

Estructura y propiedades de las placas  
de cromatina de los cromosomas  
metafásicos: Estudio mediante técnicas  
de microscopía TEM, AFM y  
Espectroscopia de Fuerza Atómica.

Isaac Gállego Ossul





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Estructura y propiedades de las placas de cromatina de  
los cromosomas metafásicos: Estudio mediante técnicas  
de microscopía TEM, AFM y Espectroscopia de  
Fuerza Atómica**

**Universitat Autònoma de Barcelona  
Departament de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultat de Biociències**

**Memoria presentada para adquirir el grado de doctor  
en Biotecnología por Isaac Gállego Ossul**

**Trabajo realizado en el Departament de Bioquímica i Biología  
Molecular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma  
de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Joan-Ramon Daban.**

**Isaac Gállego Ossul**

**Joan-Ramon Daban**

**Bellaterra, 1 de Julio de 2010**



# Índice general

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Componentes básicos del cromosoma eucariota</b>	<b>3</b>
1.1.	El DNA . . . . .	3
1.2.	Las histonas . . . . .	4
1.3.	Proteínas no histonas . . . . .	6
1.3.1.	El grupo de las HMGs . . . . .	7
1.3.2.	Las SMC: Condensinas y cohesinas . . . . .	8
1.3.3.	La topoisomerasa . . . . .	9
<b>2.</b>	<b>El nucleosoma</b>	<b>11</b>
2.1.	Composición y estructura . . . . .	11
2.2.	Flexibilidad nucleosomal . . . . .	13
<b>3.</b>	<b>Propiedades autoasociativas de las NCPs</b>	<b>15</b>
<b>4.</b>	<b>La fibra de cromatina</b>	<b>17</b>
4.1.	Dinámica de la cromatina . . . . .	17
4.2.	Visión clásica . . . . .	19
4.2.1.	Modelos del zigzag con el DNA <i>linker</i> cruzado . . . . .	20
4.2.1.1.	Modelo de zigzag tridimensional . . . . .	20
4.2.1.2.	Modelo de doble origen con el DNA <i>linker</i> cruzado . . . . .	21
4.2.2.	Modelo del solenoide . . . . .	22
4.3.	Nueva visión . . . . .	23
4.3.1.	El tetranucleosoma . . . . .	23
4.3.2.	El solenoide interdigitado compacto . . . . .	25
4.3.3.	Modelado bioinformático . . . . .	28
<b>5.</b>	<b>El cromosoma</b>	<b>31</b>
5.1.	Mitosis y el ciclo celular . . . . .	31
5.2.	El cromosoma interfásico . . . . .	34
5.3.	El proteoma del cromosoma metafásico . . . . .	35

5.4.	El cromosoma metafásico . . . . .	36
5.4.1.	Modelos basados en un <i>scaffold</i> proteico . . . . .	36
5.4.2.	Modelo de plegamiento helicoidal . . . . .	38
5.4.3.	Modelo de plegado jerárquico . . . . .	39
5.4.4.	Modelo basado en cromómeros . . . . .	40
5.4.5.	Modelos basados en propiedades dinámicas . . . . .	41
5.4.5.1.	Modelo de <i>network</i> de cromatina . . . . .	42
5.4.5.2.	Modelo <i>mixto</i> . . . . .	43
<b>6.</b>	<b>Microscopía de Sonda Próxima en Biología Molecular</b>	<b>47</b>
6.1.	Una breve historia . . . . .	47
6.2.	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) . . . . .	49
6.2.1.	AFM. ¿Cómo funciona? . . . . .	49
6.2.2.	Modo topográfico . . . . .	51
6.2.2.1.	<i>Contact mode</i> . . . . .	51
6.2.2.2.	<i>Amplitude Modulation (AM-AFM) mode</i> . . . . .	52
6.3.	Espectroscopia de Fuerza Atómica (AFS) . . . . .	53
6.3.1.	Conceptos básicos de AFS: Nanoindentación . . . . .	53
6.3.2.	El modelo de Hertz . . . . .	55
6.4.	Microscopía de Fuerza Lateral (LFM) . . . . .	56
6.4.1.	Historia y conceptos básicos de Tribología . . . . .	56
6.4.2.	LFM: Una herramienta para la Nanotribología . . . . .	58
<b>7.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>61</b>
<b>II</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Cultivos celulares</b>	<b>65</b>
8.1.	Establecimiento de un cultivo celular . . . . .	65
8.2.	Mantenimiento de un cultivo celular . . . . .	66
8.3.	Cultivo celular en presencia de colcemid® . . . . .	67
8.4.	Recuento de células . . . . .	68
<b>9.</b>	<b>Preparación de cromosomas metafásicos</b>	<b>71</b>
9.1.	Tampones utilizados . . . . .	71
9.2.	Obtención de las células . . . . .	72
9.3.	Extracción de cromosomas . . . . .	73
9.4.	Purificación en gradiente escalonado . . . . .	74
9.4.1.	Gradiente de sacarosa . . . . .	74
9.4.2.	Gradiente de glicerol . . . . .	75
9.5.	Diálisis exhaustiva de la muestra . . . . .	76
9.5.1.	Diálisis sobre rejilla . . . . .	76

9.5.2. Diálisis en solución . . . . .	76
9.6. Tratamiento mecánico de los cromosomas . . . . .	77
<b>10. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</b>	<b>79</b>
10.1. Sistemas de filtrado y eliminación de contaminantes . . . . .	79
10.2. Evaporación de carbono y carbono-platino . . . . .	80
10.3. Preparación de rejillas para microscopía electrónica . . . . .	81
10.4. Activación de las rejillas . . . . .	82
10.5. Extensión de la muestra en las rejillas . . . . .	83
10.5.1. Extensión por centrifugación . . . . .	83
10.5.2. Curación . . . . .	84
10.5.2.1. Curación sobre rejilla . . . . .	84
10.5.2.2. Curación en suspensión . . . . .	85
10.6. Tratamiento de los cromosomas en TEM . . . . .	85
10.6.1. Incubación a 37 °C . . . . .	85
10.6.2. Digestión con RNasa . . . . .	86
10.6.3. Desnaturalización parcial en presencia de NaCl . . . . .	86
10.6.3.1. Desnaturalización pre-entrecruzamiento . . . . .	87
10.6.3.2. Desnaturalización post-entrecruzamiento . . . . .	87
10.7. Entrecruzamiento de las muestras . . . . .	87
10.7.1. Entrecruzamiento en rejilla . . . . .	88
10.7.2. Entrecruzamiento en solución . . . . .	88
10.8. Lavado final y deshidratación de las muestras . . . . .	88
10.9. Tinción de las muestras . . . . .	89
10.9.1. Platinado unidireccional . . . . .	89
10.9.2. Platinado rotacional . . . . .	89
10.10. Observación y obtención de micrografías en TEM . . . . .	90
<b>11. AFM para el estudio de las placas de cromatina</b>	<b>93</b>
11.1. El microscopio AFM . . . . .	93
11.2. Partes del AFM . . . . .	95
11.2.1. El <i>holder</i> . . . . .	95
11.2.2. La sonda . . . . .	95
11.2.3. El detector . . . . .	97
11.2.4. El piezoeléctrico . . . . .	97
11.3. Accesorios de un equipo de AFM . . . . .	98
11.3.1. Aislamiento acústico/eléctrico . . . . .	98
11.3.2. Aislamiento mecánico . . . . .	99
11.4. Frecuencia de vibración de la punta en AM-AFM . . . . .	99
11.5. Eliminación de contaminantes en técnicas nanométricas . . . . .	100
11.5.1. Eliminación de contaminantes de la sonda . . . . .	100
11.5.2. Eliminación de contaminantes en el <i>holder</i> y en los accesorios . . . . .	100

11.6.	Modificaciones químicas de la punta de AFM . . . . .	101
11.6.1.	Puntas silanizadas . . . . .	101
11.6.2.	Puntas con psoralen <sup>®</sup> . . . . .	101
11.7.	Preparación del soporte de mica para AFM . . . . .	102
11.7.1.	Mica para imágenes topográficas y AFS . . . . .	102
11.7.2.	Mica para el análisis mediante LFM . . . . .	102
11.8.	Extensión de la muestra sobre mica . . . . .	103
11.8.1.	Extensión por centrifugación-curación . . . . .	103
11.8.2.	Extensión por adsorción y curación . . . . .	103
11.9.	Entrecruzamiento de las muestras en AFM . . . . .	104
11.10.	Secado de las muestras en AFM . . . . .	104
11.11.	Obtención de imágenes en AFM . . . . .	104
<b>12.</b>	<b>AFS y LFM para el estudio de las placas de cromatina</b>	<b>105</b>
12.1.	AFS: Nanoindentación . . . . .	105
12.1.1.	Calibración vertical de al punta . . . . .	105
12.1.2.	Adquisición de curvas $\Delta d_v$ vs. $\Delta z$ . . . . .	107
12.2.	LFM: Nanotribología . . . . .	107
12.2.1.	Calibración lateral del punta . . . . .	107
12.2.2.	Obtención de la curva $F_f$ vs. $F_v$ . . . . .	109
<b>13.</b>	<b>Desnaturalización de las placas en AFM y LFM</b>	<b>111</b>
13.1.	Agentes desnaturalizantes . . . . .	111
13.2.	Cálculo de actividad de la nucleasa micrococcal . . . . .	112
13.3.	Desnaturalización en tiempo real . . . . .	113
13.4.	Análisis de fricción en presencia de agentes desnaturalizantes . . . . .	113
13.4.1.	Adición . . . . .	114
13.4.2.	Cambio de medio . . . . .	114
<b>14.</b>	<b>Procesamiento de las imágenes y tratamiento de los datos</b>	<b>115</b>
14.1.	Procesamiento de las imágenes de TEM . . . . .	115
14.1.1.	Determinación de alturas . . . . .	115
14.2.	Procesamiento de las imágenes de AFM . . . . .	117
14.2.1.	Determinación de alturas a partir de secciones topográficas . . . . .	118
14.3.	Tratamiento de los datos de nanoindentación . . . . .	118
14.3.1.	Obtención de curvas $F_v$ vs. $\Delta z$ . . . . .	118
14.3.2.	Obtención de curvas $F_v$ vs. $\delta$ . . . . .	119
14.3.3.	Determinación de alturas a partir de curvas $F_v$ vs. $\delta$ . . . . .	119
14.3.4.	Cálculo del módulo de Young . . . . .	119
14.4.	Tratamiento de los datos de LFM . . . . .	120
14.4.1.	Obtención de las curvas $F_f$ vs. $F_v$ . . . . .	120
14.4.2.	Determinación del coeficiente de fricción ( $\mu$ ) . . . . .	121



<b>III RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
<b>15. Estudios del cromosoma metafásico mediante TEM</b>	<b>125</b>
15.1. Cromosomas purificados con gradiente escalonado . . . . .	125
15.2. Cromosomas dializados exhaustivamente en PME . . . . .	126
15.3. Controles realizados en TEM . . . . .	131
15.3.1. Rejillas sin muestra extendida . . . . .	131
15.3.2. Rejillas sin activación con Alcian blue . . . . .	131
15.3.3. Cromosomas entrecruzados en solución . . . . .	133
15.4. Cromosomas tratados mecánicamente . . . . .	135
15.4.1. Tratamiento con polytron y ultrasonidos . . . . .	135
15.4.2. Tratamiento con jeringuilla . . . . .	135
15.5. Cromosomas digeridos con RNasa . . . . .	138
15.6. Placas desnaturalizadas parcialmente en presencia de NaCl . . . . .	141
15.6.1. Desnaturalización pre-entrecruzamiento . . . . .	141
15.6.2. Desnaturalización post-entrecruzamiento . . . . .	141
15.7. Placas platinadas unidireccionalmente . . . . .	145
15.8. Placas después de realizar una curación . . . . .	145
<b>16. Visualización de placas en solución: Estudios mediante AFM</b>	<b>153</b>
16.1. Visualización de placas de cromatina estables en solución . . . . .	153
16.1.1. Imágenes obtenidas con el microscopio <i>Multimode</i> . . . . .	154
16.1.2. Imágenes obtenidas con el microscopio MFP 3D-BIO . . . . .	160
16.2. Controles en solución de AFM . . . . .	162
16.3. Placas visualizadas en diferentes concentraciones de $Mg^{2+}$ . . . . .	163
16.4. Placas visualizadas con puntas derivadas . . . . .	166
16.5. Placas multicapa . . . . .	166
16.6. Visualización de placas en <i>contact mode</i> . . . . .	169
16.7. Alteración estructural de la placa mediante raspados . . . . .	170
<b>17. AFS: Nanoindentación de la placa de cromatina</b>	<b>173</b>
17.1. Propiedades mecánicas de la placa de cromatina . . . . .	173
17.2. Determinación del módulo de Young de la placa de cromatina . . . . .	175
<b>18. Determinación de la altura de las placas de cromatina</b>	<b>177</b>
18.1. Distribución de alturas obtenidas con TEM . . . . .	177
18.2. Distribución de alturas obtenidas con AFM . . . . .	178
18.3. Distribución de alturas obtenida a partir de curvas $F_v$ vs. $\delta$ . . . . .	180
<b>19. Desnaturalización en tiempo real de las placas de cromatina</b>	<b>183</b>
19.1. Control de adición en tiempo real del tampón . . . . .	183
19.2. Placas desnaturalizadas por adición de EDTA . . . . .	183
19.3. Placas desnaturalizadas por adición de NaCl . . . . .	185

19.4. Digestión de las placas con proteasas . . . . .	190
19.5. Digestión de las placas con MNasa . . . . .	193
<b>20. Análisis nanotribológico de las placas de cromatina</b>	<b>199</b>
20.1. Determinación de $\mu$ en presencia de $Mg^{2+}$ . . . . .	199
20.2. Determinación de $\mu$ en presencia de EDTA . . . . .	201
20.3. Determinación de $\mu$ en presencia de NaCl . . . . .	203
20.4. Determinación de $\mu$ de placas digeridas con pronasa . . . . .	207
20.5. Determinación de $\mu$ de placas digeridas con MNasa . . . . .	212
20.5.1. Digestión mediante adición de MNasa . . . . .	212
20.5.2. Digestión con actividad controlada de MNasa . . . . .	213
<b>IV DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>219</b>
21. Condiciones de existencia de las placas de cromatina	221
22. Estructura y comportamiento mecánico de las placas	225
23. El DNA y las histonas como una red bidimensional en la placa	231
24. El cromosoma metafásico: La placa como elemento estructural	237
<b>V CONCLUSIONES</b>	<b>243</b>
25. Conclusiones	245
<b>VI BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>249</b>
Bibliografía	263
<b>VII APÉNDICES</b>	<b>265</b>
A. Símbolos y acrónimos	267
B. Publicaciones científicas derivadas de la tesis	271
C. Algo así como un agradecimiento	275

# Índice de figuras

1.1.	Dominios de plegamiento de histona . . . . .	5
1.2.	Estructura de las SMCs . . . . .	8
1.3.	Estructura del fragmento 92K de la topoisomerasa II . . . . .	10
2.1.	Representación del cristal de la partícula núcleo del nucleosoma	12
3.1.	Autoasociación de las NCPs . . . . .	16
4.1.	Modelo de zigzag tridimensional irregular . . . . .	21
4.2.	Modelo de la fibra de cromatina de doble origen . . . . .	22
4.3.	Modelo solenoidal de la fibra de cromatina . . . . .	23
4.4.	Modelo del tetranucleosoma . . . . .	24
4.5.	Modelo del solenoide interdigitado compacto . . . . .	26
4.6.	Modelo de solenoide interdigitado . . . . .	27
4.7.	Modelado bioinformático de la fibra de 30–40 nm . . . . .	29
5.1.	Esquema del ciclo celular . . . . .	32
5.2.	Proteoma del cromosoma metafásico . . . . .	35
5.3.	Modelo de cromosoma basado en un <i>scaffold</i> . . . . .	37
5.4.	Modelo helicoidal de cromosoma . . . . .	39
5.5.	Modelo jerárquico de plegado axial . . . . .	40
5.6.	Modelo de cromosoma basado en cromómeros . . . . .	41
5.7.	Modelo de <i>network</i> de cromatina . . . . .	43
5.8.	Modelo de cromosoma mixto . . . . .	44
6.1.	Esquema de funcionamiento de un AFM . . . . .	50
6.2.	Relación fotodetector- <i>cantilever</i> . . . . .	51
6.3.	Modos topográficos . . . . .	52
6.4.	AFS: Material blando vs. material rígido . . . . .	54
6.5.	Deflexión del <i>cantilever</i> en AFS . . . . .	55
6.6.	Modo operativo del LFM . . . . .	59
6.7.	<i>Loop</i> de fricción . . . . .	60

8.1.	Cámara de Neubauer. . . . .	68
8.2.	Esquema del equipo Countess™ . . . . .	69
9.1.	Gradiente de sacarosa . . . . .	75
9.2.	Gradiente de glicerol . . . . .	75
9.3.	Cámara diálisis abierta en rejilla . . . . .	76
10.1.	Sistema de centrifugación . . . . .	84
10.2.	Dispositivo para realizar cambios de medio . . . . .	86
10.3.	Platinación rotacional . . . . .	90
11.1.	Microscopio MFP 3D-BIO . . . . .	94
11.2.	Puntas de AFM . . . . .	96
11.3.	Relación punta-forma topográfica . . . . .	96
11.4.	Piezoeléctrico de un AFM . . . . .	98
11.5.	Compuestos usados en la modificación de las puntas . . . . .	101
12.1.	Sensibilidad del detector en AFM . . . . .	106
12.2.	Balance de fuerzas de fricción implicadas en el <i>grid</i> de calibración . . . . .	108
12.3.	Esquema experimental en LFM . . . . .	110
14.1.	Determinación de la altura de un placa . . . . .	117
15.1.	Cromosomas después de una purificación con gradiente . . . . .	126
15.2.	Cromosomas después de una diálisis exhaustiva . . . . .	128
15.3.	Cromosomas en presencia de PA . . . . .	129
15.4.	Cromosomas incubados en PME a 37°C . . . . .	130
15.5.	Ejemplo de un blanco de TEM . . . . .	131
15.6.	Cromosomas extendidos sobre rejillas sin Alcian blue . . . . .	132
15.7.	Cromatina entrecruzada en solución . . . . .	134
15.8.	Tratamiento mecánico con polytron y ultrasonidos . . . . .	136
15.9.	Tratamiento mecánico con jeringuilla . . . . .	138
15.10.	Digestión de los cromosomas con RNasa . . . . .	139
15.11.	Placas desnaturalizadas con NaCl antes del entrecruzamiento . . . . .	143
15.12.	Placas desnaturalizadas con NaCl después del entrecruzamiento . . . . .	144
15.13.	Placas platinadas unidireccionalmente . . . . .	147
15.14.	Cromatina curada sobre rejilla . . . . .	147
15.15.	Cromatina curada sobre rejilla y en solución . . . . .	150
16.1.	Placas visualizadas con el microscopio <i>Multimode</i> (Serie 1) . . . . .	155
16.2.	Placas visualizadas con el microscopio <i>Multimode</i> (Serie 2) . . . . .	157
16.3.	Placas visualizadas con el microscopio <i>Multimode</i> a elevada magnificación . . . . .	157

16.4. Placas visualizadas con el microscopio <i>Multimode</i> (Serie 3) . . .	159
16.5. Placas visualizadas con el microscopio MFP 3D-BIO . . . . .	160
16.6. Controles de AFM . . . . .	163
16.7. Placas visualizadas en presencia de diferentes concentraciones de $Mg^{2+}$ . . . . .	164
16.8. Placas visualizadas con puntas derivadas . . . . .	167
16.9. Placas que presentan formaciones multicapa . . . . .	168
16.10. Placas visualizadas mediante <i>contact mode</i> . . . . .	169
16.11. Placas a las que se les ha realizado un raspado (serie 1) . . . .	170
16.12. Placas a las que se les ha realizado un raspado (serie 2) . . . .	172
17.1. Curvas de $F_v$ vs. $\delta$ . . . . .	174
18.1. Histogramas de la distribución de alturas de las placas obteni- dos mediante TEM . . . . .	178
18.2. Histogramas de la distribución de alturas de las placas obteni- dos mediante AFM . . . . .	179
19.1. Blanco de desnaturalización en tiempo real. . . . .	184
19.2. Desnaturalización en tiempo real en presencia de EDTA . . . .	185
19.3. Desnaturalización en tiempo real en presencia de NaCl (serie 1)	187
19.4. Desnaturalización en tiempo real en presencia de NaCl (serie 2)	188
19.5. Desnaturalización en tiempo real en presencia de NaCl (serie 3)	189
19.6. Digestión en tiempo real con pronasa . . . . .	191
19.7. Digestión en tiempo real con tripsina . . . . .	192
19.8. Digestión en tiempo real con MNasa (serie 1) . . . . .	193
19.9. Digestión en tiempo real con MNasa (serie 2) . . . . .	195
19.10. Digestión en tiempo real con MNasa (serie 3) . . . . .	196
19.11. Digestión en tiempo real con MNasa (serie 4) . . . . .	197
20.1. $\mu$ de placas en presencia de $Mg^{2+}$ 20 mM . . . . .	200
20.2. $\mu$ de placas en presencia de EDTA (serie 1) . . . . .	202
20.3. $\mu$ de placas en presencia de EDTA (serie 2) . . . . .	203
20.4. $\mu$ de placas en presencia de NaCl (serie 1) . . . . .	205
20.5. $\mu$ de placas en presencia de NaCl (serie 2) . . . . .	206
20.6. $\mu$ de placas digeridas con pronasa 1/2 . . . . .	207
20.7. $\mu$ de placas digeridas con pronasa 1/5 y 1/10 . . . . .	209
20.8. $\mu$ de placas digeridas con pronasa 1/20 y 1/400 . . . . .	211
20.9. $\mu$ de las placas después de añadir MNasa . . . . .	213
20.10. $\mu$ de las placas digeridas con MNasa 1/10 . . . . .	214
20.11. $\mu$ de las placas digeridas con MNasa 1/50 y 1/100 . . . . .	216
20.12. $\mu$ de las placas digeridas con MNasa 1/500 y 1/5000 . . . . .	217

23.1. Esquema de fricción sobre una placa digerida con MNasa . . .	236
24.1. Modelo de cromosoma basado en placas delgadas . . . . .	239

# Índice de Tablas

9.1. Tampones utilizados . . . . .	72
10.1. Sistemas de filtración . . . . .	80
10.2. Evaporación de carbono y carbono-platino . . . . .	81
15.1. Condiciones de existencia ensayadas . . . . .	151
18.1. Alturas aparentes obtenidas mediante AFM . . . . .	180
20.1. Tabla de coeficientes de fricción . . . . .	218
21.1. Solubilidad de las sales . . . . .	222
22.1. Altura de la placa de cromatina . . . . .	227





# Miscelánea

## Un elefante en la oscuridad

Un elefante que se exhibía por las ciudades y los pueblos quedó alojado en el establo de un lugar donde nadie había visto jamás a un animal de su especie. Cuatro curiosos, enterados de la existencia de aquella maravilla, pretendieron verla antes que los demás. Pero ocurrió que en el establo no había luz, y su investigación tuvo que realizarse en la oscuridad. Al palparle la trompa, uno de ellos se dijo que el animal debía de ser parecido a una manguera. El segundo, tocándole una oreja, llegó a la conclusión de que se asemejaba a un abanico. El tercero al dar con una pata, lo calificó de columna viviente. El cuarto le puso una mano en el lomo y aseguró que era una especie de trono. Ninguno pudo formar la imagen completa; y la parte que cada uno tocó sólo pudieron expresarla mediante referencia a cosas que ya conocían. El resultado fue una confusión total. Cada cual quería tener la razón y cuando lo contaron a los demás, nadie pudo saber qué era lo que en realidad habían experimentado los investigadores.

(Relato Sufí, Idires Shah)



Parte I

# INTRODUCCIÓN



# Capítulo 1

## Componentes básicos del cromosoma eucariota

*El material genético en la célula eucariota humana está confinado en el núcleo y está compuesto básicamente por DNA e histonas. Aparte de estos elementos, existe un elevado número de factores y enzimas que se encargan de regular todos los procesos que intervienen en la conservación, transferencia y traducción de la información a lo largo del ciclo celular. Pero de todos estos elementos sólo algunos tienen un papel importante en la formación y mantenimiento del cromosoma metafásico, tal como se comentará a continuación.*

### 1.1. El DNA

El DNA es una molécula compuesta por dos polinucleótidos antiparalelos dispuestos helicoidalmente. Cada nucleótido está compuesto por un fosfato y una pentosa (2'-desoxiribosa) a la cual hay unida una base nitrogenada. El DNA siempre contiene la misma cantidad de la base adenina (A) que de la timina (T), y de guanina (G) que de citosina (C). En la formación de la doble hélice intervienen las bases nitrogenadas, entre las que se establecen puentes de hidrógeno disponiendo de forma opuesta los pares indicados arriba a lo largo de la cadena (Watson y Crick, 1953).

