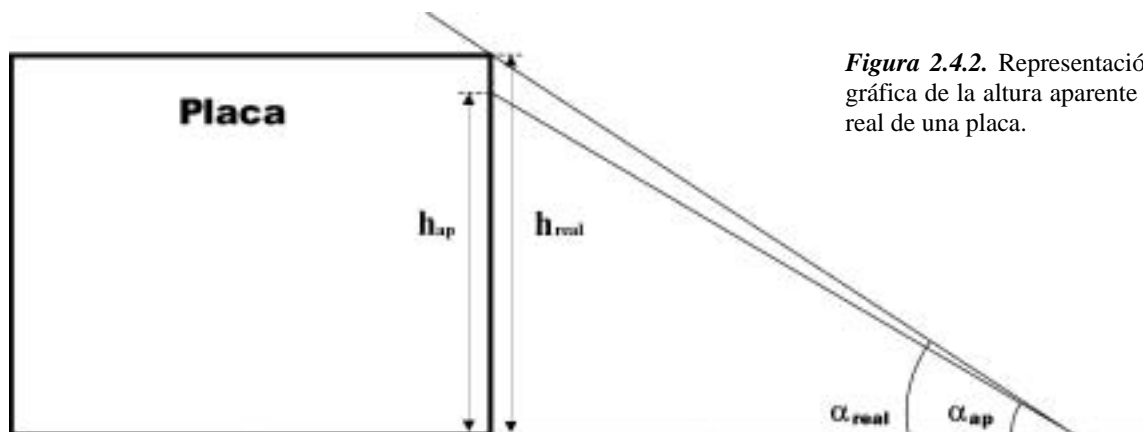


Figura 2.4.2. Representación gráfica de la altura aparente y real de una placa.

Así pues se determinó el ángulo real de platinación por métodos gráficos a partir de los datos obtenidos con bolas de látex y con este nuevo parámetro se realizó un nuevo cálculo corregido de la altura de las placas, aplicando la expresión:

$$h_{real} = \operatorname{tg}\alpha_{real} \times L_{ex} \quad (15)$$

$h_{real} \Rightarrow$ Altura real de la placa.

$\operatorname{tg}\alpha_{real} \Rightarrow$ Tangente del ángulo real de platinación.

$L_{ex} \Rightarrow$ Longitud de la sombra proyectada por la placa.

Finalmente, al igual que en la sección 2.4.2.3.3, se aplicó a ambas alturas calculadas, un factor de corrección que tenía en cuenta el verdadero diámetro de las bolas, en lugar del diámetro platinado. En caso de la altura aparente corregida (h_{ap}') se utilizó el factor de corrección calculado en (12), es decir:

$$h_{ap}' = 0.92 h_{ap} \quad (16)$$

Para la altura real corregida ($h_{\text{real}'}$) se aplicó el factor obtenido en (13), es decir:

$$h_{\text{real}'} = 0.91 h_{\text{real}} \quad (17)$$

2.4.3 Tratamiento informático de las imágenes

Las imágenes eran adquiridas digitalmente usando un escáner G5-700 Imaging Densitometer (Bio-Rad Laboratories) con una resolución de 600 ppi. Durante este proceso se tenía especial cuidado en no invertir las imágenes. Este aparato estaba conectado a un ordenador personal PC que permitía pasar las imágenes adquiridas a formato TIFF (tagged image file format), para su posterior tratamiento con programas de procesamiento de imágenes como Adobe PhotoshopTM 3.0 o Photostyler 2.0. Estos programas permitían incrementar el contraste. Finalmente, se motaban las figuras y se añadían barras de escala utilizando el software del programa Corel DrawTM versión 8.0.