Uno de los primeros problemas que nos encontramos al abordar el tema del material genético desde un punto de vista estructural, es un problema dimensional. Es decir, cómo la célula es capaz de introducir el genoma entero ( $\sim 3 \times 10^9$  pb con  $\sim 1$  m de longitud) en el interior del núcleo celular, que tiene un diámetro de  $\sim 10^{-5}$  m (Wolffe, 1998). Esta gran desproporción dimensional implica que el DNA está altamente empaquetado. Además, este alto empaquetamiento ha de ir asociado a una gran organización del DNA en el interior del núcleo celular que permita la correcta acción de las diversas enzimas y factores que intervienen en el proceso de

expresión y regulación génica. El caso más extremo es durante la mitosis, momento en el cual el cromosoma se compacta formando las cromátides del cromosoma mitótico hasta llegar a la metafase, punto de mayor compactación del cromosoma. En esta fase hay una elevada concentración del DNA. Si hacemos uso de la relación de empaquetamiento lineal<sup>1</sup> la cromátide metafásica reduce en un factor de  $10^4$  la longitud del DNA. Por ejemplo, en el caso del cromosoma 4 humano, que tiene  $1.15 \times 10^8$  pb, equivalente a una longitud total de  $\sim 4 \times 10^4 \mu\text{m}$ , se compacta en una cromátide de  $3.15 \mu\text{m}$  de longitud (Pienta y Coffey, 1984). Aunque la relación de empaquetamiento lineal es muy visual y parece una manera adecuada para evaluar el grado de empaquetamiento, en realidad, la forma más realista de evaluar y validar el grado de compactación del DNA en una estructura de orden superior, es a partir de su concentración local, siendo el nucleosoma (0.3–0.4 g DNA/ml) el elemento de máxima concentración local. Por ejemplo, un núcleo pequeño de célula eucariota ( $\sim 5 \mu\text{m}$ ) alcanza una concentración relativamente alta de DNA en la interfase (alrededor de 0.10 g/ml). En cambio, el cromosoma metafásico tiene una mayor concentración local de DNA en su interior, conteniendo una concentración promedio de  $\sim 0.17$  g/ml (Daban, 2000).

El DNA en la célula eucariota alcanza el nivel máximo de compactación siguiendo diferentes grados de empaquetamiento, que tienen lugar gracias a la interacción del DNA con diferentes proteínas, que guían el proceso de plegado. El complejo DNA-proteína que se establece se llama comúnmente cromatina. Es muy importante conocer las propiedades estructurales de la cromatina para poder interpretar adecuadamente su función a lo largo del ciclo celular y para determinar el papel estructural que juega en la formación del cromosoma metafásico. Estos puntos son clave en el mantenimiento y la transferencia del material hereditario en los diversos ciclos de división.

## 1.2. Las histonas

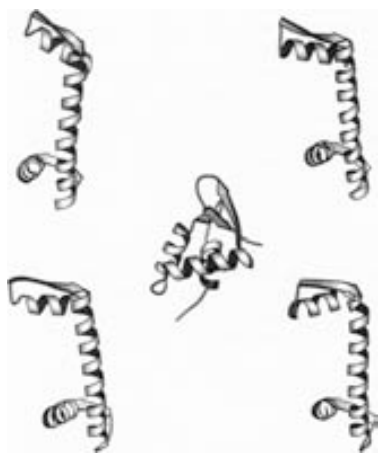
Las proteínas principales que intervienen en el plegado del DNA son las histonas y por lo tanto son las proteínas más abundantes en el núcleo celular. A parte de las interacciones con el DNA, establecen contactos proteína-proteína con otras proteínas cromosómicas. Las histonas, son de las moléculas más conservadas evolutivamente debido al importantísimo papel que desempeñan: El mantenimiento de la integridad estructural del DNA (Wolffe, 1998).

Cada nucleosoma contiene un par de las 4 histonas núcleo: H2A (129 aa, 14 kDa), H2B (125 aa, 13.9 kDa), H3 (135 aa, 15.3 kDa) y la H4 (102 aa, 11.4 kDa); y una histona de unión H1 (226 aa, 21.9 kDa; o H5 en aves). Las histonas se caracterizan

---

<sup>1</sup>La relación de empaquetamiento lineal (*Linear Packing Ratio*) es la relación existente entre la longitud del fragmento de DNA extendido y la longitud de la estructura que lo contiene. Por lo tanto, nos indica el grado de empaquetamiento del DNA por parte de la estructura que lo contiene.

por tener una gran cantidad de aminoácidos básicos (lisinas y argininas). Las histonas núcleo tienen una longitud y secuencia altamente conservadas a lo largo de la evolución. La H3 y H4 son las más conservadas, en cambio las histonas H2A y H2B no lo son tanto. Por ejemplo, la histona H4 de ternera y la de guisante se diferencian en 2 aa de un total de 102 (DeLange et al., 1969). Este hecho puede ser debido a que las histonas H3 y H4 tienen un papel central en los procesos de regulación del empaquetamiento de la cromatina. Las cuatro histonas núcleo contienen un dominio de plegamiento de histona (Figura 1.1), formado por  $\sim 65$  residuos (compuesto por una hélice  $\alpha$  larga flanqueada por dos hélices  $\alpha$  más cortas en el extremo C-terminal a través del cual se establecen los contactos proteína-proteína y proteína-DNA) y las colas N-terminal cargadas que contienen la mayoría de las lisinas (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Estos dominios cargados son los puntos en los que tienen lugar las modificaciones postraduccionales (acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ...), que son determinantes en la modulación de la dinámica de formación de estructuras de orden superior de la cromatina (Hansen, 2002). Este fenómeno parece que es debido a que las colas de las histonas interactúan con el DNA neutralizando sus cargas (Hansen et al., 1998), de manera que la eliminación de las colas de la H3 y la H4, mediante digestión triptica, inhibe el plegado de la fibra de cromatina incluso en presencia de altas concentraciones de  $Mg^{2+}$  (Schwarz et al., 1996).



**Figura 1.1: Estructura del dominio de plegamiento de histona.** En el orden de las agujas del reloj desde arriba a la izquierda encontramos el dominio de la H2A, H2B, H4 y la H3. Para comparar, la estructura de la zona globular de la histona H1 se muestra en el centro de la imagen. Figura procedente de Arents y Moudrianakis (1995).

El uso de elevadas concentraciones de NaCl permitió realizar los primeros estudios con nucleosomas que indicaban que la H2A y la H2B eran las primeras en disociarse, seguidas de la H3 y la H4. Estudios de este tipo permitieron establecer que el par H2A y H2B formaban heterodímeros (H2A-H2B), y en cambio la H3 y la H4 formaban un heterotetrámero  $(H3-H4)_2$  en ausencia de DNA (Kornberg, 1974; Kornberg y Thomas, 1974). Más tarde, se sugirió que el conjunto formaba un octámero compuesto por un heterotetrámero  $(H3-H4)_2$  y dos heterodímeros (H2A-H2B) (Thomas y Kornberg, 1975). Finalmente, la cristalización del octámero a una resolución de 3.1 Å dejaba de manifiesto que el octámero de histonas estaba compuesto

por un tetrámero central de  $(H3-H4)_2$  flanqueado por dos dímeros de  $(H2A-H2B)$  y que además presentaba una rampa helicoidal cargada positivamente, que podía ser el lugar por donde pasaba el DNA al rodear el octámero (Arents et al., 1991; Arents y Moudrianakis, 1993).

Por último, queda hablar de la histona de unión (*linker histone*) que está presente en los organismos eucariotas, la más común es la histona H1 (H5 en aves). La histona *linker* es muy básica, un poco más grande que el resto de las histonas (mirar arriba) y en general está compuesta por un C-terminal largo, un dominio globular central estructurado que no presenta el plegamiento de histona (Ramakrishnan et al., 1993), y un N-terminal corto (Hansen, 2002). La histona *linker*, se une al los 20 pb de DNA que hay en la zona de entrada y salida del nucleosoma. Recientemente, se ha observado que el extremo C-terminal de la histona H1 presenta una estructura desorganizada (*molten globule*) cuando está libre y al unirse al DNA se organiza adoptando estructura secundaria. Este hecho sugiere que el estado de *molten globule* puede facilitar la difusión de la H1 (Roque et al., 2005, 2007). Estudios realizados mediante FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) demuestran que el recambio de la H1 es muy dinámico incluso en el cromosoma mitótico, y por el contrario las histonas nucleares como la H3 carecen de esta libertad de movimiento (Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000).

En la mayoría de los organismos los genes de las histonas existen en múltiples copias y en consecuencia el conjunto de histonas está compuesto por variantes no alélicas. Estas variantes se suelen clasificar en: Variantes homomorfas y heteromorfas. Las diferencias existentes entre el grupo de las homomorfas afecta a unos pocos aminoácidos. Dentro de este grupo podemos encontrar la H2A.1 y la H2A.2 o las H3.1, la H3.2 y la H3.3. Estas pequeñas diferencias pueden visualizarse mediante un gel electroforético de poliacrilamida en presencia de detergentes no iónicos. El grupo de las heteromorfas, como es el caso de la macroH2A, a la que le sigue una larga lista, se pueden diferenciar en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Las variantes heteromorfas suelen desempeñar claramente un papel estructural y funcional. Las variantes histónicas suelen desempeñar funciones específicas, como es el caso de la H2A.X, que se encuentra asociada lugares en los que hay una rotura de la doble hebra; la proteína centromérica A (CENP-A), que es una variante de la H3, está localizada en los centrómeros de los cromosomas eucarióticos (Ausió et al., 2001).

### 1.3. Proteínas no histonas

Las proteínas que podemos encontrar asociadas al cromosoma metafásico tradicionalmente se han clasificado en dos categorías, las proteínas histonas y las proteínas no histonas. Las histonas representan un grupo bien caracterizado, como se ha comentado en el capítulo anterior. Su estequiometría y cantidad respecto al DNA es



prácticamente constantes. Las proteínas no histonas del cromosoma son el resto de proteínas que se pueden extraer junto al cromosoma; es un conjunto que está compuesto por un gran número de proteínas. Dentro de este conjunto se encuentra una gran variedad de proteínas con localizaciones celulares diversas que se engloban en 5 grandes grupos: Enzimas unidos a la cromatina, proteínas reguladoras, receptores hormonales proteicos, proteínas de alta movilidad (HMG) y proteínas asociadas a la estructura del *scaffold* cromosómico (van Holde, 1989). En las siguientes secciones se van a comentar las proteínas que históricamente han tenido un papel importante por su supuesta relación en la estructura y función en el cromosoma metafásico.

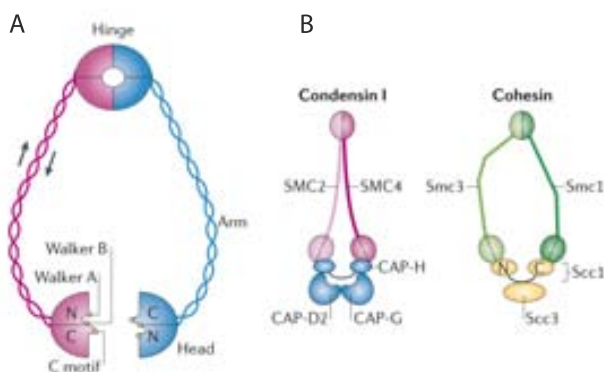
### 1.3.1. El grupo de las HMGs

La metodología empleada en los inicios del fraccionamiento de la histona H1 hacía uso de ácido perclórico. Después del uso de concentraciones moderadas de NaCl (0.35 M) obtenían el mismo resultado. La adición de ácido tricloroacético (2 %) a este extracto de proteínas lo separaba en una fracción insoluble de proteínas grandes (LMG o *Low Mobility Group*, cuando se observaba la movilidad electroforética) y una fracción soluble de pequeñas proteínas (un grupo de proteínas con una alta movilidad durante la electroforesis, HMGs). Las HMG (*High Mobility Group*) son las proteínas más abundantes en el cromosoma después de las histonas (ver Figura 5.2, pág. 35). Debido a la gran cantidad de proteínas englobadas en este término, en 2001 se revisó la nomenclatura de las HMGs (Bustin, 2001), de manera que actualmente se subdividen en tres grandes grupos: Las HMGA, las HMGB y las HMGN. Las HMGB1 y 2 (antiguas HMG-1/2) son un par de proteínas homólogas de 29 kDa y las HMGN1 y 2 (antiguas HMG-14/17) tienen un peso de 10-12 kDa. El contenido de HMGN1 y 2 es similar al de la histona H1 (está por encima del 10 % en peso del DNA). También hay otro pequeño grupo de HMGs, como son la HMGA1 y 2 (antigua HMG-I/Y) que se unen a las secuencias satélite del centrómero. Las HMGs son “factores de arquitectura” accesorios involucrados en la modulación del nucleosoma y la estructura de la cromatina, dirigiendo de forma eficiente la participación de otras proteínas de vital importancia para el núcleo en procesos como la transcripción, replicación y la reparación del DNA. En las células en estado normal la expresión de las HMGs está altamente regulada e influenciada tanto por factores de desarrollo, como por factores ambientales (Reeves, 2010). A diferencia de las histonas, las HMG tienen aa acídicos y también básicos. En estas proteínas existe un dominio HMG por el que pueden interactuar con el DNA nucleosomal y preferentemente con el DNA desnudo (Wolffe, 1998). De hecho las familias HMGA, HMGB y HMGN se distinguen entre ellas por sus motivos de interacción con el DNA, por los substratos a los cuales se unen, los cambios que inducen sobre ellos y por la influencia que ejercen sobre una serie de procesos celulares (Reeves, 2010). Por ejemplo, HMGB1 es una chaperona que tiene una actividad contraria a la H1 actuando como estimulador de la transcripción. Esta actividad es debida al efecto desestructurante que tiene sobre

la cromatina al unirse en la zona de entrada y salida del DNA en el nucleosoma (compitiendo con la H1). Esto facilita la entrada de proteínas remodeladoras de la cromatina induciendo el deslizamiento de los nucleosomas y facilitando el proceso de transcripción (Bonaldi et al., 2002).

### 1.3.2. Las SMC: Condensinas y cohesinas

En los modelos clásicos de cromosoma metafásico se considera la presencia de un *scaffold* proteico (ver sección 5.4.1) compuesto por las proteínas SCI y SCII, que después se identificaron como la topoisomerasa II $\alpha$  y la CAP-E (subunidad de los complejos condensina I y II; Belmont, 2006). Esta última pertenece al grupo de las proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) y como su nombre indica se asocian a la dinámica de plegado y mantenimiento de la estructura del cromosoma mitótico. En general, las SMC son polipéptidos muy largos (1000–1300 aa) con un único dominio de organización. Tienen dos motivos canónicos de unión a nucleótidos, conocidos como *Walker A* y *Walker B*, que están ubicados separadamente en el extremo N- y C-terminal respectivamente. Estos dos motivos están separados por un motivo *coiled-coil* que está conectado por una secuencia no helicoidal de forma antiparalela. Esta disposición antiparalela dispone una cabeza ATPásica, que es activa cuando se unen los extremos N- y C-terminal, en un lado y una bisagra en el otro. La longitud de los monómeros es de  $\sim 50$  nm ( $\sim 150$  pb) y se asocian a través de la bisagra formando una estructura con forma de V (Ver Figura 1.2; Hirano, 2006). Las SMC son un grupo de proteínas que en eucariotas está compuesto por 6 factores diferentes (SMC-1/SMC-6) que se asocian en complejos específicos con subunidades no SMC (Gassmann et al., 2004).



**Figura 1.2: Estructura de las SMCs.** (A) Arquitectura básica del dímero que compone las SMC. Cada subunidad de SMC se autoplega antiparalelamente a través de interacciones *coiled-coil* (el plegado antiparalelo está indicado por las flechas) formando un dominio de bisagra en una lado y la cabeza con el dominio de unión a ATP en el otro. (B) Esquema de los complejos proteicos SMC condensina I y cohesina. En los dos casos se componen por un heterodímero de SMC y 3 (condensina) ó 2 (cohesina) componentes no SMC. Figura adaptada de Hirano (2006).

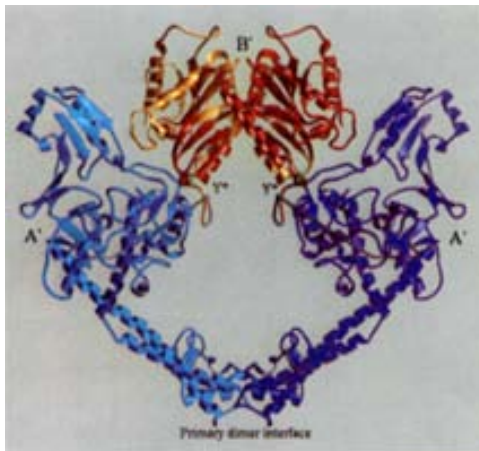
El complejo más estudiado dentro de las SMC es el de la condensina. La condensina consta de 5 subunidades proteicas (13s), el núcleo de la cual está formado por

un heterodímero de los factores SMC-2 y SMC-4 (Hirano, 1998). La combinación de las subunidades no SMC da lugar a la condensina I/II (Gassmann et al., 2004). La otra SMC importante es la cohesina, que consta de 4 subunidades y está compuesta por un heterodímero de SMC1/SMC3 y dos proteínas no SMC, la SA1 y SA2 en mamíferos (Nasmyth y Haering, 2009). Se sabe que las condensinas tienen afinidad por el dsDNA y las cohesinas por dos cadenas de dsDNA (Hirano, 2006). Se ha sugerido que la condensina interviene en la dinámica de los cromosomas, además de tener un papel en la topología de la cromatina durante el proceso de la condensación (Hirano, 2000). Hay indicios de que las condensina I y II están localizadas de forma alterna en el eje cromosómico (Ono et al., 2003). Las cohesinas se han considerado como un elemento importante en la cohesión y la segregación de las cromátides (Ishiguro y Watanabe, 2007). Aún así, el mecanismo a través del cual actúan la condensina y la cohesina es controvertido (Belmont, 2002; Gassmann et al., 2004; Belmont, 2006; Hirano, 2006). Recientes estudios de *knok out* y *knock down* de la condensina I y II indican que la presencia de estos factores no es imprescindible para la compactación de la cromatina y la formación del cromosoma metafásico humano (Savvidou et al., 2005).

### 1.3.3. La topoisomerasa

Como se ha comentado en el apartado anterior es la proteína SCI encontrada en el *scaffold* proteico, después conocida como topoisomerasa II $\alpha$  (Earnshaw et al., 1985; Gasser et al., 1986). La actividad de esta enzima consiste en un ciclo de rotura del DNA, el transporte de una cadena de dsDNA diferente a través de la cadena abierta y volver a unir el fragmento abierto. Todo ello acoplado a la unión e hidrólisis de ATP (Berger et al., 1996). Por lo tanto, resuelve posibles problemas topológicos formados en el interior del cromosoma durante la condensación. La topoisomerasa II está constituida por un homodímero, cada monómero (1429 aa) que consta de un dominio ATPasa y un dominio  $A'$  y  $B'$ . Berger et al. (1996) fueron los primeros en cristalizar lo que llamaron como 92K topoisomerasa II de levadura, fragmento que contenía exclusivamente los dominios  $A'$  y  $B'$  sin el dominio ATPasa ni una porción del extremo C-terminal (ver Figura 1.3). En mamíferos existen dos isoformas de esta enzima codificados en genes diferentes, la topoisomerasa II $\alpha$  (170 kDa) y la topoisomerasa II $\beta$  (180 kDa). La  $\alpha$  se expresa exclusivamente durante la mitosis y la  $\beta$  es ubicua durante todo el ciclo celular (Woessner et al., 1991).

Se ha hipotetizado el papel estructural de la topoisomerasa II debido a su amplia distribución en las cromátides. Saitoh y Laemmli (1994) propusieron a la topoisomerasa II $\alpha$  como punto de anclaje de los lazos de DNA a través de las secuencias SARs (*Scaffold-Associated Regions*), y se le ha atribuido un papel indispensable en la condensación de los cromosomas, ya que se observó que la inhibición o inmunoinactivación de la topoisomerasa II $\alpha$  inhibía la condensación de estos (Giménez-Abián et al., 1995). Por el contrario estudios posteriores realizados en *Xenopus leavis*, en



**Figura 1.3: Estructura del fragmento 92K de la topoisomerasa II de levadura.** El subfragmento B' está coloreado de color rojo y el A' de color azul. Las subunidades que pertenecen a una subunidad están de un color más oscuro que su pareja. Y\* indica la posición de las tirosinas activas que se esquematizan con una esfera de color verde. Figura adaptada de Berger et al. (1996).

los que se eliminaba la topoisomerasa II, sugerían que no era necesaria para el mantenimiento de la estructura del cromosoma (Hirano y Mitchison, 1993). Este hecho hizo replantearse seriamente a principios de siglo el papel de la topoisomerasa II en la condensación del cromosoma (Hirano, 2000; Giménez-Abián y Clarke, 2003). Estudios más recientes en los que se ha realizado un *knock out* condicional de la topoisomerasa II $\alpha$  y la inhibición dual de la topoisomerasa II $\alpha$  y la  $\beta$  (Carpenter y Porter, 2004), el *knock down* de la topoisomerasa II (Chang et al., 2003) o ambas la II $\alpha$  y  $\beta$  (Sakaguchi y Kikuchi, 2004) indican claramente que se puede producir la condensación del cromosoma en ausencia de la topoisomerasa II $\alpha$ , pero se puede ver afectada en cierta manera la dinámica del proceso. Por lo tanto, actualmente, en el campo de la estructura del cromosoma metafásico parece bastante claro que el papel de la topoisomerasa II $\alpha$  no es fundamental en la condensación (Belmont, 2006; Marko, 2008).

También se ha desmentido el papel de la topoisomerasa II en la formación del *scaffold* cromosómico. Recientes estudios de FRAP han dejado de manifiesto que la topoisomerasa II $\alpha$  es un elemento móvil (Tavormina et al., 2002; Christensen et al., 2002) y por lo tanto no constituye ningún elemento estático atribuible a un *scaffold*. Por el contrario, sí que puede tener un papel importante a nivel local gracias a su capacidad para resolver “enredos” de DNA en el interior de cromosoma metafásico, ya que recientemente se ha demostrado que la topoisomerasa II $\alpha$  es capaz de reducir la rigidez elástica de los cromosomas (Kawamura et al., 2010).

# Capítulo 2

## El nucleosoma

*El nucleosoma es la unidad fundamental repetitiva de la cromatina y por lo tanto del cromosoma eucariota. Constituye el primer nivel de plegamiento del DNA por lo que de sus propiedades estructurales y funcionales se deriva el comportamiento general de la cromatina.*

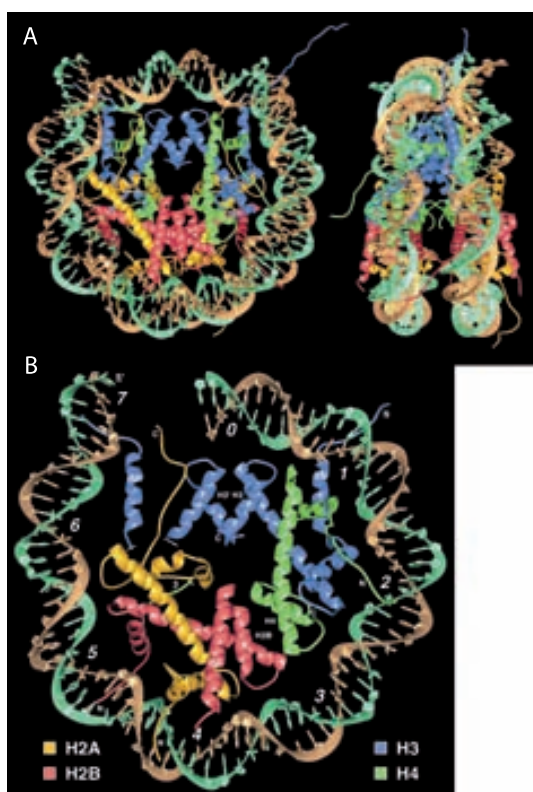
### 2.1. Composición y estructura

La existencia de una subunidad repetida (denominada posteriormente nucleosoma) fue descrita por primera vez por Hewish y Burgoyne (1973) cuando observaron que al realizar una electroforesis de DNA después de digerir el genoma entero con nucleasa micrococcal (MNasa), este presentaba un patrón discreto de corte que aproximadamente se producía cada 180–200 pb. Estos datos, junto al aislamiento de un complejo DNA-proteína después de una digestión extensiva con MNasa (Sahasrabudde y Van Holde, 1974), la observación mediante microscopía electrónica de un “collar de perlas” que indicaba una discontinuidad de la cromatina (Olins y Olins, 1974), y los experimentos de entrecruzamiento de las histonas del core (Kornberg y Thomas, 1974), permitió a Kornberg (1974) la proposición de un modelo de nucleosoma, en el que cada partícula estaba formada por DNA e histonas. En este modelo, el DNA estaba asociado a un octámero de histonas núcleo y cada octámero estaba formado por un heterotetrámero (H3-H4)<sub>2</sub> y dos heterodímeros (H2A-H2B), como se explicó en la sección 1.2.

El nucleosoma está compuesto por la partícula núcleo (NCP), la histona H1 (la NCP+H1 con 20 pb asociados se conoce como cromatosoma) y el DNA *linker* (20–90 pb en función de la especie) conteniendo un total de ~200 pb. La NCP está formada por un octámero de histonas (compuesto por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4), al que se le unen 146 pb de DNA según los datos de digestión con MNasa (Wolffe, 1998).

En la partícula núcleo, el DNA da 1.75 vueltas en sentido antihorario gracias a la

disposición de las cargas positivas de las histonas formando una rampa helicoidal por la que el DNA interacciona con el octámero (Arents et al., 1991). El octámero consta de un tetrámero de  $(H3-H4)_2$  flanqueado por dos dímeros de H2A-H2B (Arents et al., 1991; Arents y Moudrianakis, 1993; ver sección 1.2). Finalmente la unión de una molécula de H1 o H5 completa el nucleosoma. Esta histona se sitúa en la zona de entrada y salida del DNA en el nucleosoma como si fuera un pasador (Thoma et al., 1979). La unión de la H1 proporciona estabilidad en la interacción entre el octámero de histonas y el DNA (Simpson, 1978) evitando los fenómenos de deslizamiento del octámero respecto al DNA, proceso fundamental en la regulación de la expresión génica (ver sección 1.3.1) y en la dinámica de plegado (Thoma et al., 1979; ver sección 4.1) .



**Figura 2.1: Representación del cristal de la partícula núcleo del nucleosoma.** (A) Partícula núcleo del nucleosoma en la que se esquetizan las 146 pb del DNA (marrón y turquesa) y la cadena principal de las ocho histonas (azul: H3; verde: H4; amarillo: H2A; rojo: H2B). Las vista está de bajada para la superhélice de DNA en la partícula de la izquierda y perpendicular a esta en el de la derecha. Para las dos partículas el eje de simetría está dispuesto en la parte superior. (B) Esquema de la mitad del nucleosoma (73 pb) con el eje de simetría dispuesto verticalmente. El centro del nucleosoma está representado por el valor 0 hasta dar una vuelta al nucleosoma (7), cada número indica una vuelta de superhélice de DNA más. Figura adaptada de Luger et al. (1997).

El primer cristal de alta resolución ( $2.8 \text{ \AA}$ ) de la partícula núcleo (ver figura 2.1) se obtuvo en el laboratorio de T. J. Richmond, a partir del cual se pudo determinar como el DNA, a través de la cadena azúcar-fosfato, y el octámero de histonas interaccionan mayoritariamente mediante fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno. La interacción entre el DNA y las histonas se establece a través de 8 motivos de plegamiento histona dispuestos a lo largo de la rampa helicoidal (Luger et al., 1997). Este estudio, a elevada resolución, de las partículas núcleo sólo permite ubicar

aproximadamente la tercera parte de las colas de las histonas, que contienen gran cantidad de residuos cargados positivamente. Esto es debido a que las colas de las histonas son muy móviles. Parte de las colas están proyectadas hacia el exterior del nucleosoma, lo cual sugiere que estas pueden establecer interacciones con nucleosomas adyacentes (Luger et al., 1997) y con el DNA *linker*, influenciando el proceso de plegado de la cromatina (Widom, 1998). Estudios posteriores permitieron determinar que las NCPs tienen una asimetría dorso-ventral con respecto al trazo del DNA (Harp et al., 2000).

## 2.2. Flexibilidad nucleosomal

Como se ha podido observar a lo largo de la introducción y como es de esperar para un sistema químico supramolecular, el nucleosoma es dinámico y podríamos decir que “difuso” debido a que la entidad que conocemos como nucleosoma no es más que un esquema “fijado de forma idealizada en nuestras mentes” (van Holde y Zlatanova, 1999). Probablemente éste es un problema recurrente en casi todo tipo de concepto susceptible de ser modelado en Biología.

Pero centrándonos en el nucleosoma, siempre pensamos en el concepto canónico, cerrado y estático, que tenemos en mente de un octámero que forma un disco, con una cierta forma de cuña, sobre el cual 200 pb se le enrollan rodeándolo 1.7 veces para que, finalmente, la H1 se una estabilizando el complejo (ver arriba). Esta visión está muy lejos de la realidad dinámica del conjunto de un heterotetrámero de  $(H3-H4)_2$ , dos heterodímeros de H2A-H2B y una muy dinámica H1 (Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000) unidos a  $\sim 200$  pb de DNA. Desde los años 80 se sabe que hay una realidad muy diferente en la que el nucleosoma canónico (más correctamente nombrado como L-octasoma) comparte protagonismo con otras formas nucleoprotéicas, desde los nucleodisomas hasta los reversomas (Lavelle y Prunell, 2007). De hecho, estas formas o variantes estructurales pueden estar conviviendo en la complejidad de lo que conocemos como cromatina ya sea interfásica o mitótica, participando en los procesos de transcripción o formando parte de la dinámica nucleosomal en el interior de estructuras de orden superior. Dentro de las variantes del L-octasoma podemos encontrar: El lexosoma que como característica tiene que expone las cisteínas 110 de las H3, residuos (localizados en la interficie H3/H3) inaccesibles en el nucleosoma estandar. El tetrasoma partícula que contiene únicamente unido el tetrámero de  $(H3-H4)_2$  al perder los dos dímeros de H2A-H2B y el R-tertrasoma que contiene una vuelta de DNA en el sentido horario (R) al enroscarse sobre el tetrámero. El hexasoma que consiste en una forma del nucleosoma canónico en la que ha habido una pérdida de un dímero de H2A-H2B. Y el nucleosoma “*split*” (posiblemente equivalente al lexosoma), que consiste en una partícula que contiene las ocho histonas agrupadas en dos complejos heterotetraméricos, modelado como un a agrupación  $(H2A/H2B)(H3/H4)$ -DNA desnudo- $(H3/H4)(H2A/H2B)$ , aunque

todavía no se ha podido realizar un análisis fidedigno del contenido histórico. Muy parecido a este concepto son los recientemente descubiertos hemisomas, en los que cada una de las vueltas que el DNA da al nucleosoma canónico rodearía un heterotetrámero atípico formado por cenH3, H4, H2A y H2B. Las descripciones anteriores proceden de Lavelle y Prunell (2007) y Zlatanova et al. (2009).

Todas estas formas, en gran parte, tienen sentido en un contexto interfásico en respuesta a la dinámica de los fenómenos de transcripción. También se ha podido observar un proceso de “respiración” de la partícula núcleo (Li y Widom, 2004; Li et al., 2005) donde el DNA, en la zona de entrada y salida, presenta una dinámica de obertura y cierre que permitiría exponer o ocultar zonas concretas del nucleosoma. Este proceso puede ocurrir de forma más drástica, donde puede haber una “obertura” del nucleosoma, debida a que una porción larga del DNA se desasocia del octámero temporalmente (Tomschik et al., 2005).

Pero, de cara a la formación de estructuras de orden superior hay desviaciones en la dinámica del nucleosoma canónico que pueden ser de gran interés. Una de ellas es lo que se conoce como *nucleosome “gaping”* (Mozziconacci y Victor, 2003), basado en el comportamiento de la fibra de cromatina en condiciones teóricas en las que el nucleosoma se abre como una bisagra facilitando los contactos laterales de éste en el solenoide compacto. El descubrimiento de una forma de R-octasoma (reversoma) fruto de la experimentación topológica mediante *single molecule* (Bancaud et al., 2006), en la que se pueden establecer formas nucleosomales donde el DNA rodea, en sentido horario (R), el octámero de histonas de forma metaestable. Muy recientemente se ha descubierto que los nucleosomas centroméricos cenH3 reconstituidos, procedentes de *Drosophila melanogaster*, serían R-octasomas (Furuyama y Henikoff, 2009). Otro fenómeno interesante es la observación en nuestro grupo (Aragay et al., 1988, 1991; Samsó y Daban, 1993) de la capacidad de los nucleosomas de formar estructuras parcialmente asociadas, o estructuras transitorias en las que el nucleosoma puede albergar un exceso de dímeros H2A-H2B que pueden ser retransferidos a una molécula DNA desnudo. Todos estos datos apuntan claramente a una plasticidad nucleosomal que sugiere la revisión de la visión rígida y estática del nucleosoma canónico.



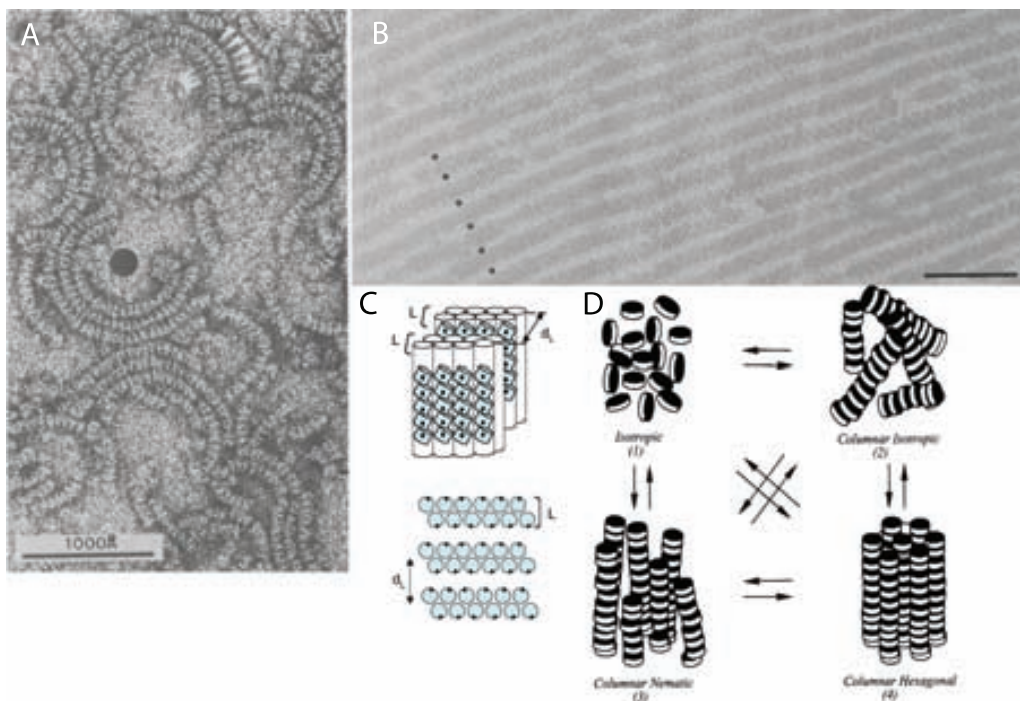
## Capítulo 3

# Propiedades autoasociativas de las NCPs

La partícula núcleo del nucleosoma (NCP) es la unidad mínima de plegado de la cromatina. Este elemento tiene la propiedad de autoensamblarse y de plegar un fragmento de DNA a su alrededor (Daban y Cantor, 1982a,b; Wolffe, 1998). Por otra parte, Dubochet y Noll (1978) en sus estudios con NCPs en solución observaron que, cuando depositaban sobre mica los cilindros que se formaban en solución, estos tenían propiedades autoasociativas de orden superior dando lugar a diversas formas como estructuras hexagonales planas, arcos de diferente ángulo y estructuras cilíndricas (después de una curación de varias semanas). En estos resultados ya queda patente la capacidad intrínseca de los nucleosomas para establecer contactos por las caras (del tipo cabeza-cola) y la implicación de este fenómeno en la formación de la cromatina de orden superior. El análisis de los cristales de NCP mediante difracción de Rayos X permitió aportar más datos acerca de este hecho, ya que hay cristales que contienen una celda unitaria formada por NCPs, que mantienen contactos cabeza-cola, dando lugar a un apilamiento columnar. Estas columnas se empaquetan formando un sistema Hexagonal (Uberbacher y Bunick, 1985). Estos datos también han sido observados recientemente s estructuras no cristalinas. La observación de agregados de fases amorfas a desvelado la formación de sistemas columnares de disposición aleatoria (isotrópica) y diversas fases de cristal líquido<sup>1</sup> que dan lugar a un sistema columnar nemático y columnar hexagonal (Leforestier et al., 1999), o incluso sistemas laminares (Leforestier et al., 2001; Mangenot et al., 2003). Todos estos resultados demuestran que los contactos cabeza-cola y laterales también pueden establecerse en solución (ver Figura 3.1). Las interacciones entre partículas núcleo son

---

<sup>1</sup>Un cristal líquido es un estado de la materia que tiene las propiedades de un sólido ordenado, pero al mismo tiempo los elementos que lo componen tienen un cierto grado de libertad en alguno de los planos de movimiento. Un ejemplo de cristal líquido en Biología son las membranas celulares, que están constituidas por una bicapa lipídica donde los lípidos tienen la movilidad restringida en el plano  $x$ - $y$  y su disposición en la membrana es perpendicular al plano de la misma.



**Figura 3.1: Autosociación de las NCPs.** En **A** se observan arcos nucleosomales. **(B)** Criomicroscopía de NCPs en los que se pueden observar la tendencia a formar sistemas lamelo columnares, la disposición de los nucleosomas en este tipo de sistema se puede ver esquematizado en **C**, las NCPs se disponen uno encima de otro formando columnas (L); los (\*) de **B** indican la zona en la que hay solvente. **(D)** Posibles fases de cristal líquido que pueden adoptar los agregados de NCP. Barras: **A** y **B** 100 nm. Figura adaptada a partir de las diferentes referencias (**A**, Dubochet y Noll, 1978); (**B**, Leforestier et al., 2001); (**C**, Mangenot et al., 2003); (**D**, Leforestier et al., 1999).

debidas a las propiedades electrostáticas de las mismas (Leforestier et al., 1999, 2001). Este tipo de interacciones favorecerían la formación de estructuras cromatínicas de un elevado grado de compactación gracias a las propiedades de polielectrólito de las partículas núcleo. En relación a las interacciones entre nucleosomas, el análisis cristalográfico de elevada resolución indica que la interacción de las caras de los nucleosomas se establece a través de una zona ácida o *acidic patch* (compuesto por las histonas H2A y H2B de la zona dorsal de una NCP; Luger et al., 1997; White et al., 2001) y la cola N-terminal de la histona H4 de la zona ventral de la partícula adyacente (Harp et al., 2000). Una eliminación de las colas provoca la pérdida de la interacción entre las caras de las NCPs (Bertin et al., 2004) indicando que tienen un papel crucial en la formación de la fibra de cromatina y de estructuras de orden superior (Caterino y Hayes, 2007).

# Capítulo 4

## La fibra de cromatina

*La fibra ha sido desde el principio la principal estructura de orden superior de la cromatina. Desde el “collar de perlas” hasta estructuras más compactas que intentan explicar la densidad del cromosoma metafásico, teniendo en cuenta, en algunos casos, las propiedades autoasociativas de las partículas núcleo (ver capítulo anterior). En la última década han habido cambios muy importantes en el campo se ha pasado de una visión clásica a una nueva visión que actualmente es la más aceptada. Esta división refleja el paso de modelos de fibra más laxos a otros más compactos y más dinámicos (Tremethick, 2007; Mozziconacci y Lavelle, 2009), en los que se han tenido en cuenta las condiciones más cercanas en las que se encuentra la cromatina en condiciones nativas.*

### 4.1. Dinámica de la cromatina

Una de las funciones principales de la cromatina, a parte de regular activamente los fenómenos de transcripción y replicación, es la de contener y plegar el DNA. En las condiciones apropiadas el “collar de perlas” de nucleosomas se compacta en una estructura fibrilar de aproximadamente 30 nm de diámetro, que es lo que comúnmente conocemos como “fibra de 30 nm” (Mozziconacci y Lavelle, 2009). No hay duda hoy en día de que la neutralización de las cargas del DNA juega el papel más importante en la condensación de la cromatina (Hansen, 2002). Estudios iniciales demostraron que al incrementar la concentración de NaCl hasta 60 mM o el uso de pequeñas cantidades de iones divalentes (por encima de 0.3 mM) provocaban la compactación de la fibra de cromatina ( $\sim 30$  nm de diámetro; Thoma et al., 1979). Este fenómeno fue más tarde corroborado por otros laboratorios, en los que el uso de elevadas concentraciones de iones monovalentes o el uso de menores dosis de iones divalentes provocaban una compactación que dificultaba la visualización de los nucleosomas en su interior (Ausio et al., 1984; Widom, 1986; Zlatanova et al., 1994; Bartolomé et al., 1995; Carruthers et al., 1998). Estos resultados, por otra par-

te, demuestran que los iones divalentes como el  $Mg^{2+}$  tienen una mayor capacidad compactadora. Utilizando estos datos y haciendo uso de la teoría de los polielectrolitos de Manning (1978), los estudios teóricos indican que la neutralización de cargas electrostáticas pueden provocar la energía libre suficiente para formar fibras de 30 nm estables (Clark y Kimura, 1990). Por otra parte, a muy elevada fuerza iónica, el efecto compactador se revierte y por encima de concentraciones de NaCl 450 mM se observa como los nucleosomas se tornan estructuras fibrilares (Czarnota y Ottensmeyer, 1996) A partir de concentraciones 0,75 M las histonas se disocian del DNA lo que implica una desestabilización de la fibra de cromatina (Yager et al., 1989). Este fenómeno es debido a las propiedades electrostáticas de la cromatina. A baja concentración iónica la interacción entre el octámero y el DNA es estable, pero al incrementar la fuerza iónica del medio los iones de las sales compiten con las histonas y el propio DNA apantallando sus cargas y provocando la disociación gradual. Este proceso es progresivo: Entre 0.5–0.7 M NaCl se disocia la H1, entre 0.7–1.2 M se produce la disociación del dímero H2A-H2B y de 1.2–2 M se produce la disociación de H3 y H4 (Burton et al., 1978).

Además, un estudio reciente realizado mediante SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*) ha permitido el análisis de la distribución tridimensional y la dinámica durante el ciclo celular de los diferentes iones en el interior del cromosoma (Strick et al., 2001). Estos resultados demuestran que mientras la concentración de  $Na^+$  y  $K^+$  no varía durante todo el ciclo celular, las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  se incrementan considerablemente en el interior del cromosoma metafásico. Por otra parte, también observaron que los iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Mg^{2+}$  tienen una distribución ubicua y homogénea en el cromosoma y que el  $Ca^{2+}$  se distribuye mayoritariamente en la zona axial de las cromátides metafásicas. Las concentraciones de  $Ca^{2+}$  (20–32 mM) y  $Mg^{2+}$  (12–20 mM) en el interior del cromosoma metafásico son mucho mayores que las utilizadas generalmente en los estudios estructurales de cromosomas metafásicos realizados hasta el momento. Por lo tanto, cualquier estudio estructural realista del cromosoma metafásico debería llevarse a cabo en concentraciones iónicas elevadas.

Otro aspecto muy importante en la dinámica de plegado de la cromatina es el papel de la histona H1/H5. Como se comentó en la sección 1.2, esta se une al nucleosoma en la zona de entrada y salida del DNA y por lo tanto es muy abundante ( $\sim 1$  molécula/nucleosoma). Esta unión además de estabilizar y evitar el deslizamiento del octámero de histonas tiene un papel muy importante en la formación y estabilidad de la fibra de 30 nm (Thoma et al., 1979). De hecho, se ha observado que la ausencia de un 10% de H1/H5 impide la formación de la fibra de 30 nm (Thoma y Koller, 1981). Esto es así, ya que la cromatina en presencia H1 es capaz de compactarse incluso utilizando exclusivamente iones monovalentes (Carruthers et al., 1998; Wolffe, 1998). Sin embargo, estudios posteriores de compactación realizados con oligonucleosomas y fibras desprovistas de H1 indican que en ausencia de esta histona los complejos son capaces de compactarse (García-Ramírez et al., 1992). A pesar

de estas observaciones, la cromatina y los *tándems* plegados en ausencia de H1 no presentan el mismo grado de estructuración que la fibra nativa, como lo demuestra el comportamiento diferencial en geles no desnaturalizantes en presencia de  $Mg^{2+}$  1.7 mM observado en nuestro grupo (Bartolomé et al., 1995).

Otro punto importantísimo en la dinámica de plegado de la cromatina es la propiedad que tienen los nucleosomas (ver capítulo 3) de contactar por las caras, pudiendo ser un punto clave en la formación y estabilización de estructuras de orden superior de la cromatina (Dubochet y Noll, 1978; Daban y Bermúdez, 1998; Daban, 2003). Este contacto se establece a través del dímero H2A-H2B y la cola de la H4 (ver capítulo 3 para más detalles). El estudio de *arrays* de nucleosomas conteniendo histonas H2A, H2B y H4 a las que se les había substituido aminoácidos concretos por cisteínas, indicaba que en estos sistemas una vez compactados en presencia de  $Mg^{2+}$  se establecían contactos reales entre las histonas H2A y H4 (Dorigo et al., 2004), del mismo modo que se observó en las NCPs mediante Rayos X (ver capítulo 3). Más tarde este resultado fue confirmado gracias a la cristalización de un oligonucleosoma (tetranucleosoma) en ausencia de H1 (ver sección 4.3.1). Tanto la eliminación de la cola de la H4 (Chodaparambil et al., 2007) como la eliminación del *acidic patch* de las caras del nucleosoma (Zhou et al., 2007), estudiado en *arrays*, han demostrado que son necesarios para la regulación y la autoasociación de la cromatina. Estudios más recientes con fragmentos de cromatina reconstituida en presencia de H1, realizados con pinzas ópticas, indican que, precisamente, las interacciones entre las caras de los nucleosomas son necesarias para la estabilidad de la fibra de cromatina compacta (Kruithof et al., 2009).

## 4.2. Visión clásica

En este apartado se presentan los modelos fruto de los primeros estudios estructurales realizados sobre la fibra de cromatina, en los que se utilizaron condiciones de baja fuerza iónica. Este método facilitaba el estudio de la estructura y componentes internos de la cromatina, que adoptaba una conformación de collar de perlas ( $\sim 10$  nm de diámetro) en la que los nucleosomas están conectados por el DNA *linker* (Olins y Olins, 1974). Esta disposición extendida estaba provocada por las condiciones de preparación de la fibra o por la ausencia de las histonas *linker* H1/H5 (Finch y Klug, 1976). La presencia de H1 y el uso de una mayor fuerza iónica del medio estructuraba y compactaba la fibra de cromatina (Thoma et al., 1979) dificultando su estudio ultraestructural. En base a estos precedentes, en el campo se empezó a trabajar en condiciones poco estructurantes, y sin H1, a partir de las cuales se hipotetizaron diferentes modelos de la fibra de cromatina.

### 4.2.1. Modelos del zigzag con el DNA *linker* cruzado

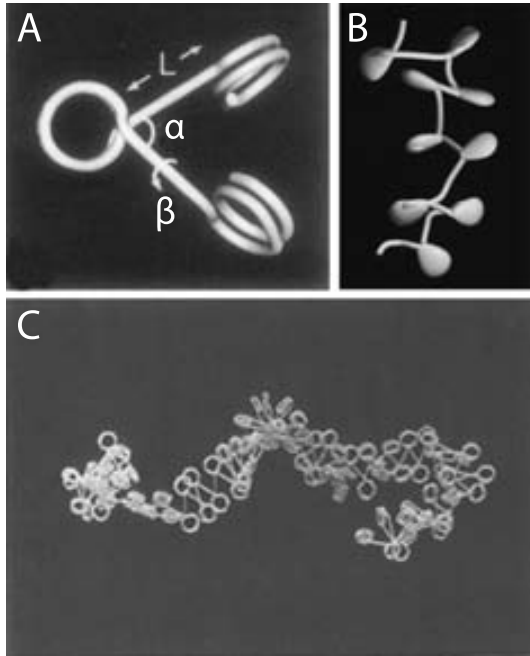
Dentro de este tipo de modelos podemos encontrar varios laboratorios que han realizado diferentes aportaciones. Pero todos ellos se basan en el hecho de que el DNA tiene una trayectoria en zigzag y el DNA *linker* se dispone perpendicularmente al eje de la fibra, lo que determina el paso de rosca y sus propiedades de plegado.

#### 4.2.1.1. Modelo de zigzag tridimensional

Dentro de este tipo de modelos encontramos dos variantes que se diferencian por la regularidad en la longitud del DNA *linker*.

El modelo de zigzag tridimensional fue propuesto por Bordas et al. (1986). Este modelo básicamente se ha elaborado a partir de estudios realizados mediante dispersión de Rayos X de ángulo bajo. En este caso el DNA *linker* presenta una longitud constante de 64 pb lo que, según los autores, condiciona la regularidad a lo largo de la fibra. El modelo presenta una fibra extendida en zigzag a bajas concentraciones de  $Mg^{2+}$ . La fibra tendría 33 nm de paso de rosca, 20 nm de diámetro y 2.75-3.25 nucleosomas/vuelta. A concentraciones de  $Mg^{2+}$  más elevadas proponen un modelo helicoidal más compacto en el que los nucleosomas se colocan por la periferia y el DNA *linker* cruza perpendicularmente el eje de la fibra. En éste caso, la fibra compacta tendría 3 nm de paso de rosca, 2.56 nucleosomas por vuelta y un diámetro de la fibra de 27 nm (Bordas et al., 1986). Finalmente consideran que el número de nucleosomas por unidad de longitud observados en su laboratorio es idéntico al observado en el modelo del solenoide (Koch, 1989).

El otro modelo es el de zigzag tridimensional irregular, el cual fue propuesto por Woodcock et al. (1993) y Horowitz et al. (1994). A diferencia del modelo propuesto por Bordas et al. (1986), en este caso, la forma de la fibra de cromatina depende de la longitud del DNA *linker*, el ángulo existente entre la entrada y la salida del DNA respecto al nucleosoma (ángulo  $\alpha$ ) y el ángulo de rotación entre nucleosomas consecutivos (ángulo  $\beta$ ). Si todos los DNA *linker* tienen la misma longitud, la fibra tendrá una forma helicoidal regular. Por el contrario, y según los resultados contrastados mediante la modelización, la variabilidad en la longitud del DNA *linker* produciría una fibra con una hélice distorsionada y en consecuencia irregular (Woodcock et al., 1993; Bednar et al., 1998; ver Figura 4.1). Los resultados obtenidos mediante criomicroscopía electrónica permitieron postular a los autores de este modelo que incluso en la fibra condensada la cromatina mantiene el plegamiento en zigzag irregular (Bednar et al., 1998). Un estudio realizado mediante microscopía de fuerza atómica (AM-AFM *mode* en seco; sección 6.2.2.1) también corroboró el modelo de zigzag irregular (Leuba et al., 1994; Zlatanova et al., 1994). Recientemente, ha habido una aportación respecto a este tipo de modelo en el que el estudio combinado entre microscopía electrónica y simulaciones de Monte Carlo de fibras en presencia de H1 a concentración iónica baja presenta una estructura en zigzag dominada por



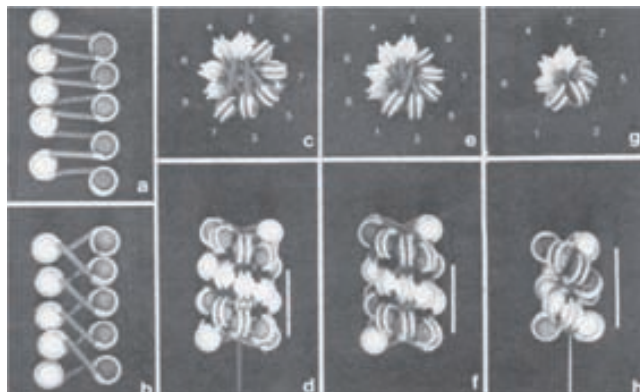
**Figura 4.1: Modelo de zigzag tridimensional irregular.** (A) Esquema de los parámetros estructurales utilizados en el modelado de la fibra de cromatina mostrada en B; L= Longitud del DNA *linker*,  $\alpha$ = ángulo entre el DNA de entrada y salida del nucleosoma;  $\beta$ = ángulo de rotación entre nucleosomas consecutivos a través del DNA *linker*. (B) Modelo 3D de 9 oligonucleosomas en presencia de  $\sim 5$  mM de iones monovalentes. (C) Fibra de cromatina de zigzag irregular modelada introduciendo una variabilidad del DNA *linker* ( $\pm 2$  pb) y en el ángulo  $\alpha$  ( $\pm 15^\circ$ ). Figuras adaptadas de: (A) Woodcock et al. (1993); (B) Bednar et al. (1998) y (C) Horowitz et al. (1994).

los contactos entre nucleosomas alternos ( $i \pm 2$ ), y en presencia de iones monovalentes compactan mucho la fibra provocando que el DNA *linker* se pliegue permitiendo la interacción entre nucleosomas consecutivos ( $i \pm 1$ ; Grigoryev et al., 2009). Otro estudio bioinformático (Mozziconacci y Victor, 2003) demuestra que se puede pasar de un modelo de zigzag a una fibra de cromatina mucho más compacta únicamente modificando los dos ángulos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) del modelo propuesto por Woodcock et al. (1993).

#### 4.2.1.2. Modelo de doble origen con el DNA *linker* cruzado

El modelo obtenido por Williams et al. (1986) se desarrolló a partir de datos dispersión de Rayos X de diferentes especies. En este modelo, el zigzag se pliega helicoidalmente sobre su propio eje dando lugar a una hélice levógira de doble origen (paso de rosca de 26 nm) en el que los nucleosomas se distribuyen por la periferia (ver Figura 4.2) y el DNA *linker* se cruza pasando perpendicularmente al eje de la fibra, ocupando todo el espacio central (Smith et al., 1990). El diámetro y el paso de rosca de la fibra varían en función de la longitud del DNA *linker* (depende de la especie; Smith et al., 1990; Williams y Langmore, 1991). Según este modelo, *Thyone briarius* (DNA *linker* 87 pb) tiene una fibra de cromatina de 39 nm de diámetro y  $12 \pm 2$  nucleosomas por cada 10 nm de la fibra (Williams et al., 1986). Este modelo tiene dos características que lo diferencian de los modelos solenoidales (ver más adelante): (i) Una dependencia del diámetro de la fibra con la longitud

del *linker* (ii) La inexistencia de un agujero central (Smith et al., 1990). Estudios recientes utilizando arrays de oligonucleótidos con histonas mutadas, indican que el plegado de la fibra de cromatina concuerda con un modelo de doble origen (ver sección 4.3.1).



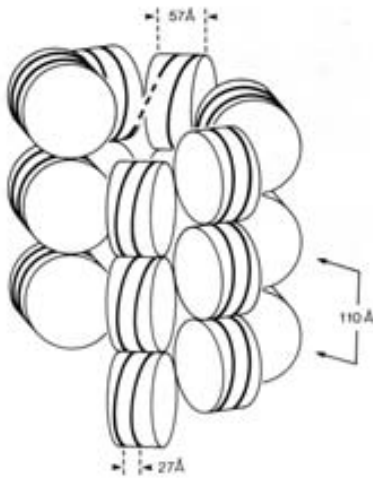
**Figura 4.2: Modelo de la fibra de cromatina de doble origen.** (a y b) Vistas laterales de la fibra extendida. (a–f) Modelos de doble origen que tienen un DNA *linker* de 48 pb. (c y d) Vista frontal y lateral del modelo con un *linker* cruzado y un  $\Delta L$  (*linking number*) = -1 y de -2 (e y f). (g y h) Vista frontal y lateral del modelo con  $\Delta L = -1$  y un *linker* corto (22 pb). Figura procedente de Williams et al. (1986).

#### 4.2.2. Modelo del solenoide

Este modelo fue sugerido por el laboratorio de A. Klug a partir de la observación de fibras de cromatina de 30 nm de diámetro en el microscopio electrónico de transmisión, en las que observaron estrías transversales con una separación de 11 nm (Finch y Klug, 1976; Thoma et al., 1979). En este caso el DNA *linker* avanza paralelo al eje de la fibra posibilitando el acercamiento de los nucleosomas consecutivos (ver Figura 4.3). El modelo consta de 6-7 nucleosomas/vuelta con un paso de rosca igual a la altura de un nucleosoma (11 nm). Estudios posteriores de dispersión de neutrones (Suau et al., 1979; Bradbury y Baldwin, 1986) y de dicroísmo eléctrico (Yabuki et al., 1982) corroboraron la disposición radial de los nucleosomas en el interior de la fibra. Además, otro estudio de dicroísmo eléctrico demostró que en el solenoide los nucleosomas están inclinados 20-33° respecto al eje de la fibra en función de la longitud del DNA *linker* (McGhee et al., 1983). Un estudio más detallado mediante difracción de Rayos X de fibras de cromatina parcialmente orientadas, permitió aportar datos más fiables acerca de la disposición de los nucleosomas dentro del solenoide (Widom y Klug, 1985). Según los datos de dispersión de neutrones se pudo determinar que la H1 presentaba una disposición radial en el interior de la fibra (Graziano et al., 1994), posición esperada si consideramos que la fibra se plega solenoidalmente. En un modelo solenoidal los nucleosomas se disponen consecutivamente a lo largo de la hélice conectados por el DNA *linker*. Asumiendo esta disposición, éste se ha de plegar de algún modo en la zona interior de la fibra. El modelo de solenoide propuesto por Klug y colaboradores no resuelve este problema (ver figura 4.3). Independientemente de la disposición del DNA *linker*, para poder formar el solenoide, se ha de producir una torsión para poder unir los nucleosomas



consecutivos. Este punto es crucial y diferencial entre los modelos basados en un solenoide y los basados en un zigzag y ha sido un largo debate durante los 80–90, como se puede ver reflejado en una revisión realizada por van Holde y Zlatanova (1996).



**Figura 4.3: Modelo solenoidal de la fibra de cromatina.** En el modelo se indican las medidas más importantes. La trayectoria del DNA *linker* se desconoce, por esta razón se indica con una línea discontinua. Figura procedente de (Widom y Klug, 1985).

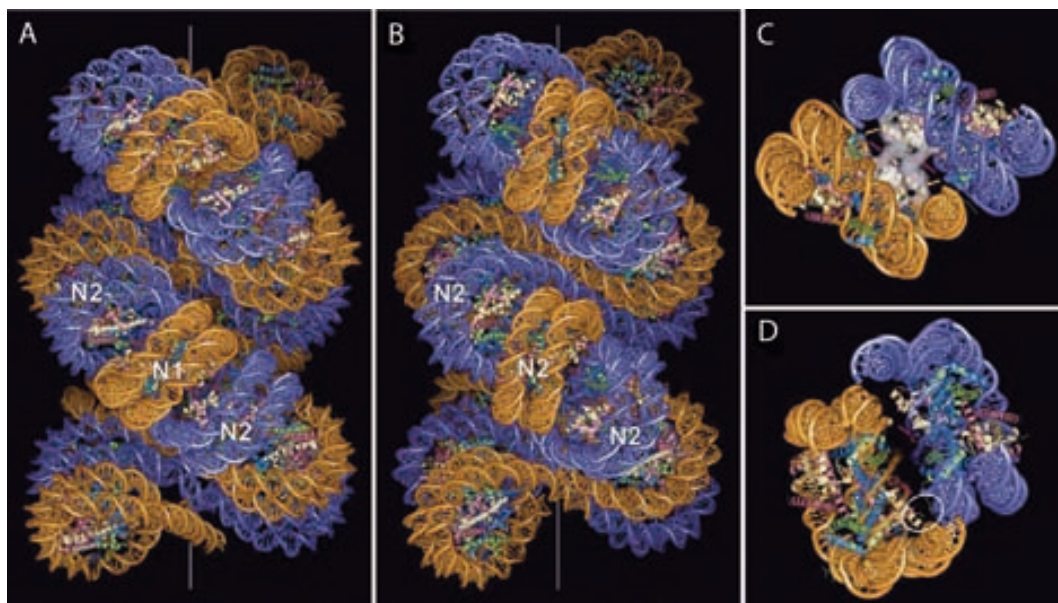
### 4.3. Nueva visión

En en la última década ha habido un cambio importante en la visión de la fibra de cromatina y en el campo de la cromatina en general. El uso de condiciones más estructurantes (i.e. iones divalentes en concentraciones cercanas a las condiciones fisiológicas), la consideración de las propiedades autoasociativas de los nucleosomas (ver capítulo 3) y la imposibilidad de los modelos clásicos de explicar la elevada concentración local de DNA en los cromosomas metafásicos (Daban, 2000), han hecho reconsiderar nuestra concepción sobre las estructuras de orden superior de la cromatina, entre ellas el de la fibra de cromatina. El problema que aparece al utilizar concentraciones elevadas de iones monovalentes (o menores de iones divalentes) es que la cromatina se condensa dificultando la interpretación y, en consecuencia, la realización de modelos explicativos. Se ha de destacar, que uno de los factores que ha catalizado este cambio ha sido el uso generalizado del  $Mg^{2+}$  como elemento compactador de la cromatina (Widom, 1986; Bartolomé et al., 1995; Carruthers et al., 1998; Caño et al., 2006).

#### 4.3.1. El tetranucleosoma

El grupo dirigido por Timothy Richmond cristalizó por primera vez la estructura de un oligonucleosoma (tetranucleosoma) a 9 Å de resolución (Schalch et al., 2005).

Haciendo uso de la técnica de reemplazamiento molecular, a partir de la estructura cristalizada del nucleosoma resuelta en su propio laboratorio (Luger et al., 1997), estos autores propusieron un modelo de fibra de cromatina (Figura 4.4). Este modelo se basa en un tándem repetitivo de tetranucleosomas que no contiene H1 y tiene un DNA *linker* de tan solo 20 pb (Schalch et al., 2005). Es el sucesor de los modelos de zigzag con un DNA *linker* cruzado propuesto por Bordas et al. (1986), Woodcock et al. (1993) y el modelo de Williams et al. (1986), con la diferencia que es mucho más compacto que sus predecesores (ver sección 4.2.1). En este caso la fibra presenta 18.9 nucleosomas/vuelta, 6.6 nucleosomas/110 Å (diámetro del nucleosoma) y un diámetro de la fibra de 24–25 nm (ver Figura 4.4). Este modelo, en parte, es el resultado de observaciones anteriores de compactación de oligonucleosomas en presencia de elevadas concentraciones de  $Mg^{2+}$  (1 mM ó 100 mM, Dorigo et al., 2003) y de un estudio posterior del mismo sistema (conteniendo en este caso las histonas H2A, H2B y la H4 modificadas) que demostraba, según los autores, que este sistema “artificial” (que no tiene H1 y esta provisto de un DNA *linker* de 20 pb) era consistente con un modelo de hélice de doble origen (Dorigo et al., 2004).



**Figura 4.4: Modelo del tetranucleosoma.** (A) Modelo directo construido a partir de los datos cristalográficos para establecer los contactos entre los nucleosomas N1 y N2 (ver texto). (B) Modelo idealizado para tener el eje de rotación de los nucleosomas ortogonal al eje de la fibra (línea gris). (C) Interfase entre los nucleosomas N1 y N2 en el modelo directo (A) visto desde el interior de la fibra. La región de interacción entre los dímeros H2A-H2B se puede ver claramente. (D) Esquema de la interfase entre los nucleosomas del modelo idealizado (B) visto desde dentro. Esta disposición permite el acercamiento del dímero de H2A/H2B y la cola de la H4 (marcado con un círculo). Figura obtenida de Schalch et al. (2005).

En el modelo del tetranucleosoma un elemento importante en la estabilización de la fibra es la interacción entre las caras laterales de los nucleosomas (ver capítulo 3) dentro de la fibra. Éste es uno de los factores más importantes y distintivos de los nuevos modelos considerados en este capítulo y que fue introducido por primera vez (ver más adelante) por Daban y Bermúdez (1998). Teniendo en cuenta la inclinación de los nucleosomas, respecto al eje de la fibra, al realizar el modelo, se pueden establecer diversos tipos de contacto: (i) Los encontrados en el cristal donde se observa un contacto entre los dímeros de H2A/H2B de los nucleosomas (Figura 4.4) de pisos consecutivos (ii) Una disposición menos inclinada que permitiría dar lugar a los contactos observados en los cristales de NCPs entre la cola de la H4 y el dímero H2A/H2B (D; Schalch et al., 2005). Incluso en este modelo cristalográfico la trayectoria del DNA *linker* permanece indeterminado.

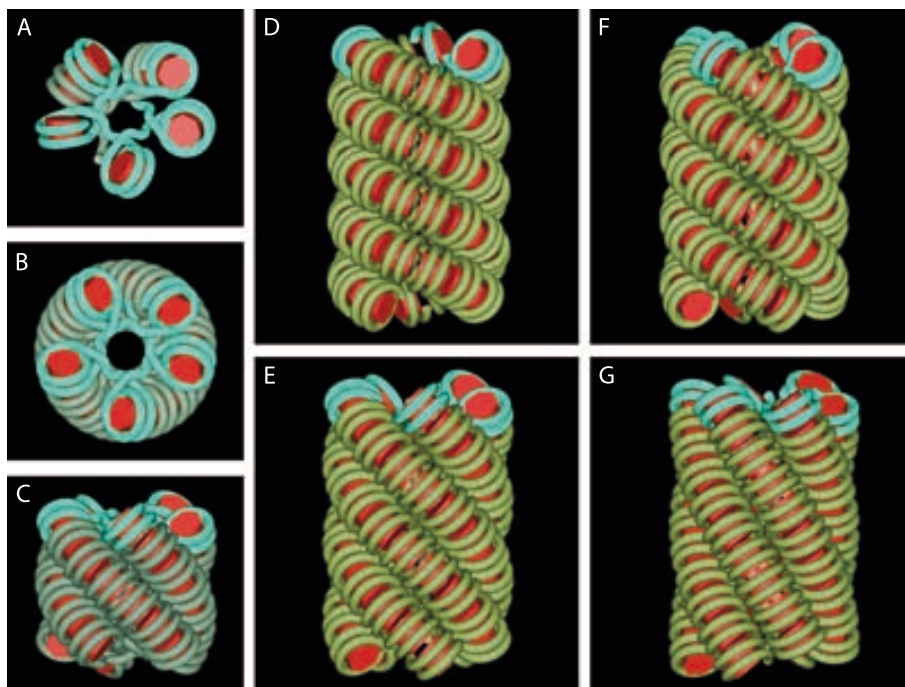
#### 4.3.2. El solenoide interdigitado compacto

Como se ha explicado al principio de esta sección, el principal cambio en la visión de los modelos de la fibra de cromatina se produjo al realizar el análisis detallado de fragmentos de cromatina de alto peso molecular en presencia de iones divalentes, los cuales tienen una mayor capacidad estructurante de la cromatina.

El modelo del solenoide interdigitado compacto propuesto por nuestro grupo (Daban y Bermúdez, 1998) es una solución para interpretar los datos estructurales derivados del estudio de fibras de cromatina en presencia de  $Mg^{2+}$  1.7 mM. En nuestro laboratorio al realizar el estudio electroforético en condiciones nativas de fragmentos (6-50 nucleosomas) de cromatina, se observó que estos presentaban una banda retardada independiente del peso molecular del fragmento estudiado (Bartolomé et al., 1995). Un estudio microscópico detallado revelaba que se trataba de una estructura consistente con un modelo solenoidal de  $\sim 33$  nm de diámetro, que presentaba un agujero central, y que se podía observar tanto en fragmentos cortos como largos (Bartolomé et al., 1994). Un experimento de desnaturalización posterior aportó evidencias directas de la disposición radial de los nucleosomas en el interior de la fibra compacta (Bermúdez et al., 1998).

Teniendo en cuenta los resultados observados mediante electroforesis y microscopía, todo apuntaba a que la fibra encontrada era mucho más compacta que los modelos presentados hasta el momento. A partir de estos datos y de los presentes en la bibliografía, se realizó un modelo en el que los nucleosomas presentaban una disposición radial en una estructura similar al modelo del solenoide (ver sección 4.2.2) propuesto por Widom y Klug (1985), pero que permita explicar el elevado grado de compactación de las fibras de 30–40 nm observadas, mediante microscopía electrónica, en nuestro laboratorio.

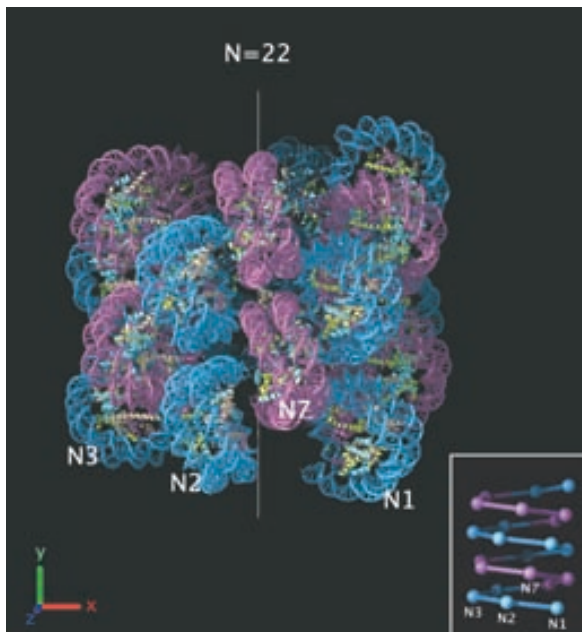
El problema físico de la elevada compactación puede resolverse con un solenoide en el que los diferentes pisos se puedan interdigitar, debido a que cada piso tiene un número fraccionario de nucleosomas (ver Figura 4.5A). La interdigitación de la



**Figura 4.5: Modelo del solenoide interdigitado compacto.** (A) Vista desde arriba de la primera vuelta completa y parte de la segunda vuelta de la fibra mostrada en B y C que está compuesta por 35 nucleosomas. (B) Vista zenital de la fibra en la que se puede observar una posible disposición del DNA *linker* (61 pb) dejando un agujero central (7.3 nm). (C) Vista lateral de la fibra en la que se observan las hélices secundarias resultantes de la interdigitación entre los nucleosomas de diferentes vueltas de la hélice primaria. (D–G) Diferentes fibras modeladas en función de los nucleosomas/vuelta de hélice primaria que provoca una variación del ángulo de inclinación de los nucleosomas a lo largo de las hélices secundarias. Figura adaptada de Daban y Bermúdez (1998).

fibra se puede llevar a cabo gracias al apilamiento de los nucleosomas con los del piso superior e inferior. Esta propiedad autoasociativa es un fenómeno muy bien estudiado por otros laboratorios que han descrito la capacidad de los nucleosomas de interactuar por las caras laterales (ver capítulo 3). Este fenómeno se había observado experimentalmente sobre las NCPs, pero nunca se había integrado en un modelo de fibra hasta el momento. La interdigitación genera unas hélices secundarias, que se enrollan en el mismo sentido que la hélice primaria, con un paso de rosca muy inferior (ver Figura 4.5C–G). Esta distribución es posible tanto en hélices dextrógiras como levógiras. El modelo presenta un agujero central (ver Figura 4.5B) como en las estructuras observadas mediante microscopía electrónica. Se desconoce la trayectoria exacta del DNA *linker*, pero un DNA de longitud igual a la encontrada en

eritrocitos de pollo (60–64 pb) se puede introducir sin problemas estéricos utilizando parte del hueco central de la fibra. La interdigitación permite incrementar poco la estructura a lo largo del eje de la fibra por cada vuelta dada, pero provoca un incremento del diámetro. El modelo presenta un diámetro máximo de 36 nm, un paso de rosca y número de nucleosomas/vuelta variables según el grado de interdigitación, que por otra parte maximizan las interacciones cara-cara de los nucleosomas de las hélices secundarias y puede alcanzar a tener 13–14 nucleosomas cada 11 nm (Daban y Bermúdez, 1998). Comparado con el solenoide típico es capaz de compactar mucho más el DNA, siendo la concentración local de DNA de 0.27 g/ml en comparación con los 0.15 mg/ml del solenoide propuesto por Widom y Klug (1985) o los 0.04–0.14 g/ml del modelo de zigzag tridimensional irregular propuesto por Woodcock et al. (1993). Estos datos han sido obtenidos de Daban (2000).



**Figura 4.6: Modelo de solenoide interdigitado presentado por el laboratorio de la doctora Rhodes.** El modelo se ha construido en base a las restricciones físicas impuestas por las medias de diámetro y la relación de empaquetamiento nucleosomal (Robinson y Rhodes, 2006). El modelo contiene 22 nucleosomas y tiene un diámetro de 33 nm y una altura  $\sim 33$  nm. La vueltas sucesivas de la hélice primaria están coloreadas en cian y magenta. Se ha indicado con N1, N2... los diferentes nucleosomas a lo largo del avance de la hélice primaria.

El modelo propuesto por nuestro laboratorio no fue aceptado inicialmente por el campo, que por aquel entonces se debatía entre el modelo de fibra solenoidal y el de fibras en zigzag. El reciente trabajo del tetranucleosoma de Schalch et al. (2005) supuso un duro golpe para los modelos solenoidales, ya que se basaba en el primer cristal de un oligonucleosoma (ver sección 4.3.1). Sin embargo, escasamente un año después Robinson et al. (2006) basándose en sus observaciones de arrays de 10 a 40 nucleosomas, que contenían H5 (Huynh et al., 2005) y DNAs *linker* de longitud variable (10–70 pb), observaron fibras de 33 nm que no variaban de diámetro con la longitud del DNA *linker*, confirmando un modelo solenoidal. Haciendo uso de estos datos, y teniendo en cuenta el número de nucleosomas por unidad de longitud, construyeron un modelo coherente con las restricciones físicas para la fibra. Este modelo

presenta la interdigitación (ver Figura 4.6) de los nucleosomas de los diferentes pisos corroborando el modelo del solenoide interdigitado compacto propuesto por Daban y Bermúdez (1998).

### 4.3.3. Modelado bioinformático

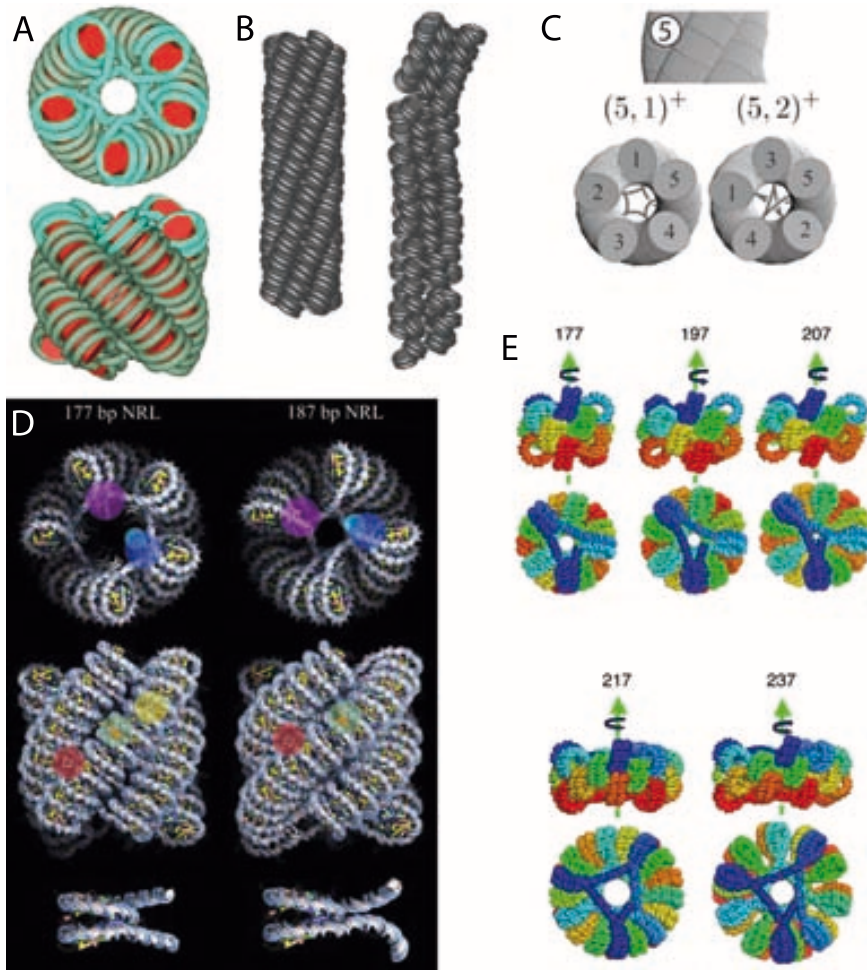
En las últimas 3 décadas ha habido gran controversia con respecto a los modelos de la fibra de cromatina de 30–40 nm. Es difícil llegar a un consenso debido a que cada modelo está sustentado por datos experimentales que lo apoyan y contradicen el resto (Tremethick, 2007; van Holde y Zlatanova, 2007). La dificultad de obtener datos determinantes puede ser debido a que la cromatina no es una estructura estática, sino que por el contrario es una estructura polimórfica y dinámica. Estos modelos están basados en datos estructurales de baja resolución y ninguno es capaz de determinar cuál es la trayectoria exacta del DNA *linker* en el interior de la fibra y como afecta al modelado la presencia de la H1.

Pero muy recientemente, el desarrollo de las técnicas bioinformáticas ha aportado luz en este sentido. Empezando por el trabajo teórico realizado por Mozziconacci y Victor (2003) en el que se mostraba como modificando los ángulos  $\alpha$  y  $\beta$  (utilizados en el modelo de Woodcock et al. 1993) se podía pasar de un modelo de DNA *linker* cruzado a un modelo del solenoide compacto. En este trabajo también argumentan la necesidad de un fenómeno de *gaping* del nucleosoma para acomodarse en la estructura compacta (ver sección 2.2). Más reciente es el trabajo realizado por Wong et al. (2007), en el mismo laboratorio, en el cual modelaron la fibra a nivel atómico permitiéndoles realizar un estudio riguroso del efecto de la longitud y topología del DNA *linker* sobre la morfología de la fibra, así como el efecto de la histona H1 sobre la disposición del DNA *linker*, llegando a la conclusión de que la fibra de cromatina es una estructura polimórfica (ver Figura 4.7D). Depken y Schiessel (2009) han propuesto un sistema predictivo basado en un criterio geométrico muy básico en el que tan solo tienen en cuenta la forma del nucleosoma para crear los modelos actuales y futuras formas de empaquetamiento de la cromatina (ver Figura 4.7C). Más reciente es el trabajo de Scipioni et al. (2010) en el que han integrado los datos experimentales y las restricciones geométricas, conformacionales y topológicas, bajo la hipótesis de una mínima distorsión de la estructura del nucleosoma y del DNA *linker* (ver Figura 4.7E). Estos resultados muestran como el volumen de exclusión provocado por el cruce del DNA *linker* y la energía de torsión limitan el grado de empaquetamiento de los nucleosomas en la fibra de cromatina.

Pero la aportación más importante la han realizado Kepper et al. (2008), los cuales presentan un método sistemático de simulaciones de Monte Carlo<sup>1</sup> mediante el cual modelan la estabilidad de las fibras en función de la orientación de los nu-

---

<sup>1</sup>Este modelado es el más completo hasta el momento, ya que toma en cuenta 6 ángulos de movimiento para cada nucleosoma, en comparación con el resto de modelos en los que solamente se tienen en cuenta los ángulos  $\alpha$  y  $\beta$ .



**Figura 4.7: Modelado bioinformático de la fibra de 30–40 nm.** (A) Modelo original del solenoide interdigitado compacto adaptado de Daban y Bermúdez (1998). (B) Representación de Monte Carlo del solenoide interdigitado. La estructura densa (10.7 nucleosomas/11 nm; izquierda) pasa a ser una estructura que mantiene prácticamente su integridad una vez llega al equilibrio térmico (7.6 nucleosomas /11 nm; derecha); figura adaptada de Kepper et al. (2008). (C) modelo obtenido por Depken y Schiessel (2009) al fijar el diámetro de la fibra a 33 nm. (D) estructuras de la fibra modeladas utilizando todos los átomos; se muestran las fibras con diferentes NRLs (*Nucleosome Repeat Length*) y el detalle del trazado del DNA *linker* del nucleosoma utilizado en el modelo (debajo); figura adaptada de Wong et al. (2007). (E) Modelos de estructuras interdigitadas propuestas por Scipioni et al. (2010) con un diámetro de fibra de ~34 nm (~11 nucleosomas/nm equivalente a 0.23 g/ml; fibras de arriba) y ~45 nm (~15 nucleosomas/nm equivalente a 0.22 g/ml; fibras de abajo); el número indica el NRL para cada fibra.

cleosomas y el paso y longitud del DNA *linker*. Estos datos indican que el modelo solenoidal tiene su máxima estabilidad cuando los nucleosomas están inclinados entre  $40^\circ$  y  $60^\circ$ , y que el paso de un modelo basado en un DNA *linker* cruzado a un solenoide interdigitado es cuestión de algunos pequeños cambios en la geometría de los nucleosomas que pueden ser inducidos por la presencia de la histona H1. Este estudio, también indica que el modelo de solenoide interdigitado es el más estable debido a las interacciones internucleosomales (ver Figura 4.7B). Hace escasos meses, este mismo equipo de científicos (Stehr et al., 2010) ha realizado una amplia exploración de las posibilidades geométricas de la cromatina mediante simulaciones de Monte Carlo. Con ellas se ha podido explorar el espacio conformacional, a partir de una novedosa representación numérica del diagrama de fases, en la que se considera al DNA como un sistema elástico. Esta nueva aproximación ha demostrado que conformaciones que *a priori* eran imposibles, se pueden convertir en energéticamente favorables gracias a la torsión y doblado del DNA. El estudio indica claramente que la cromatina es una estructura con una conformación tremendamente flexible. Este planteamiento rompe con la idea de un sistema rígido, y sugiere que aún quedan nuevas formas posibles por determinar experimentalmente.

A parte del tremendo potencial para validar posibles morfologías globales de la cromatina. Se ha de resaltar que, según el modelado informático, las conformaciones correspondientes al modelo del solenoide interdigitado compacto (Figura 4.7) son las más probables para la fibra de cromatina. Actualmente, el modelo interdigitado es el más aceptado por sus propiedades de compactación y estabilidad frente al resto de modelos presentados en las últimas tres décadas.



## Capítulo 5

# El cromosoma

*El cromosoma es una unidad estructural muy bien diferenciada que se ha llegado a considerar como un orgánulo celular debido a su tamaño, complejidad funcional y estructural. Esta estructura fue descrita por primera vez por el zoólogo alemán Anton Schneider en 1873 cuando estudiaba el proceso de la mitosis, y la participación en el mismo de unas “figuras cromáticas nucleares” (i.e. cromosomas). Pero el término de cromosoma no fue introducido hasta 1888 por Waldeyer, un profesor de anatomía alemán (Sumner, 2003). Desde muy pronto estuvo claro que los cromosomas estaban implicados en los fenómenos de la herencia, de manera que en 1887 Weissmann ya propuso su teoría de la herencia cromosómica. Cada cromosoma está compuesto por una única molécula de DNA y un conjunto de proteínas (subdivididas en histonas y no histonas; ver capítulo 1) que le dan cohesión estructural y aportan funcionalidad al DNA.*

### 5.1. Mitosis y el ciclo celular

Las células se reproducen mediante un proceso de duplicación del contenido genético que va seguido de una división celular. El ciclo de división (i.e. mitosis) es el mecanismo a través del cual los seres vivos se propagan; en el caso de los organismos pluricelulares este proceso es necesario para el crecimiento, mantenimiento y la regeneración del individuo. Los detalles de la mitosis pueden variar en las diferentes especies pero hay una serie de requerimientos generales que son universales en la biología de la célula. En primer lugar es indispensable, para que se produzcan un par de células genéticamente idénticas, que haya una duplicación exacta del material genético y en segundo lugar el material replicado se ha de segregar o dividir en dos células hijas distintas. El ciclo celular, como mínimo, debe tener los mecanismos necesarios para realizar estos procesos adecuadamente (Alberts et al., 2008). La gran mayoría de células han de duplicar su masa y el contenido de los orgánulos celulares. Por lo tanto, debe haber un riguroso sistema del control del ciclo celular que

coordine de forma centralizada todos los procesos implicados. El control se establece mediante un complicado patrón de fosforilación de diferentes proteínas, mediado por unas proteínas llamadas ciclinas dependientes de cinasas (Cdc). El efecto de diversas fosfatasas y de proteólisis dependiente de ubiquitinación marca la dirección irreversible del ciclo (Sumner, 2003). En mamíferos podemos encontrar diferentes ciclinas (Ciclina A, B, D y E) y sus Cdcs (Cdc2, Cdc1, Cdc4 y Cdc2 respectivamente) asociadas que se presentan secuencial y discretamente a largo de las diferentes etapas del proceso.

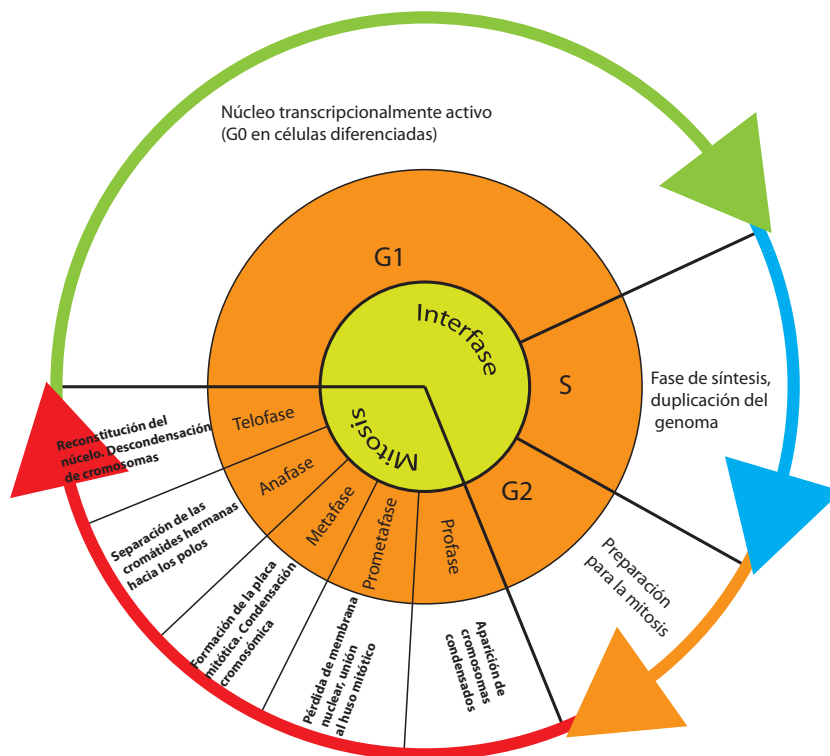


Figura 5.1: Esquema del ciclo celular.

El ciclo celular (ver Figura 5.1) consta de dos etapas morfológicamente muy marcadas: La mitosis (M) y la interfase. Esta última está subdividida en tres fases secuenciales (G1, S y G2). La fase G1 (Gap 1) se establece justo después de la mitosis (M), por lo tanto, esta es una fase de crecimiento y de mucha actividad transcripcional donde se dan todos los procesos normales de una célula en su contexto social y fisiológico (i.e. tejido). Esta fase también se puede llamar fase de quiescencia o G0, ya que es la fase en la que se encuentran la mayoría de las células de un tejido diferenciado que están fuera del ciclo celular. La fase S (Síntesis) es una de las fases más importantes, ya que en esta etapa se ha de duplicar la totalidad del genoma.

Tan pronto como el material genético se ha duplicado se entra en la fase G2. En esta etapa hay muchos puntos de control que procuran que el proceso de edición sea el adecuado para que las copias de cada cromosoma sean idénticas. Cualquier pequeño error o daño en el DNA hace que la célula se pare en G2, por lo que hay multitud de genes involucrados en esta fase para que la célula no evolucione a lo largo del ciclo sin que todo esté en perfectas condiciones para que ocurra la división (Sumner, 2003). En esta etapa también se incrementa el volumen citoplasmático de la célula.

En la fase M se ha de producir el desenredado de los recientemente sintetizados cromosomas, la condensación, la unión de los cromosomas al huso mitótico, la separación de las cromátides hermanas y la segregación en dos grupos diferenciados para que se vuelva a formar la membrana nuclear y finalmente la división en dos células hermanas. Clásicamente, estos procesos se han dividido en seis etapas diferentes: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Alberts et al., 2008).

**Profase:** En esta fase se lleva a cabo el proceso de condensación de los cromosomas que variará en función de la especie. En la fase S los diferentes cromosomas se han duplicado y ahora constan de dos cromátides hermanas (que son una copia exacta), que contienen además una zona con una secuencia específica que se conoce como centrómero, indispensable para la correcta segregación cromosómica. Hacia el final de ésta tiene lugar una despolimerización de los microtúbulos y se empieza a formar el huso mitótico (*mitotic spindle*). El paso de G2 a M es un tanto difusa ya que en esta fase se puede dar la unión de las cromátides al huso mitótico antes de que se acabe de duplicar la totalidad del cromosoma (Bouck et al., 2008).

**Prometafase:** Esta fase se inicia rápidamente cuando se desintegra la envoltura nuclear formando pequeñas vesículas que se mantienen durante toda la mitosis. En cuanto se desintegra el núcleo los microtúbulos del huso mitótico pueden acceder a la región nuclear donde se unirán al centrómero a través de una estructura proteica llamada cinetocoro. Esta unión permite ejercer una tensión sobre los cromosomas y en consecuencia se ven arrastrados.

**Metafase:** En esta fase los cromosomas se disponen a medio camino entre los polos del huso, en lo que se conoce como la placa mitótica. En la placa, los cromosomas se encuentran en un equilibrio de tensiones. Esta etapa es el momento de mayor compactación de la cromatina del cromosoma, el cromosoma metafásico.

**Anafase:** Esta fase empieza bruscamente cuando los cinetocoros apareados se separan por efecto de los microtúbulos cinetocóricos, permitiendo que cada cromátide (ahora denominada cromosoma) se desplace a cada polo del huso.

**Telofase:** Finalmente los cromosomas llegan a cada uno de los polos, desaparecen los microtúbulos cinetocóricos y se vuelve a restablecer la membrana nuclear, la mitosis ha finalizado.

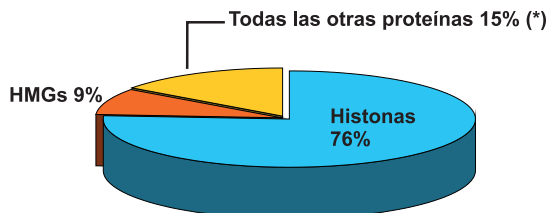
**Citocinesis:** En este último paso se divide el contenido del citoplasma en un proceso que se denomina segmentación, que por lo general comienza en algún momento de la anafase, dando lugar a dos células hijas.

## 5.2. El cromosoma interfásico

Puede pensarse que en la cromatina interfásica los cromosomas están dispuestos aleatoriamente, como los “espaguetis en un plato de pasta”. De hecho, este pensamiento se tuvo en un inicio ya que las técnicas utilizadas por aquel entonces lo único que permitían discernir era la cromatina altamente condensada (heterocromatina) de la menos condensada (eucromatina). Los modelos a favor de una organización no territorial del núcleo se hicieron muy populares en la comunidad científica, de manera que, hasta hace poco más de un par de décadas, el núcleo se consideraba como un saco con fibras de cromatina de diferentes cromosomas entrecruzándose en el nucleoplasma (Mora, 2007). Sin embargo, la aparición de las técnicas de “pintado cromosómico” (técnicas de FISH) en las que se utilizan diferentes sondas de DNA unidas a un fluoróforo para marcar los diferentes cromosomas, y el uso de otras técnicas relacionadas, mostró como los cromosomas interfásicos permanecían como objetos discretos más alargados y con una forma mucho más irregular que los cromosomas metafásicos (ver más adelante). Frecuentemente los dos homólogos se disponen diametralmente opuestos en el núcleo (Parada y Misteli, 2002). El espacio relativo ocupado por cada cromosoma interfásico se llamó territorio cromosómico (Cremer y Cremer, 2001). Dentro de un tipo celular la posición de los cromosomas está más o menos fijada y parece ser que el cromosoma interfásico sólo tiene pequeños movimientos. No obstante, se pueden llegar a dar grandes cambios debido a diferentes estados funcionales de la célula. Es evidente que hay un cierto grado de organización en el núcleo. Sin embargo, parece que existe una gran divergencia de organización entre las diferentes especies. Esta organización también depende del cromosoma en cuestión, ya que hay cromosomas que tienen una mayor tendencia a asociarse que otros. También se ha descubierto que la mayoría de los cromosomas ricos en genes se encuentran normalmente en el centro del núcleo mientras que los cromosomas pobres en genes tienden a disponerse en la periferia nuclear. Por otro lado, también se ha observado que hay una organización cromosomal en función del tamaño, así los macrocromosomas tienden a disponerse en la periferia mientras que los microcromosomas tienden a situarse en una zona más central. Un estudio comparativo reciente indica que tiene más importancia el tamaño cromosómico que la densidad genética (Mora et al., 2006). Parece que los elementos que determinan la disposición relativa de cada cromosoma aún no están del todo claras. Aún así, lo que sí parece estar claro es que existe una heterogeneidad y una cierta regularidad territorial de los cromosomas durante la interfase.

### 5.3. El proteoma del cromosoma metafásico

Dentro del contexto del cromosoma se pueden encontrar multitud de proteínas implicadas en diversas funciones durante las diferentes etapas del ciclo celular (ver capítulo 1). Pero dentro de este grandísimo conjunto de proteínas, ¿cuales de ellas están asociadas al cromosoma metafásico?, ¿en que cantidad? y ¿que importancia tienen en la formación y mantenimiento de la arquitectura del cromosoma metafásico?. Estas son preguntas muy importantes que hasta hace muy poco no tenían respuesta, por lo que se podía especular ampliamente acerca del papel de multitud de factores que intervenían en la arquitectura y modelado cromosómico. Los últimos avances en proteómica han permitido realizar estudios del proteoma de orgánulos enteros. Estos avances han permitido obtener el proteoma de lo que se conoce como el scaffold proteico del cromosoma (ver sección 5.4.1), en el que se han determinado e identificado cualitativamente 79 proteínas (Gassmann et al., 2005), de las cuales el 52 % son componentes conocidos del cromosoma mitótico. El análisis desveló que 15 de las proteínas asociadas no se habían caracterizado antes. En el mismo año Uchiyama et al. (2005) realizaron un estudio mucho más riguroso del conjunto de todo el cromosoma; estos autores hicieron un estudio cualitativo y cuantitativo de cromosomas obtenidos mediante diferentes métodos. En este caso, el análisis del proteoma completo mostró la presencia de 209–107 proteínas asociadas al cromosoma metafásico en función del método de purificación utilizado.



**Figura 5.2: Proteoma del cromosoma metafásico.** Los datos indicados hacen referencia a las relaciones en moles con respecto al total de proteínas del cromosoma metafásico. Datos correspondientes a cromosomas purificados en gradientes de percol (Uchiyama et al., 2005), en los que se encontraron un total de 107 proteínas.

(\*) En esta parte se incluyen 91 proteínas, la más abundante representa el 1,6%. El resto de proteínas contribuyen en  $\leq 1\%$ . La condensina sólo representa el 0,36% y la topoisomerasa II $\alpha$  el 0,11%.

Los datos cuantitativos presentados por Uchiyama et al. (2005) tienen una gran importancia, ya que muestran la cantidad molar de las diferentes proteínas que componen el cromosoma. Estos estudios revelan que las proteínas que se asocian comúnmente a la formación del scaffold y a las que se les atribuye un papel estructural esencial en la formación del cromosoma metafásico, como son la topoisomerasa II $\alpha$  o las proteínas SMC (ver sección 1.3), están en una cantidad muy baja (0,36 % en el mejor de los casos; ver Figura 5.2), comparado con el gran conjunto estructural que forman las histonas ( $\sim 75\%$  molar proteico) en el cromosoma metafásico (ver Figura 5.2). Estos estudios demuestran que las histonas son el elemento proteico

mayoritario y por lo tanto, en principio, el factor más importante en la condensación global de la cromatina durante la formación del cromosoma metafásico. En cambio el resto de proteínas estarían en un segundo plano ayudando en el proceso a un nivel más localizado en zonas concretas. Este estudio, por otra parte, es muy importante para intentar estandarizar el valor e importancia estructural global que se le ha de dar a cualquier complejo proteico que sea susceptible de tener un papel en el mantenimiento o dinámica estructural del cromosoma metafásico.

## 5.4. El cromosoma metafásico

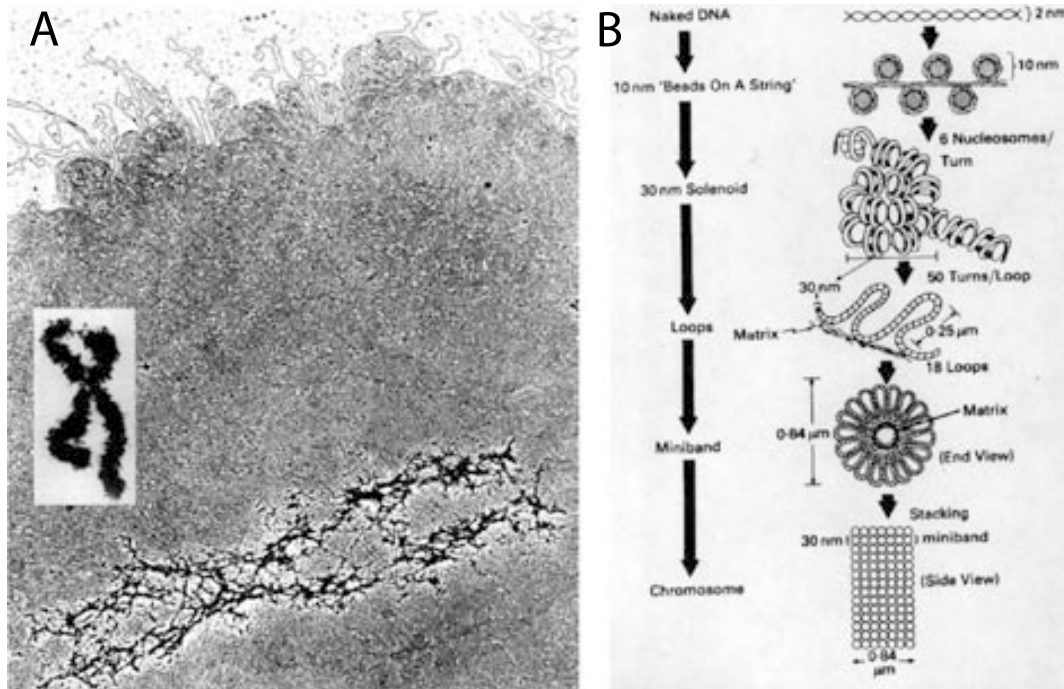
Durante la metafase los cromosomas establecen la máxima condensación de la cromatina para poder pasar a la anafase, en la que se llevara a cabo el proceso de segregación de las cromátides. Este punto es muy importante por que la elevada compactación y reducción del tamaño cromosómico impide que se puedan enredar entre ellos, o romperse. La elevada compactación y la gran sensibilidad a las variaciones del medio, hace muy difícil establecer la manera mediante la cual la cromatina se estructura para dar lugar al cromosoma metafásico. Los datos citogenéticos (ISCN, 2005) y el mapeo genético (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) indican que cada cromosoma está constituido por una única molécula de DNA que va rellenando secuencialmente la cromátide del cromosoma metafásico. Por otra parte, el cromosoma metafásico es un elemento flexible pero resistente mecánicamente, con una rigidez muy inferior a la de las proteínas y el DNA que lo constituyen (Marko, 2008). Esta inconsistencia mecánica dificulta su estudio ultraestructural, pero es indispensable para soportar las tensiones desarrolladas en el huso mitótico durante la segregación cromosómica (Nicklas, 1983).

Se han propuesto diversos modelos que intentan explicar la estructura de la cromatina en el interior del cromosoma metafásico. Sin embargo, después de más de cuatro décadas de modelos y debates a cerca de la estructura y los componentes implicados en la dinámica del plegado del cromosoma, aun hoy en día sigue siendo un problema biológico no resuelto. Aún así, hay un elemento en común a todos los modelos presentados hasta el momento, y es que, en todos los casos los autores fundamentan sus modelos estructurales en la fibra de cromatina de 30–40 nm.

### 5.4.1. Modelos basados en un *scaffold* proteico

Como su nombre indica este modelo está basado en la idea de que en el interior del cromosoma metafásico existe una estructura rígida o *scaffold* (Paulson y Laemmli, 1977; Marsden y Laemmli, 1979; de la Tour y Laemmli, 1988; Saitoh y Laemmli, 1994). Inicialmente los experimentos realizados en el laboratorio de Laemmli y sus colaboradores estaban basados en estudios mediante EM de cromosomas desnaturizados en presencia de EDTA (Marsden y Laemmli, 1979) o de cromosomas a los cuales se les había eliminado las histonas (Paulson y Laemmli, 1977; ver Figura

5.3A). A partir de estas observaciones propusieron que el cromosoma metafásico estaba compuesto por un sistema de lazos, con la fibra de cromatina como unidad básica de plegamiento. Según estos autores, estos lazos contienen entre 50 y 100 kb de DNA y forman estructuras de 250 nm del núcleo al exterior de la cromátide. Los lazos de 250 nm se plegarían helicoidalmente hasta formar las cromátides metafásicas. Según este modelo, las lazadas de cromatina se anclarían al *scaffold* proteico por regiones de DNA concretas ricas en A+T (SARs) que interaccionan específicamente con la topoisomerasa II $\alpha$  (Saitoh y Laemmli, 1994; ver sección 1.3.3). Dentro de esta misma corriente (Maeshima y Laemmli, 2003) propusieron que el *scaffold* estaba compuesto, mayoritariamente, por dos proteínas que clásicamente se denominaron la ScI y la ScII (actualmente topoisomerasa II $\alpha$  y condensina, respectivamente; ver secciones 1.3.3 y 1.3.2). Estos dos complejos proteicos han tenido mucha importancia histórica y han marcado la orientación de multitud de laboratorios implicados en el estudio del papel estructural y funcional de las proteínas involucradas en la formación del *scaffold* cromosómico (para más detalles ver Sumner 2003)



**Figura 5.3: Modelo de cromosoma basado en un *scaffold*.** (A) Micrografía de un cromosoma mitótico al que se le han eliminado las histonas, y en el que se puede observar el *scaffold* (imagen obtenida de Paulson y Laemmli, 1977). (B) Esquema de las minibandas propuesto por Pienta y Coffey (1984).

Otro modelo relacionado con esta corriente es el de las minibandas (ver Figura

5.3B) de Pienta y Coffey (1984). En este modelo la fibra de cromatina formaría lazos anclados a una matriz nuclear, donde 18 lazos, de 60 kb de DNA/vuelta cada uno, dispuestos radialmente formarían la unidad estructural conocida como minibanda. En el caso del cromosoma IV humano, la cromátide estaría formada por 106 minibandas. Las evidencias más importantes de los modelos de lazos se basan en estudios de microscopía electrónica. En estos estudios, a partir de cromosomas desprovistos de histonas a causa de una elevada fuerza iónica se determinó que los lazos tenían 30-90 kb de DNA (Paulson y Laemmli, 1977). Filipski et al. (1990) basándose en experimentos de digestión con endonucleasas realizaron una aproximación diferente. Sus resultados mostraban que después de realizar una digestión con nucleasas poco específicas los fragmentos de DNA encontrados eran de 300 kb y después de una digestión más extensa encontraban fragmentos de 50 kb. Estos resultados se podían interpretar asumiendo que la cromatina se estructuraba en lazos de 50 kpb y que estos a su vez formaban rosetas (compuesta por 6 lazos) que se enrollaban helicoidalmente para formar finalmente la cromátide.

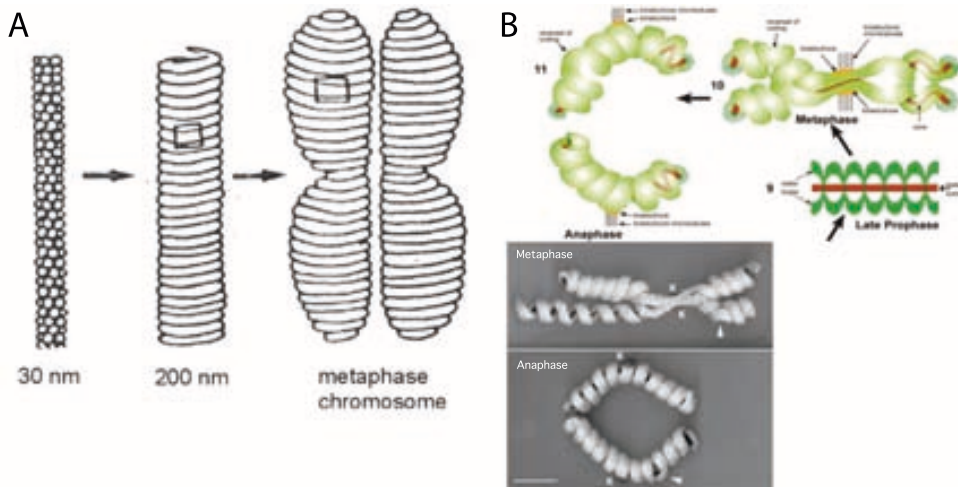
Pese a ser un modelo muy criticado en un inicio (sobre todo por la presencia de un eje proteico central rígido), esta corriente ha sido la más aceptada en la bibliografía (ver por ejemplo Sumner 2003 y Alberts et al. 2008). En la última década se han realizado estudios de inhibición de la expresión de la topoisomerasa II $\alpha$  y las condensinas, así como estudios de dinámica de estos complejos y el análisis de *stretching* de cromosomas metafásicos. Estos resultados son inconsistentes con la existencia de un *scaffold* cromosómico (ver Belmont 2006 y Marko 2008; ver secciones 1.3.2, 1.3.3 y 5.4.5).

#### 5.4.2. Modelo de plegamiento helicoidal

El modelo helicoidal también tiene en común la fibra de 30-40 nm como unidad de plegado. En este caso se daría un plegamiento helicoidal de la fibra de cromatina dando lugar a una fibra de orden superior de 150-300 nm de diámetro. Este fenómeno se ha observado en algunos casos en cromosomas de plantas y animales, pero puede ser debido a artefactos provocados por el método de preparación de la muestra (Ohnuki, 1965). Posteriormente, este fenómeno fue observado por Sedat y Manuelidis (1978), y con más detalle por Rattner y Lin (1985) y de la Tour y Laemmli (1988). Dentro de este conjunto hay un modelo que no contempla la existencia de un *scaffold* proteico (Taniguchi y Takayama, 1986), pero también se ha propuesto que la helicoidicidad es debida a un núcleo proteico contractil (Stack y Anderson, 2001).

En el modelo propuesto por Taniguchi y Takayama (1986) la fibra de 30 nm se plega helicoidalmente dando lugar a una fibra de orden superior de 200 nm de diámetro. Esta fibra intermedia, nuevamente se condensaría helicoidalmente para formar la cromátide metafásica (ver Figura 5.4A). En el caso del modelo propuesto por Stack y Anderson (2001) la fibra de 30 nm se anclaría a un núcleo proteico





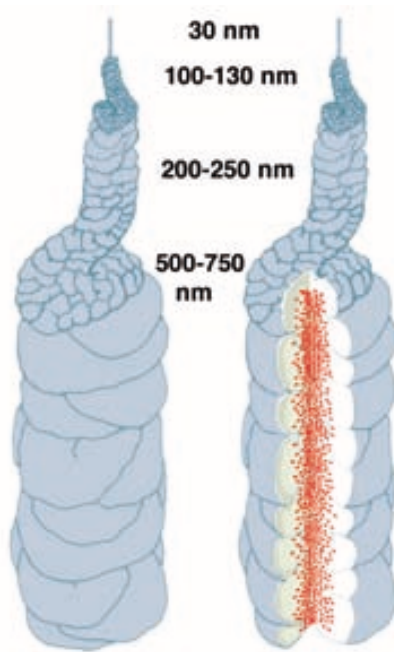
**Figura 5.4: Modelo helicoidal de cromosoma.** (A) Modelo helicoidal presentado por Taniguchi y Takayama (1986) en el que no hay un *scaffold* proteico. En este modelo la fibra de 30 nm se enrolla en un primer paso para formar una nueva fibra de 200 nm que se utiliza como base para formar la cromátide. (B) Modelo helicoidal en el que se tiene en cuenta la presencia de un *scaffold* proteico. Dibujo esquemático (arriba) y modelo realizado con una cuerda (abajo) del cromosoma metafásico y anafásico (Figura adaptada de Stack y Anderson 2001).

formando lazos y dando lugar a una estructura cilíndrica que en la metafase se condensaría helicoidalmente para formar la cromátide (ver Figura 5.4B).

### 5.4.3. Modelo de plegado jerárquico

Este modelo está basado en el plegamiento jerárquico y sucesivo desde la fibra de collar de perlas (10 nm) hasta la formación de las cromátides, pasando por diferentes intermediarios poco definidos. Este modelo, a diferencia de los modelos basados en un *scaffold*, no requiere de éste para el plegado del cromosoma durante la mitosis, pero, por otra parte, tiene en cuenta el papel dinámico de las proteínas supuestamente implicadas en la formación del *scaffold* (Kireeva et al., 2004). Los primeros resultados que sugirieran este modelo jerárquico proceden de estudios de microscopía electrónica de cromosomas parcialmente desestructurados. Los estudios revelaban la existencia de diferentes dominios estructurales (8, 12, 24, 40–50, 80–100 y 100–130 nm) que podrían formar una sucesión jerárquica hasta componer la cromátide. Estos resultados no concordaban con un modelo de lazos anclado a un eje proteico (Belmont et al., 1987). Estudios posteriores de cromosomas interfásicos permitieron observar diversas agrupaciones cromatínicas a las que nombraron como cromonemas (Belmont y Bruce, 1994). Finalmente, basándose en sus resultados microscópicos, en los resultados de dinámica de la topoisomera II $\alpha$  y las condensinas propusieron un modelo para el cromosoma metafásico (ver Figura 5.5) basado en

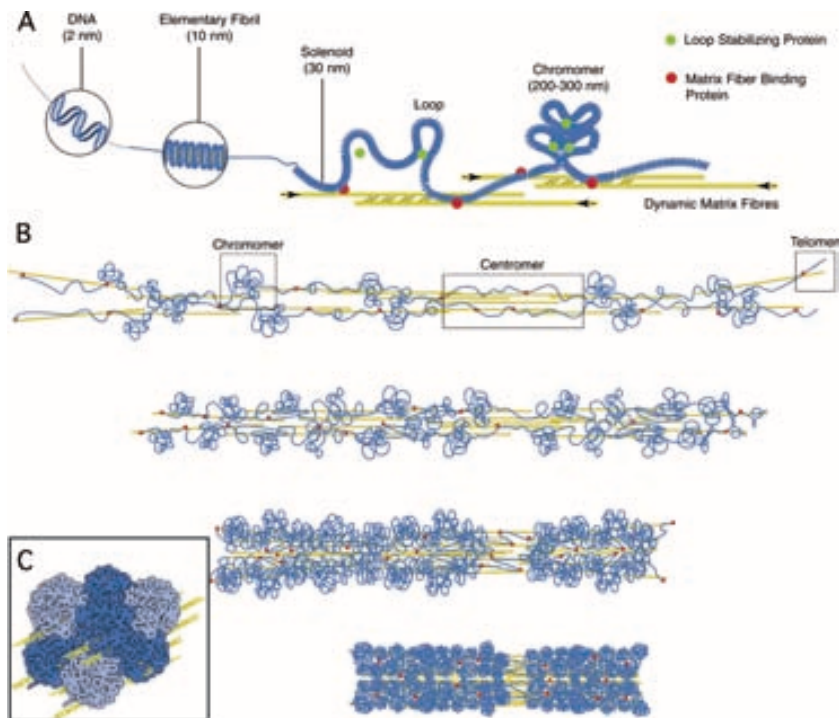
un plegamiento jerárquico (Kireeva et al., 2004) en el que la cromatina tiene una morfología amorfa.



**Figura 5.5: Modelo jerárquico de plegado axial.** En la imagen de la izquierda se muestra el modelo estructural de plegado del cromosoma metafásico. La fibra de cromatina de 30 nm se pliega en la fibra de cromonema (100–130 nm), la cual se vuelve a plegar en una fibra profásica intermedia de 200–250 nm, y ésta finalmente se pliega formando la cromátide metafásica. En la imagen de la derecha se indica (color rojo) la distribución axial de la condensina que actuaría como un pegamento (“glue”) axial. Figura adaptada de Kireeva et al. (2004).

#### 5.4.4. Modelo basado en cromómeros

Otro modelo de condensación de los cromosomas se basa en estructuras discretas denominadas cromómeros, los cuales se pueden definir como agregaciones cromatínicas que no tienen una orientación obvia. Este fenómeno fue observado durante el proceso de condensación de los cromosomas en la profase temprana, en los que aparecían unas agrupaciones circulares de 70–230 nm que llamaron “paquetes” de cromatina (el Alfy y Leblond, 1989). Posteriormente Cook (1995) realizó el primer modelo cromosómico basado en cromómeros, que al agregarse formarían una estructura cilíndrica, la cromátide. Este modelo propone que los lazos de cromatina están unidos a factorías de transcripción remanentes durante la mitosis, la unión de estas factorías provocaría acúmulos de cromatina (cromómeros). Posterior a este trabajo, se publicó otro posible modelo para la estructura del cromosoma metafásico basado en cromómeros (Wanner y Formanek, 2000). En este caso el modelo se fundamenta en la formación de lazos de cromatina a partir de la fibra solenoidal, la cual se estabilizaría a través de unas proteínas estabilizadoras de los lazos formando un cromómero (200–300 nm), estos cromómeros se unirían a través de unas proteínas de unión específicas a una matriz proteica dinámica axial (ver Figura 5.6). Gracias a esta matriz axial dinámica, los cromómeros se reagruparían para formar finalmente



**Figura 5.6: Modelo de cromosoma basado en cromómeros.** (A) Esquema de la condensación del DNA pasando por la fibra de solenoidal de 30 nm. El solenoide se une a la matriz fibrilar a través de unas proteínas de unión a la matriz (círculos rojos). La condensación de la cromatina se lleva a cabo gracias a las fibras dinámicas de la matriz. Durante la condensación de la matriz, los cromómeros se forman gracias a las proteínas estabilizadoras de lazos (círculos verdes). (B) Esquema del proceso de condensación del cromosoma. La condensación se establece atrayendo los extremos teloméricos hacia los centrómeros y a través de la matriz de fibras dinámicas. (C) Modelo del cromómero: Agrupaciones de 50 lazos componen el cromómero que tiene un diámetro de 200–300 nm, que se une durante la mitosis a la matriz dinámica. Figura adaptada de Wanner y Formanek (2000).

las cromátides. El centrómero sería una zona desprovista de cromómeros de acuerdo con las imágenes de SEM.

#### 5.4.5. Modelos basados en propiedades dinámicas

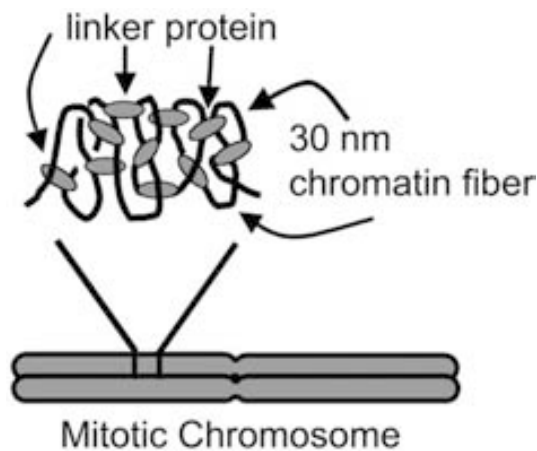
El desarrollo de técnicas de estudio de molécula única ha supuesto un gran avance para el estudio de las propiedades mecánicas de estructuras aisladas. Gracias a estas técnicas se han podido estudiar las propiedades mecánicas del cromosoma. En este apartado se describen algunos de los estudios más recientes de la estructura del cromosoma metafásico, basados en el análisis de sus propiedades elásticas.

#### 5.4.5.1. Modelo de *network* de cromatina

El modelo propuesto por el laboratorio de John F. Marko está basado en el comportamiento elástico de los cromosomas mitóticos sometidos a una tensión mecánica con ayuda de unas micropipetas (Houchmandzadeh et al., 1997; Poirier et al., 2000). Este modelo está sustentado en una serie de trabajos experimentales que aportan evidencias claras de que no existe un *scaffold* proteico que mantiene la integridad estructural del cromosoma mitótico en condiciones fisiológicas. Este trabajo se inició con un estudio de *stretching* (estiramiento) de cromosomas, realizado directamente en el interior de una célula de tritón y utilizando como uno de los puntos de anclaje la propia placa metafásica. Los cromosomas podían extenderse de forma reversible (elásticamente) hasta 10 veces su tamaño (módulo de elasticidad  $\sim 1$  nN; Houchmandzadeh et al., 1997). Un estudio posterior realizado con cromosomas aislados revelaba que a medida que los cromosomas se estiraban a una mayor longitud, el módulo elástico se reducía hasta unas 20 veces (estiramientos alrededor de 30 veces su tamaño) y tenían una apariencia más laxa. Estos resultados indicaban que el proceso había afectado a la integridad mecánica del cromosoma. Únicamente cuando se realizaban estiramientos de hasta unas 100 veces su tamaño, el cromosoma se podía llegar a romper (Poirier et al., 2000), indicando que son estructuras extremadamente flexibles. También determinaron que a concentraciones iónicas elevadas ( $> \text{NaCl}$  500 mM y  $> \text{MgCl}_2$  200 mM) y bajas ( $< 30$  mM NaCl) se producía una relajación en la tensión mecánica del cromosoma provocada por una descondensación del mismo, que es reversible si en el periodo de 1 min se restablecen las condiciones fisiológicas iniciales. Por el contrario en presencia de concentraciones intermedias de iones divalentes ( $\text{MgCl}_2$  10 mM o  $\text{CaCl}_2$  20 mM) se producía un incremento del módulo elástico (Poirier et al., 2002), indicando que los factores electrostáticos son fundamentales en los mecanismos de condensación de la cromatina. Unos experimentos adicionales mostraban como 1/3 parte del volumen del cromosoma esta ocupado por agua. Por otra parte, estos resultados eran un claro indicio de que el cromosoma es una entidad elástica y dinámica, sugiriendo una incompatibilidad con la presencia de un *scaffold* proteico rígido en su interior.

El comportamiento mecánico de cromosomas digeridos con nucleasa micrococcal (MNasa) y con diversas enzimas de restricción (Poirier y Marko, 2002b) y un posterior trabajo en el que se digirieron los cromosomas con tripsina y proteinasa K (Pope et al., 2006), demostraron de manera concluyente que en condiciones nativas no existe un eje proteico o *scaffold*. En Poirier y Marko (2002b) demostraron como la digestión específica del DNA causaba la pérdida completa e inmediata de la respuesta elástica, por el contrario la digestión con proteasas producía una reducción parcial y gradual del comportamiento elástico (Pope et al., 2006). Estos datos indicaban que la integridad y mecánica global del cromosoma es debida al propio DNA. El uso alterno de diferentes enzimas de restricción les permitió concluir que el cromosoma presentaba una estructura reticular (*network* de cromatina) en la que

cada 15 Kb de DNA se produciría un entrecruzamiento (ver Figura 5.7). Recientemente este grupo ha realizado otra aportación, en este caso referente al efecto de la topoisomerasa II $\alpha$ . La adición de esta enzima sobre cromosomas expuestos a una tensión mecánica determinada, provoca una disminución de la rigidez mecánica. Estos autores han interpretado que estos resultados son debidos a la capacidad de esta enzima de deshacer “enredos” de DNA (Kawamura et al., 2010). La contribución de este laboratorio ha supuesto un gran impulso en contra de un modelo basado en un eje proteico rígido, modelo que actualmente esta perdiendo fuerza en el campo a pesar de haber tenido resultados recientes en su favor (ver la siguiente sección).



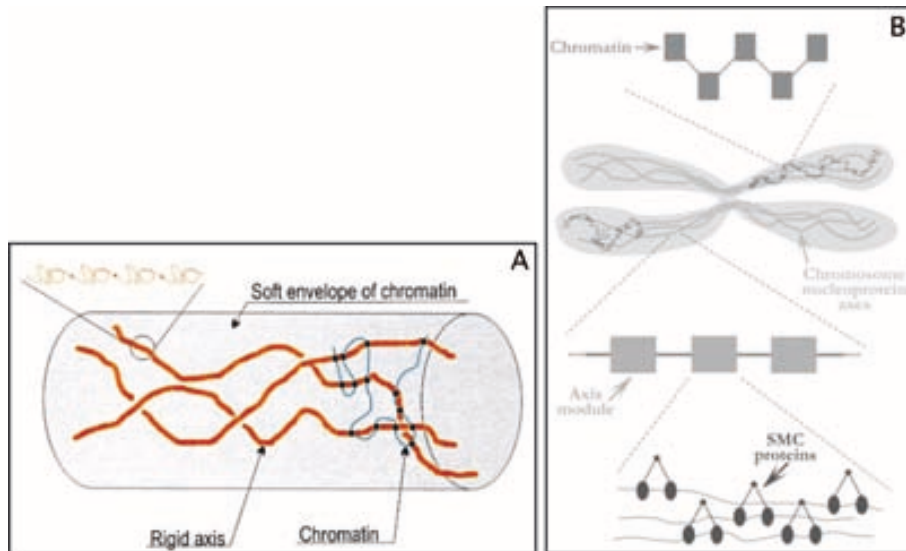
**Figura 5.7: Modelo de *network* de cromatina.** En este modelo la cromatina de 30–40 nm está representada por una línea negra, y los óvalos de color gris indican las proteínas que interconectan la cromatina para formar un *network*. Este modelo se fundamenta en el hecho de que las proteínas de unión mantienen la integridad estructural de la cromatina. Cuando el cromosoma se digiere con MNasa o enzimas de restricción se crean cortes entre los puntos de unión lo que provoca una pérdida de las propiedades mecanoelásticas. Según este modelo los puntos de entrecruzamiento deben disponerse homogéneamente a lo largo de la estructura del cromosoma. Figura procedente de Poirier y Marko (2002b).

#### 5.4.5.2. Modelo *mixto*

Este modelo también se basa en propiedades mecánicas, pero en este caso de reconstituidos cromosómicos a partir de extractos de huevos de *Xenopus laevis*. Houchmandzadeh y Dimitrov (1999) realizaron una serie de experimentos en los que combinaron el *stretching* de cromosomas mediante micropipetas con estudios de la persistencia longitudinal<sup>1</sup>. La combinación de estas técnicas indicaba que aparentemente estos reconstituidos presentaban una mayor resistencia mecánica a ser estirados que a ser doblados. El valor experimental de persistencia longitudinal era 2000 veces inferior que el calculado teóricamente a partir del valor del módulo de Young observado a lo largo del eje de la fibra. De este modo propusieron un modelo mixto en el que la cromátide estaría formada por una estructura rígida, compuesta por filamentos de un diámetro pequeño ( $\leq 20$  nm), rodeada por una envoltura suave de cromatina (ver Figura 5.8A). Del mismo modo que ocurre con un cable eléctrico, el cual está formado por filamentos delgados de cobre, es más fácil doblar el cromosoma que estirarlo a lo largo de las cromátides. Por lo tanto este modelo considera

<sup>1</sup>La persistencia, en este caso, es una medida de la longitud a partir de la cual el cromosoma puede ser doblado o flexionado a lo largo del eje de las cromátides.

un *scaffold* proteico filamentoso. Un estudio posterior, utilizando el mismo tipo de



**Figura 5.8: Modelo de cromosoma mixto basado en las propiedades elásticas.** (A) La cromátide está compuesta por una matriz de ejes rígidos y elásticos envueltos por una capa mucho más blanda de cromatina. Estos ejes están compuestos por una molécula similar a la titina, que se dispone formando dominios (imagen procedente de Houchmandzadeh y Dimitrov 1999). (B) esquema del cromosoma en el que se esquematiza la disposición modular de los ejes rígidos. Cada módulo tendría varias SMCs así como otras proteínas asociadas al DNA. Los ejes son un sistema dinámico que se ensamblaría al inicio de la mitosis al unirse los complejos activos de las condensinas (imagen adaptada de Almagro et al. 2004)

reconstituido cromosómico, aportó más datos reforzando su teoría de un sistema mixto (Almagro et al., 2004). En este caso corroboraban que las propiedades elásticas de los cromosomas eran debidas al DNA (en un experimento muy parecido al realizado por Poirier y Marko 2002b) y no era dependiente de la posible presencia de RNA. Por otra parte, un estudio comparativo entre el método de *stretching* clásico y un método en el que se utilizan las micropipetas derivadas con anticuerpos, les permitió determinar que existe una organización heterogénea en el interior de sus reconstituidos cromosómicos. En esta organización las SMCs tienen un papel importante en el mantenimiento de la elasticidad de los cromosomas (ver Figura 5.8B), y deben ser esenciales en la formación de la estructura, con forma cilíndrica, de la cromátide. Por otra parte estos autores, de acuerdo con el trabajo presentado por Strick et al. (2001), concluyen que, la condensación global del cromosoma es debida a un fenómeno de apantallamiento de las cargas de los fosfatos por el efecto de los iones divalentes.

Este modelo se contradice claramente con el modelo propuesto por Poirier y

---

Marko (2002b) mostrado en la sección anterior, y ha sido motivo de debate durante unos años. No obstante, el hecho de que estos últimos autores utilizaran cromosomas reconstituídos y los últimos resultados de dinámica de las SMCs y la topoisomerasa II $\alpha$  (ver secciones 1.3.2 y 1.3.3; también ver Belmont 2006 y Marko 2008) ha permitido abandonar la idea de que existe algún tipo de eje proteico o *scaffold* que mantiene la estructura y dirige la condensación del cromosoma.





## Capítulo 6

# Microscopía de Sonda Próxima en Biología Molecular

*“Las técnicas de sonda próxima han extendido nuestra capacidad de sentir hasta un micromundo o nanomundo y en este camino han aportado una nueva manera de entenderlo a partir de técnicas microscópicas. Más allá de esto, tocar las cosas es un paso esencial para la manipulación de las cosas, y la habilidad de sentir y manipular moléculas únicas es un nuevo paso que marca una gran diferencia en la manera que tenemos de entender e interactuar con el mundo que nos rodea.”*

J. K. Heinrich Hörber

*La Microscopía de Sonda Próxima (SPM; Scanning Probe Microscopy) es un término que engloba un conjunto de técnicas para efectuar diversas medidas (mecánicas, Oncins et al., 2008; eléctricas, Wold y Frisbie, 2001; magnéticas, Cui et al., 2004, etc.) que han evolucionado conjuntamente o han permitido evolucionar, según se mire, la Ciencia de Materiales y de Superficies, impulsando la interacción con la materia a una escala nanométrica y subnanométrica, y posibilitando la creación de un nuevo campo: la Nanotecnología. Más recientemente esta tecnología se ha podido aplicar en Biología abriendo un amplio espectro de nuevas aproximaciones (dentro de lo que se conoce como single-molecule), imposibles de concebir hasta hace unos pocos años.*

### 6.1. Una breve historia

La SPM apareció a principios de los 80 cuando Binnig y Rohrer desarrollaron el microscopio de efecto túnel (STM, *Scanning Tunneling Microscope*; Binnig et al., 1982) en los laboratorios de IBM en Zurich. Este microscopio mide la corriente de efecto túnel entre dos muestras muy conductoras como *feedback* para controlar la

proximidad entre las dos superficies, permitiendo obtener y analizar la topografía de la muestra. La ventaja más importante de esta técnica es que por primera vez se podía tener una imagen de forma no destructiva y realista de la topografía de una superficie a escala nanométrica. Por otra parte, esta técnica permitía manipular los átomos de la muestra. La importancia de este avance tecnológico les llevó a ganar el Premio Nobel de Física en 1986. Ese mismo año, nuevamente Binnig junto con Quate y Gerber desarrollaron un microscopio de sonda próxima que se basaba en las interacciones de van der Waals (Binnig et al., 1986). Este nuevo aparato, que no tenía involucrado ningún fenómeno de transporte electrónico, se llamó *Atomic Force Microscope* (AFM).

La parte esencial de un SPM en general, y como su nombre indica, es el uso de una sonda o punta a través de la cual se interacciona con la superficie o la muestra (ver sección 11.2.2). El avance de la tecnología asociada a la micro fabricación de las puntas ha sido uno de los pasos claves en el desarrollo de los SPM en general. Otro elemento importante en el desarrollo de un AFM es el mecanismo que nos permite mover la punta muy cerca de la muestra y escanearla con mucha precisión para poder tener una buena resolución. Lo que permite tener esta enorme precisión, es la propiedad de algunos materiales a modificar su tamaño proporcionalmente a un campo eléctrico. Inversamente, este tipo de material puede generar un campo eléctrico cuando se ejerce una fuerza sobre ellos (piezoelectricidad; ver sección 11.2.4), efecto que fue descrito para el cuarzo por Pierre y Jaques Curie en 1880 (Hörber, 2002).

De la invención de los primeros microscopios de sonda próxima ya hace más de 20 años, y desde entonces han habido muchos cambios. Los AFM han ido evolucionado y perfeccionándose en todos sus aspectos. En un inicio estos microscopios eran de dominio exclusivo para estudios de ciencia de materiales. Pero a partir de finales de los años 80 esta técnica se pudo utilizar en la visualización de muestras biológicas en un ambiente fisiológico (Drake et al., 1989), en parte, gracias a la implementación de un láser para un control más fino de la fuerza aplicada por la punta (Alexander et al., 1989). Este último punto fue decisivo, ya que las muestras biológicas son blandas y fácilmente deformables, de modo que se ha de aplicar el mínimo de fuerza posible sobre la muestra para que la forma topográfica obtenida no se vea afectada por la adquisición de la imagen (Jena y Cho, 2002). A principios de los años 90 ya se pudieron hacer los primeros análisis de Espectroscopia de Fuerza Atómica (AFS) de células enteras en los que se evaluó la elasticidad (Henderson et al., 1992; Radmacher et al., 1996). En el caso de la Microscopía de Fuerza Lateral (LFM) o de Fuerza de Fricción (FFM) fue precisamente la aparición del AFM lo que permitió avanzar claramente en la comprensión de los procesos de fricción (o Tribología) a escala atómica (Nanotribología). Se ha podido estudiar experimentalmente el efecto de la teoría de los fonones (Popov, 2001) propuesto por McClelland en los 80 (ver sección 6.4.1). No obstante, aún hoy en día el fenómeno de la fricción escala atómica es motivo de estudio y de debate (Carpick, 2006; Cannara et al., 2007; Mo et al.,

2009). Esta técnica ha sido muy utilizada en el estudio de materiales estructurales de elevado interés tecnológico (Bennewitz, 2005), pero también se ha utilizado para el estudio de materiales blandos (Carpick y Salmeron, 1997). Debido a los problemas metodológicos asociados, hasta hace muy poco no se han podido realizar estudios de fricción cuantitativos a escala nanométrica sobre material biológico (Grant y Tiberg, 2002; Oncins et al., 2005). El desarrollo de técnicas típicamente utilizadas en el estudio de Ciencia de Materiales/Superficies está abriendo sus puertas al estudio de las propiedades mecánicas y estructurales de materiales procedentes de sistemas biológicos (Magonov y Yerina, 2005).

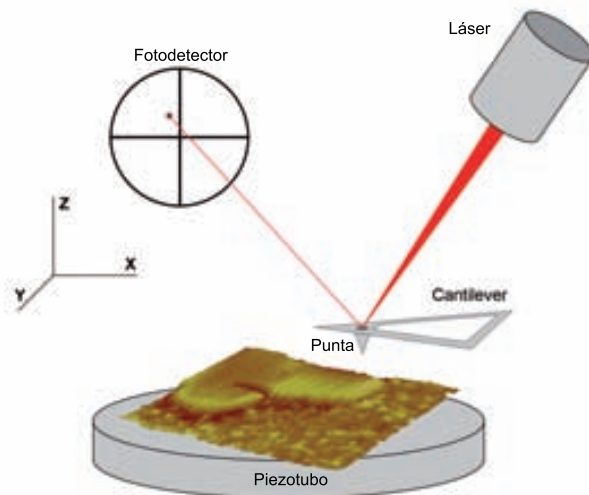
## 6.2. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

### 6.2.1. AFM. ¿Cómo funciona?

El principio operativo de un AFM es muy sencillo; se basa en la interacción mecánica entre una sonda y la muestra. La sonda que en este caso está compuesta por un *microcantilever* (micropalanca) con una punta muy afilada (ver sección 11.2.2), es la que interactúa con la muestra para obtener la imagen. El *cantilever* detecta las fuerzas de interacción que se establecen entre la punta y la muestra, que pueden ser de van der Waals (Lee y Sigmund, 2002), repulsiones electrostáticas (Butt, 1991) y electrónicas (Zypman y Eppell, 1997) debidas al contacto tan estrecho entre la punta y la muestra. Cuando estamos a una escala nanométrica el concepto de contacto macroscópico se ha de redefinir, ya que las interacciones entre las dos superficies se tienen que tomar en cuenta de forma cuidadosa. Aun así, para simplificar la explicación se hablará de “contacto” en referencia a la aproximación estrecha entre la punta y la superficie.

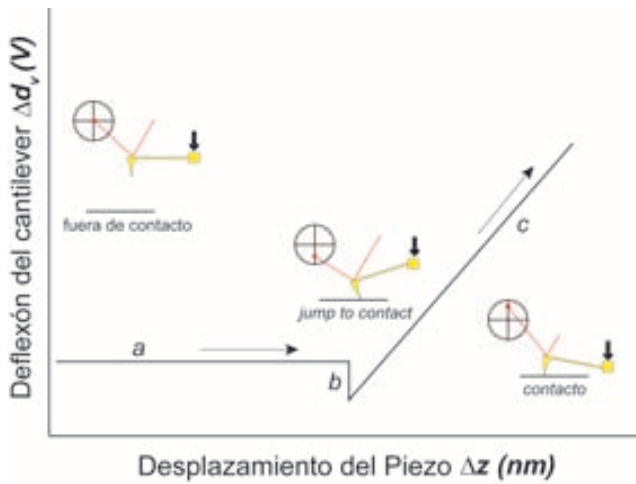
Teniendo en cuenta que en los AFM modernos se establece un control de la posición del *cantilever* a través de un láser, el funcionamiento es el siguiente: Cuando la punta entra en contacto con la superficie entonces el *cantilever* se deflexiona (se dobla) cuando una cierta  $F_v$  (fuerza vertical) se aplica sobre la muestra. Esta deflexión se transforma en una señal eléctrica gracias a que el láser, que se refleja en la parte trasera del *cantilever*, incide en un fotodetector (detectada como un  $\Delta d_v$ , ver más adelante). Esta señal se procesa como un punto topográfico en el espacio que viene determinado por la posición de la punta en los ejes  $xyz$ . De esta forma, mientras la punta va escaneando la muestra se va creando una imagen topográfica del área escaneada (ver Figura 6.1).

En AFM es útil analizar la deflexión del *cantilever* vs. el desplazamiento del piezo ( $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$ ) que se ha esquematizado en la Figura 6.2 (pág. 51). Este tipo de curvas se comentará más ampliamente en algunos apartados de esta tesis. Básicamente consisten en el acercamiento vertical progresivo de la punta hacia la muestra (experimento de nanoindentación; ver sección 6.3.1). En la primera fase la punta está lejos de la superficie por lo que no se observa una interacción entre la punta



**Figura 6.1: Esquema de funcionamiento de un AFM.** La sonda va escaneando la superficie de la muestra a lo largo del eje  $x$  e  $y$ , que en este caso está montada sobre el piezotubo. La deflexión del *cantilever* (proporcional al valor de  $F_v$  aplicado sobre la muestra) se mantiene constante, y es el piezotubo, que contiene la muestra, el que se extiende (movimiento hacia arriba) o se retrae (movimiento hacia abajo) adaptándose para mantener el contacto con la muestra. El sistema mantiene la deflexión del *cantilever* constante gracias a un *loop* que crea un *feedback* que constantemente mide la posición del láser que se refleja en la parte trasera del *cantilever*, proyectándose en el fotodetector. La señal que sale de éste es la que utiliza la electrónica del microscopio para mantener la deflexión mediante el movimiento del piezo a lo largo del eje  $z$ . Figura adaptada de Oncins (2007).

y la muestra (Figura 6.2a), de manera que no hay ningún cambio observado como  $\Delta d_v$  (la deflexión del *cantilever* es detectada como un punto de láser que se mueve a lo largo del fotodetector y se expresa en Voltios). A medida que la distancia entre la punta y la muestra se reduce se pueden establecer ciertas interacciones de van der Waals, electrostáticas, etc. que pueden provocar una deflexión repentina hacia la muestra (b) en un proceso que se conoce como *jump to contact* (Miesbauer et al., 2003). A medida que la punta se sigue aproximando a la muestra la repulsión punta-muestra se hace dominante y la punta se deflexiona hacia arriba (c); momento en el que podemos considerar que se establece un “contacto real”, al menos en un sentido macroscópico.



**Figura 6.2: Relación entre fotodetector-cantilever.** Curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  teórica obtenida con una AFM que ejemplifica los diferentes regímenes de contacto entre la superficie y la punta. (a) La punta está muy lejos de la superficie y por lo tanto se encuentra en equilibrio sin deflexionarse. (b) Al acercarse a la superficie el *cantilever* se deflexiona hacia abajo debido a las fuerzas atractivas. (c) Cuando la punta está en contacto con la muestra, a medida que la punta ejerce más fuerza sobre la superficie, ésta se deflexiona hacia arriba. En los tres casos se puede observar la repercusión que tiene la posición del *cantilever* sobre el reflejo del láser en el fotodetector.

## 6.2.2. Modo topográfico

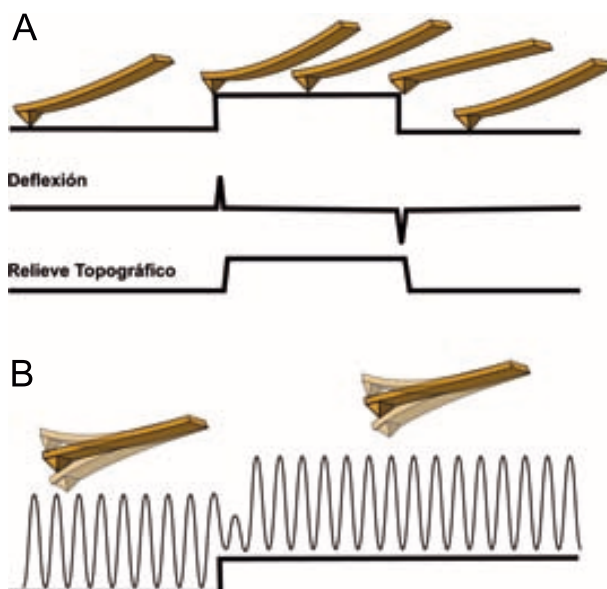
Este es el modo utilizado para obtener imágenes 3D de la superficie que se está escaneando. Dentro de este modo operacional encontramos dos variantes: El *contact mode* y el Amplitud de Modulation (AM-AFM) *mode*.

### 6.2.2.1. *Contact mode*

Este método fue el primero en utilizarse (Magonov y Yerina, 2005; Oncins, 2007). En este modo la sonda está en permanente contacto con la muestra y la fuerza que ejerce el *cantilever* sobre ésta se ha de tener muy en cuenta, sobre todo cuando se trabaja con muestras blandas fácilmente deformables, como es el caso de las muestras biológicas, en las que se suele utilizar un *cantilever* con una constante de fuerza vertical ( $k_v$ ) muy baja para no dañar la muestra. Hoy en día se pueden encontrar *cantilevers* con una  $k_v$  entre 300–0.01 nN/nm con lo que se pueden realizar imágenes en contacto de muestras biológicas sin ningún problema. Por otra parte, el *contact mode* es el método que permite obtener una mayor resolución sobre todo en muestras duras como metales, minerales y algunos polímeros. A medida que la punta va resiguiendo la superficie de la muestra el *cantilever* se dobla hacia arriba hasta cierto punto. Para poder realizar una imagen topográfica, el sistema de *feedback* de la electrónica mantiene la  $d_v$  constante acomodando la distancia entre la punta y la muestra para que se mantenga el contacto, perturbando la muestra lo mínimo posible (ver Figura 6.3A). Mientras más rápido y sutil es el *feedback* más detalles tendrá nuestra imagen y menos se dañará, en el caso de una muestra biológica.

### 6.2.2.2. *Amplitude Modulation (AM-AFM) mode*

En este modo el *cantilever* se hace vibrar a su amplitud de resonancia de forma constante mediante otro piezoeléctrico. De manera que el contacto entre la muestra y la punta es intermitente (Kuhle et al., 1997), reduciendo la fricción con la muestra. Éste es el modo más adecuado para trabajar con sistemas biológicos en líquido, ya que preserva mucho más los materiales blandos. Cuando la punta se acerca a la muestra, la amplitud de vibración se reduce debido a la interacción entre la muestra y la punta (Figura 6.3B). Precisamente, esta amplitud es la que se utiliza como señal de referencia por el sistema de *feedback* para mantener el contacto y poder crear



**Figura 6.3: Modos Topográficos.** (A) Esquema de funcionamiento del *contact mode*. Arriba se observa esquematizado el proceso de escaneo de la superficie por parte de la punta donde se puede observar el grado de deflexión del *cantilever* que se traduce en una señal (curva central), en la que se aprecian unas transiciones debidas al cambio en el relieve de la superficie; las transiciones inmediatamente provocan el reajuste, mediante el sistema de *feedback*, de la distancia respecto a la muestra retornando la deflexión al valor de referencia. En la curva de abajo se esquematiza la imagen topográfica resultante, que como se puede observar difiere de la superficie real debido a la geometría de la punta (ver sección 11.2.2). (B) Esquema de funcionamiento del *AM-AFM mode*. En este caso se observa el patrón de oscilación de la punta, cuya amplitud cambia debido a la topografía de la superficie. En este modo, el cambio en la amplitud es utilizado como mecanismo de control, y gracias al sistema de *feedback* permite reajustar la distancia entre la punta y la muestra para mantener una distancia punta-muestra constante. Imágenes adaptadas de la página web: <http://www.freesbi.ch>.

la imagen (García y Pérez, 2002). En AM-AFM *mode* se utilizan *cantilevers* con una  $k_v$  más baja reduciendo así el posible daño que se pueda realizar. Este modo ha abierto un gran abanico de posibilidades debido a la baja interacción con la muestra. Precisamente, la ventaja de este tipo de interacción con el material biológico está en contraposición a la compleja dinámica de interacción punta-muestra que, en algunos casos, puede llegar a complicar la interpretación (Magonov y Yerina, 2005).

### 6.3. Espectroscopia de Fuerza Atómica (AFS)

El AFM combina una elevada sensibilidad para aplicar y medir fuerzas, y una elevada precisión en la posición relativa entre punta-muestra en las tres dimensiones, además de la posibilidad de operar en condiciones fisiológicas (Drake et al., 1989; Murphy et al., 2006). Un tipo de estudio que hace uso de estas cualidades básicas de un AFM, es la AFS mediante la cual ha sido posible realizar estudios de las propiedades mecánicas y elásticas de células enteras (Radmacher et al., 1996; Radmacher, 2002) y de biomoléculas (García-Manyes et al., 2005b,a).

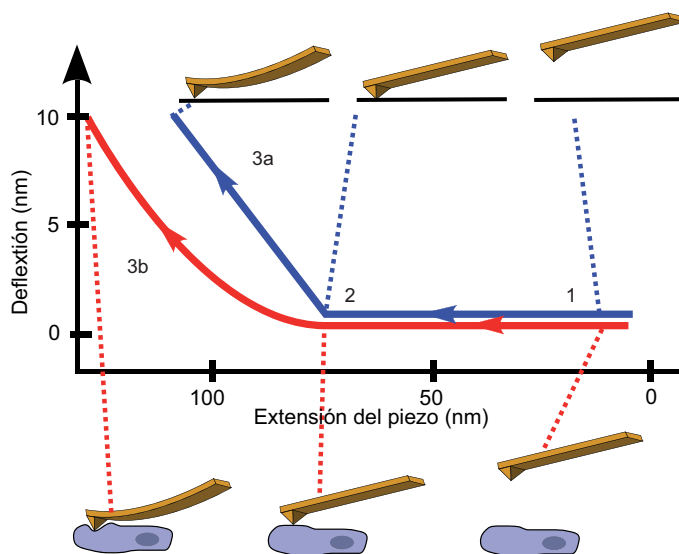
#### 6.3.1. Conceptos básicos de AFS: Nanoindentación

En un AFM, un experimento de indentación<sup>1</sup> ( $\delta$ ) se realiza utilizando el modo de “curvas de fuerza” (ver sección 12.1) en el que la deflexión del *cantilever* se representa en función del movimiento del piezo en el eje  $z$  (ver esquema en la Figura 6.2, pág. 51). Si estamos aplicando la fuerza sobre una muestra muy rígida, la deflexión ( $d_v$ ) es constante mientras la punta no está en contacto con la superficie y linealmente proporcional a medida que se incrementa la presión en la región de contacto (Figura 6.2c y 6.43a, línea azul). Con las muestras blandas, la punta puede deformar (comprimir) la muestra cuando la Fuerza vertical ( $F_v$ ) ejercida se incrementa (Figura 6.43b, línea roja; Radmacher et al., 1996; Radmacher, 2002). Entonces la deflexión de la punta es menor que el desplazamiento relativo entre la muestra y la punta, esta diferencia es la indentación de la muestra. Por lo tanto, este modo nos permite evaluar el comportamiento nanomecánico de una gran variedad de muestras en función de la  $F_v$  aplicada, que puede ir del orden de los picoNewtons (pN) a los miliNewtons (mN). El estudio de las curvas de fuerza (i.e  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$ ) es una herramienta muy potente para analizar las propiedades elásticas y plásticas de los materiales (Radmacher et al., 1995).

El material utilizado en esta tesis es biológico. En este tipo de interacción el comportamiento de la curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$ , mientras se indenta la muestra a nivel local, depende en gran parte de la dureza de los materiales que la componen. En el régimen de contacto entre la punta y la muestra, inicialmente la punta se deflexiona

---

<sup>1</sup>Comúnmente se denomina así a un experimento de AFS o de fuerza en el que se realiza una compresión de la muestra con la punta.



**Figura 6.4: Diferencia entre las curvas de fuerza sobre materiales rígidos y blandos.** La deflexión del *cantilever* en este caso se ha representado en función de la altura base de la muestra. En la muestra rígida (curva azul) se observarán dos regímenes lineales: (i) La punta aún no toca la muestra, por lo tanto la deflexión es constante (entre las posiciones 1 y 2), (ii) La punta está en contacto con la muestra y la deflexión es linealmente proporcional a la distancia punta-muestra (entre los puntos 2 y 3a). En la muestra blanda (curva roja) debido a la deformación de la estructura, la deflexión incrementa más lentamente que el acercamiento de la punta hacia la muestra (entre los puntos 2 y 3b). Esto es debido a que hay una respuesta elástica de la muestra lo que se traduce en un comportamiento no lineal entre la deflexión y el acercamiento de la punta. La diferencia entre la curva azul y la roja es la indentación de la muestra blanda. Imagen adaptada de la página web: <http://www.freesbi.ch>.

provocando un  $\Delta d_v$  del fotodetector. El material biológico tiene una resistencia mecánica baja y por lo tanto se indenta. Para poder determinar la fuerza y el grado de indentación de la muestra hay varios parámetros que se han de considerar al analizar y tratar las curvas  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$ , que se han esquematizado en la Figura 6.5.

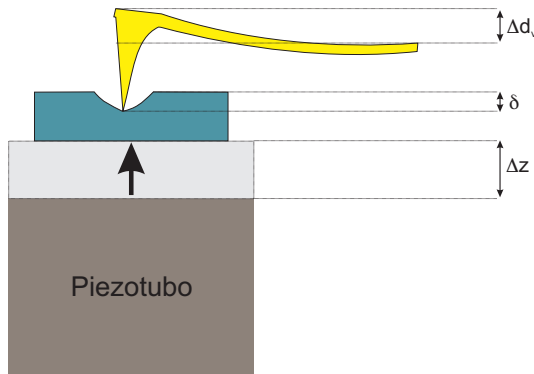
La AFS es una técnica que nos aporta información cuantitativa. Para poder transformar los datos de una curva de fuerza directamente obtenida del microscopio se necesita un elemento de referencia a partir del cual sea posible, de forma fácil, obtener el valor de la fuerza que ejercemos sobre la estructura biológica. Este elemento es el propio *cantilever* sobre el cual está montada nuestra punta (ver sección 11.2.2). Teniendo en cuenta que el *cantilever* tiene un comportamiento elástico (ver Figura 6.5), podemos considerar que se comporta como un muelle al cual podemos aplicar la ley de Hooke:

$$F_v = dk_v \quad (6.1)$$



Donde  $k_v$  es la constante de fuerza vertical y  $d$  es la deflexión real de la punta (expresada en nm).

Por lo tanto, si se obtiene el valor de  $k_v$  (ver sección 12.1.1) y se tratan adecuadamente los datos obtenidos a partir de la curva de fuerza (ver sección 14.3), es posible cuantificar el comportamiento mecánico de la estructura analizada.



**Figura 6.5: Esquema del proceso de deflexión del cantilever en un experimento de  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  sobre una muestra blanda.** Cuando la punta y la muestra están en contacto la extensión del piezoelectrico provoca la deflexión de la punta, que queda registrado por el fotodetector como un incremento del voltaje ( $\Delta d_v$ ). Cuando la muestra es blanda esta se indenta ( $\Delta \delta$ ), este hecho provoca que no se deflexione tanto la punta como se observaría con un material duro (ver curva azul en la Figura 6.4), y en consecuencia no se observe un incremento en  $\Delta d_v$ .

### 6.3.2. El modelo de Hertz

Para realizar un análisis de las propiedades elásticas de nuestra muestra hemos de utilizar los datos de las curvas de fuerza en la región en la que se comporta elásticamente y utilizar un modelo apropiado que se ajuste a nuestras necesidades. En el mundo macroscópico existen varios modelos que permiten estudiar el comportamiento elástico de los materiales. En el nanomundo se han podido aplicar estos modelos con bastante éxito (Shull y Chen, 2000). En esta tesis se ha aplicado el modelo más clásico utilizado en el estudio de la elasticidad: El modelo de Hertz.

Este modelo fue desarrollado por el físico alemán Heinrich Hertz en 1881. El modelo Hertziano describe la indentación elástica entre dos esferas de radio  $R$ . El vértice de la punta puede ser fácilmente aproximado a una esfera, pero la muestra es una superficie plana; esto no es un problema, ya que el modelo funciona si consideramos que la superficie a indentar es una esfera cuyo radio  $R$  tiende a  $\infty$ . Si consideramos que el vértice de la punta es un paraboloides, entonces la ecuación de Hertz se puede expresar como (Radmacher, 2002):

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^{3/2} \sqrt{R} \quad (6.2)$$

Donde  $E$  es el modulo de Young,  $\nu$  es el coeficiente de Poisson y  $R$  el radio de la esfera que forma el vértice de la punta.

## 6.4. Microscopía de Fuerza Lateral (LFM)

Desde la aparición del AFM se han desarrollado multitud de metodologías que permiten estudiar diferentes propiedades de las superficies. La microscopía LFM deriva directamente del *contact mode*. En este caso, se hace uso de la deflexión lateral de la punta producida al realizar una imagen de contacto para evaluar las propiedades de fricción. Quizás, la LFM o FFM (Microscopía de Fuerza de Fricción) pueda ser considerada como una de las más importantes extensiones que se han realizado a un equipo de AFM desde su invención. Esta extensión, junto con otras técnicas, han establecido la AFM como una herramienta indispensable en el campo de la Nanotribología. Esta técnica permite el estudio a escala atómica de las interacciones entre dos superficies (fricción), del desgaste, de la lubricación y de la adhesión (Carpick y Salmeron, 1997). En este caso no se trata de estudiar el comportamiento debido a la compresión por parte de la punta (como es el caso de la AFS), si no de estudiar el comportamiento de la fricción entre la punta y la superficie, lo cual nos aporta una valiosa información en un rango de fuerzas que cubre desde la zona micrométrica a la nanométrica (Carpick, 2006; Park et al., 2006; Socoliuc et al., 2006).

### 6.4.1. Historia y conceptos básicos de Tribología

El estudio de la fricción, no es un campo de estudio nuevo. El desarrollo industrial conlleva la necesidad de mejorar el rendimiento de las máquinas. Para evitar el desgaste de los componentes mecánicos se necesita una mayor comprensión de estos procesos. El concepto de Tribología es más reciente, y se estableció en los 60s. A continuación se resume el desarrollo de este tema (Dowson, 1979; Krim, 2002; Oncins, 2007; Mo et al., 2009).

Leonardo da Vinci (1452–1515) fue el primero en estudiar los procesos de fricción de una forma cuantitativa. Haciendo uso de cilindros de madera y planos inclinados, observó que:

- La fuerza de fricción ( $F_f$ ) no depende del área de contacto ( $A$ ).
- La  $F_f$  es proporcional a la masa del objeto deslizado ( $M_s$ ).

Aunque disponía de unos medios poco sofisticados, fue capaz de establecer por primera vez el concepto de coeficiente de fricción ( $\mu$ ):

$$\mu = \frac{F_f}{M_s} \quad (6.3)$$

Pero fue Guillaume Amontons (1663–1705) quien redefinió el trabajo de da Vinci sobre la fricción llegando a las siguientes conclusiones:

- La  $F_f$  es opuesta al movimiento del objeto que se desliza.

- La  $F_f$  es proporcional a la fuerza vertical ( $F_v$ ) aplicada por la superficie del objeto deslizando.
- La  $F_f$  es independiente de la  $A$  aparente de las superficies que están deslizando.

Con estas premisas el Francés Charles Auguste Coloumb (1736–1806) asentó las bases de lo que hoy en día sabemos sobre la teoría de la fricción a nivel macroscópico redefiniendo el concepto de  $\mu$ :

$$F_f = \mu F_v \quad (6.4)$$

También estableció que la  $F_f$  es independiente de la velocidad una vez ha empezado el desplazamiento. Esta idea fue ampliada por Leonhard Euler (1707-1783), que introdujo el concepto de fricción estática y dinámica, además de ser el introductor del símbolo  $\mu$  para definir el concepto de fricción. Cuando dos superficies están en movimiento relativo, entonces  $\mu$  se llama el coeficiente de fricción dinámica y la  $F_f$  es la fuerza en sentido contrario al de la fuerza que provoca el movimiento. En el caso de dos superficies que no están en movimiento entonces  $\mu$  se considera como el coeficiente de fricción estática que tiene un valor mayor que  $\mu$  dinámica para una misma  $F_v$ .

Tal como se puede observar, según estos estudios,  $F_f$  es independiente de  $A$ . Pero los estudios de adhesión de J. T. Desaguliers (1683–1744) indicaron que la fuerza para desenganchar dos cuerpos ( $F_A$ ) era un punto clave en la fricción, y que ésta dependía del área, lo cual produjo una crisis conceptual en el campo. Bowden y Tabor (1954) dieron un nuevo impulso al campo y aportaron los primeros pasos de la nueva era de la Tribología. Según estos autores, el contacto entre dos superficies se establece a través de un número finito de asperezas (*asperities*), cuya área ( $\sum A_{asp}$ ) es muy pequeña en comparación con  $A$  (Mo et al., 2009), de tal manera que se cumple que:

$$F_f \propto F_v^{\frac{2}{3}} \quad (6.5)$$

Finalmente, F. Archard encontró la manera de unificar estos datos. En el modelo de Bowden y Tabor se afirmaba que  $\sum A_{asp}$  es proporcional a  $A$  real e independiente del valor de  $F_v$ . Archard concluyó que esto no es cierto y que el número de las asperezas incrementa con la  $F_v$  (es decir,  $F_v \propto F_f$ ), como Amontons predijo 200 años antes. La idea de Tabor y Bowden sobre contactos microscópicos se arraigó durante mucho tiempo, y se consideró que el desgaste de los materiales era una clara consecuencia de la fricción. La última aportación en este sentido la desarrolló un discípulo suyo, Jacob N. Israelachvili, quien junto a Tabor desarrolló el SFA (*Surface Force Apparatus*; Israelachvili et al., 1990; Bhushan et al., 1995) en los años 70. Este aparato les permitió estudiar los procesos de fricción en ausencia de desgaste; permitía medir la fricción entre dos superficies de mica recién exfoliada. La

mica es un aluminosilicato laminar cuyas láminas están constituidas por una capa monoatómica, en consecuencia la  $A$  de fricción que se pueda establecer entre las dos superficies es igual al  $A_{real}$ . La conclusión de Israelachvili era que hay una relación real entre  $F_f$  y  $F_A$ , pero no fue capaz de resolver el problema a nivel atómico.

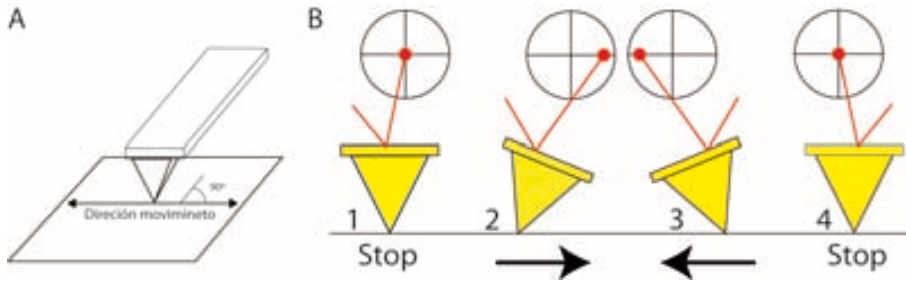
### El paso a la escala atómica: Nanotribología

El paso decisivo para la solución del problema fue el modelo teórico desarrollado por McClelland que explicaba perfectamente el proceso de fricción en ausencia de desgaste (Mate et al., 1987). Según este modelo, cuando dos superficies se deslizan, los átomos en contacto vibran debido a la energía disipada en el proceso. Este tipo de vibraciones llamadas fonones (Popov, 2001) viajan a lo largo de la estructura atómica de la superficie como una onda mecánica y actúan como un “obstáculo” físico, o como un sistema de captación de la energía que se puede disipar durante el deslizamiento (Cannara et al., 2007). Por lo tanto la  $F_f$ , sin desgaste, es la fuerza necesaria para superar la onda fonónica, que se disipa como energía térmica. De este comportamiento se obtiene una conclusión muy importante, y es que la  $F_f$  entre dos materiales depende de la resonancia fonónica entre ellos, de manera que, una reducción de ésta podría disminuir la fricción entre dos materiales iguales (Cannara et al., 2007), y en el mejor de los casos conseguir que  $F_f \rightarrow 0$ . Fue precisamente el desarrollo del AFM (Binnig et al., 1986), lo que permitió realizar un estudio detallado de los procesos de fricción a escala atómica (Carpick y Salmeron, 1997; Carpick, 2006). Estudios recientes, en los que se ha modelizado la interacción de dos superficies, indican que en la nanoescala existe una dependencia entre  $F_f$  y  $A_{real}$  debido a que  $A$  del elemento que se desliza por la superficie es tan pequeña que prácticamente iguala a  $A_{real}$ . Lo cual permite concluir que para un contacto no adhesivo  $F_f \propto F_v$  de forma lineal (Mo et al., 2009). De hecho, los contactos a nivel atómico, actualmente, son un motivo de activo debate en un intento de profundizar en las leyes que rigen los contactos a nanoescala.

#### 6.4.2. LFM: Una herramienta para la Nanotribología

Tal como se ha comentado, el LFM ha sido un gran avance para los estudios tribológicos a escala atómica. A continuación se describen cuales son las bases del funcionamiento de este equipo que permiten obtener valores cuantitativos de la fricción de unos pocos átomos en contacto (Torrent-Burgués et al., 20XX; Oncins, 2007). Inicialmente este equipo solo permitía el estudio comparativo relativo de la fricción entre materiales depositados sobre una misma superficie (van der Vegte y Hadziioannou, 1997), pero actualmente podemos obtener datos cuantitativos a partir de este tipo de análisis (Carpick y Salmeron, 1997). Esta técnica es muy nueva y aunque el modo de fricción deriva del *contact mode*, actualmente se necesita implementar un equipo básico de AFM para poder realizar este análisis (ver sección 12.2.2). Para

obtener la  $F_f$  de una cierta área de nuestra muestra, la punta ha de escanear la muestra en una dirección perpendicular a la longitud larga del *cantilever*, de esta manera la fricción provocará que el *cantilever* se doble lateralmente a medida que la fricción aumente (ver Figura 6.6). Esta deflexión lateral, que es proporcional a  $F_f$ , es detectada por el fotodetector <sup>2</sup>. Para poder obtener un valor de  $F_f$  se ha de



**Figura 6.6: Modo operativo del LFM.** **A** La punta escanea la muestra en la dirección perpendicular al eje largo del *cantilever*. **(B)** Ciclo completo del valor de fricciones de una misma línea (*loop* de fricción): 1. El *cantilever* está dispuesto sobre la superficie; 2. La punta se desplaza sobre la superficie de izquierda  $\rightarrow$  derecha, creando una torsión del *cantilever* que es detectada por el fotodetector; 3. La punta retorna al punto de inicio desplazándose de derecha  $\rightarrow$  izquierda provocando que el punto del láser se refleje en el cuadrante opuesto; 4. Final del *loop*, volvemos a estar en la situación 1. Figura adaptada de Torrent-Burgués et al. (20XX)

realizar un *loop* de fricciones, es decir, escanear una línea de izquierda  $\rightarrow$  derecha y de derecha  $\rightarrow$  izquierda (ver Figura 6.7). El total de energía de fricción durante el proceso de escaneado del *loop* es proporcional al área de este. La  $F_f$  media en una línea de escaneado concreta es:

$$F_f = \frac{|F_f(\text{izquierda} \rightarrow \text{derecha}) - F_f(\text{derecha} \rightarrow \text{izquierda})|}{2} \quad (6.6)$$

Pero para obtener valores cuantitativos de  $F_f$ , es necesario realizar curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$ . Este tipo de experimento consiste en incrementar gradualmente la  $F_v$  aplicada sobre la muestra a medida que se va obteniendo el valor de  $F_f$  (Foster et al., 2006; Oncins et al., 2005). Teniendo en cuenta la ecuación básica de la fricción (ecuación 6.6):

$$F_f = \mu F_v$$

<sup>2</sup>En este caso se requiere un fotodetector de cuatro cuadrantes. En la determinación de la  $F_v$  la diferencia entre la zona de arriba y abajo de los cuadrantes se utiliza para monitorizar la deflexión vertical ( $\Delta d_v$ ) del *cantilever* (ver Figura 6.2, pág. 51); en el caso de la deflexión lateral se utilizan los cuadrantes izquierdo y derecho para monitorizar la deflexión lateral del *cantilever* ( $\Delta d_l$ ) expresada en V.

Los valores de  $\mu$  pueden obtenerse a partir de las curvas  $F_f$  y  $F_v$ . Pero para obtener valores cuantitativos es necesario calibrar la punta. Para la cuantificación de la  $F_v$  es necesario saber los valores de  $K_v$  y de  $S_v$  (sección 12.1.1). Para obtener valores cuantitativos de  $F_f$  es necesario calibrar lateralmente la punta para establecer la relación entre  $\Delta d_l$  y  $F_f$  (ver sección 12.2.1).



**Figura 6.7: Loop de fricción.** Esquema de un *loop* de fricción en el que se representa  $\Delta d_l$  vs. eje  $y$ . El área contenida en el *loop* es proporcional a la energía disipada durante el proceso de fricción. La  $F_f$  en un punto concreto equivale a la mitad de la anchura del loop de fricciones, como se expresa en la ecuación 6.6.

# Capítulo 7

## Objetivos

Durante las últimas tres décadas los modelos de cromosoma metafásico han tenido como elemento fundamental la fibra de cromatina de 30–40 nm, a partir de la cual se han propuesto diversas estructuras de orden superior en un intento de explicar el empaquetamiento de las cromátides metafásicas (ver introducción, sección 5.4). La mayoría de trabajos realizados hasta el momento se basan en estudios microscópicos de muestras preparadas en presencia de una concentración salina muy baja. Los modelos derivados de este tipo de estudio no permiten explicar la concentración local de DNA que contiene el cromosoma metafásico (Daban, 2000). En nuestro laboratorio se han estudiado los cromosomas condensados en presencia de iones divalentes en concentraciones similares a las encontradas en el interior del cromosoma metafásico (Strick et al., 2001). Fruto de esta investigación, realizada mediante microscopía electrónica, se describieron por primera vez las placas de cromatina como unidad estructural básica del cromosoma metafásico compacto (Caravaca, 2004).

La función básica del cromosoma metafásico es la de compactar adecuadamente la cromatina para asegurar la transferencia de una copia exacta del genoma a cada una de las células hijas durante la mitosis. Los cromosomas en el huso mitótico durante el proceso de segregación están sometidos a fuertes tensiones mecánicas ( $\sim 1$ nN, Nicklas, 1983). Estas tensiones tienen valores semejantes a la fuerza que se requiere para romper una molécula de DNA (Bustamante et al., 2000). Por lo tanto, los cromosomas han de tener unas propiedades mecánicas y elásticas que permitan preservar la integridad del material genético durante la mitosis.

Como **objetivos generales** el trabajo experimental realizado en esta tesis pretende estudiar las condiciones de existencia de placas de cromatina en medio acuoso, utilizando siempre concentraciones iónicas próximas a las metafásicas. Por otra parte, se pretende aportar información que corrobore que las placas están compuestas por los elementos básicos de la cromatina (DNA e histonas). Finalmente se pretende investigar muy detalladamente las propiedades de las placas y la contribución de cada uno de sus componentes en la estabilidad estructural y mecánica del cromosoma

metafásico.

El trabajo experimental presentado en esta tesis se ha centrado en los siguientes **objetivos metodológicos** concretos:

1. Corroborar la existencia de las placas y demostrar que no son debidas a un artefacto preparativo. Para ello se realizará un amplio estudio mediante TEM en el que se estudiarán placas preparadas mediante diferentes métodos y se realizarán muy diversos lavados y controles. También en este sentido, se pondrán a punto métodos para la visualización de placas de cromosomas metafásicos mediante AFM en medio acuoso, para poder demostrar la existencia de las placas en condiciones fisiológicas.
2. Realizar un estudio de Espectroscopia de Fuerza Atómica (AFS) para analizar el comportamiento mecánico de las placas en condiciones fisiológicas, y para determinar el módulo de Young de estas estructuras en las mismas condiciones.
3. Estudiar detalladamente la distribución de alturas de las placas de cromatina. Para ello se analizará las placas sombreadas unidireccionalmente mediante TEM. Adicionalmente se pretende realizar un estudio de la altura de las placas en medio acuoso mediante AFM y complementariamente mediante AFS.
4. Aportar datos directos para demostrar que las placas contienen los componentes básicos de la cromatina (DNA e histonas). Para ello se pretende realizar una monitorización en tiempo real mediante AFM del efecto sobre la estructura de las placas de diferentes agentes desnaturalizantes típicamente utilizados en el campo de la cromatina (NaCl en elevadas concentraciones y EDTA). También se pretende estudiar el efecto de la digestión con nucleasas y proteasas.
5. Evaluar cuantitativamente el papel que tienen los diferentes componentes de la cromatina en el mantenimiento de las propiedades mecánicas de las placas y por extensión del cromosoma metafásico. Para ello se pretende poner a punto una técnica utilizada en ciencia de materiales, la microscopía de fuerza de fricción o de fuerza lateral. Con esta técnica, que anteriormente sólo había sido utilizada en Biología Molecular para estudiar membranas biológicas (Oncins et al., 2005), se pretende investigar el comportamiento de fricción de las placas de los cromosomas metafásicos en condiciones nativas, en presencia de agentes desnaturalizantes (NaCl y EDTA) y después de realizar digestiones con nucleasas y proteasas.
6. Como objetivo final, se pretende integrar todos los resultados obtenidos con las diferentes aproximaciones metodológicas utilizadas en esta tesis para tratar de modelar el cromosoma metafásico nativo en condiciones fisiológicas.



Parte II

# MATERIALES Y MÉTODOS



# Capítulo 8

## Cultivos celulares

*Al trabajar con cultivos celulares es muy importante tomar el máximo de precauciones posible para evitar contaminaciones del medio de cultivo, y al mismo tiempo proteger a la persona de posibles agentes patógenos. Para ello, todas las etapas de manipulación de los cultivos se realizaron en campanas de seguridad biológica<sup>1</sup> y todo el material utilizado fue previamente autoclavado. Las células que utilizamos en nuestro caso fueron HeLa (adenocarcinoma de cérvix humano) que contienen el Papiloma virus (HPV-18), debido a esta razón se debía trabajar en un nivel de bioseguridad 2.*

### 8.1. Establecimiento de un cultivo celular

Para establecer un cultivo de células HeLa se partió de material criogenizado en N<sub>2</sub> líquido (−196 °C). Las células se conservan en viales que contienen 10<sup>6</sup> células suspendidas en medio crioprotector [suero fetal bovino (FBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %]. El vial se descongelaba durante 1 min en un baño a 37 °C. Posteriormente el contenido se resuspendía en un tubo de 15 ml que contenía 10 ml de medio de cultivo [Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) pH 7.3, con Glutamax-1, glucosa 4500 mg/ml y FBS 10 % (Gibco)] que había sido previamente atemperado a 37 °C para evitar un cambio brusco de temperatura. El tubo se enfriaba previamente en hielo, ya que el DMSO (Gibco) es citotóxico por encima de 4 °C y de esta manera se trataba de minimizar su efecto. La resuspensión en medio de cultivo nos permitía eliminar el DMSO de las células por ósmosis. Una vez resuspendido, se centrifugaba en la centrifuga Megafuge 2.R (Haraeus) con el rotor 8160 a 300g y 4 °C durante 10 min, una vez centrifugado se descartaba el sobrenadante, que contenía DMSO, con una pipeta Pasteur. El sedimento resultante se resuspendía en 15 ml de DMEM y después se transfería a un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson), dejándolo

---

<sup>1</sup>Este tipo de campana de flujo protege tanto a la muestra como a la persona que manipula el cultivo debido a su diseño. En este trabajo se ha utilizado la campana Bio-II-A (Telstar).

deslizar cuidadosamente por la pared. Una vez hecho esto se observaba el estado de las células en el microscopio óptico Eclipse TS100 (Nikon) con contraste de fases a 40 aumentos. Cuando las células estaban en buen estado eran redondas y refringentes. Finalmente las células se dejaban en un incubador de CO<sub>2</sub> con camisa de agua (Forma Scientific) a 37 °C, 90 % de humedad y 10 % de CO<sub>2</sub> y se iba controlando que el medio de cultivo no se agotara.

## 8.2. Mantenimiento de un cultivo celular

Se ha de mantener un control continuo del cultivo celular para garantizar la supervivencia celular y un crecimiento exponencial. Para ello, cada 24–48 h se hacía un control visual de manera que, si el cultivo pasaba de un color rosa fucsia a amarillo esto indicaba que el medio estaba agotado y se realizaba un cambio de medio. El medio se retiraba con una pipeta Pasteur sin tocar la capa de células. A continuación, mediante una pipeta conectada a un aspirador *pipetboy plus* (Cultek) se introducía medio fresco dejándolo deslizar por la parte donde no había el film de células. El volumen de medio introducido dependía del tipo de frasco utilizado. Éste oscilaba entre 15 ml para frascos de 75 cm<sup>2</sup> y 45 ml para frascos de 225 cm<sup>2</sup> (Cultek). Por otro lado, también se comprobaba el estado de confluencia del cultivo mediante la observación en el microscopio óptico. Cuando las células estaban alrededor del 80–90 % de confluencia se realizaba una tripsinización. Mediante este proceso las células adheridas, de morfología estrellada, se podían desprender del frasco y volver a sembrarlas a una concentración inferior. Esto nos permitía continuar el proceso de crecimiento en nuevos frascos e incrementar el número total de células o simplemente mantener un cultivo activo para realizar un experimento en el momento deseado.

Para tripsinizar el cultivo, se extraía el medio con una pipeta Pasteur. Después se realizaba un lavado con tampón fosfato Dulbecco's (DPBS, Gibco), sin magnesio, calcio ni bicarbonato sódico, con un volumen diferente en función del frasco utilizado (como referencia, para un frasco de 75 cm<sup>2</sup> se utilizaban 5 ml de DPBS). El DPBS nos permite eliminar proteínas y restos de medio que puedan interferir en la actividad de la tripsina. Inmediatamente se procedía a añadir un volumen de tripsina (solución con tripsina porcina 5 g/l y EDTA 2 g/l, Gibco; la cual se diluía 10 veces en DPBS) que oscilaba entre 1.5–3 ml en función del frasco utilizado. Posteriormente el frasco se introducía durante aproximadamente 1 min en el incubador y luego se golpeaba lateralmente para desprender las células de la superficie. Para comprobar si las células se habían desprendido se observaban en el microscopio óptico. Las células desprendidas flotan y tienen morfología esférica, mientras que las células que permanecen adheridas tienen una morfología aplanada y estrellada. Rápidamente se añadía 5 ml de medio de cultivo para inactivar tripsina<sup>2</sup>. Se recuperaba todo el

---

<sup>2</sup>La inactivación es debida al alto contenido de proteínas que hay en el medio de cultivo, de esta forma hay una disminución de la actividad efectiva de la tripsina sobre las uniones célula-frasco.

medio y se pasaba a un tubo cónico. El tubo se centrifugaba en la centrífuga eppendorf Centrifuge 5702 (eppendorf) a 300g y a temperatura ambiente (RT) durante 5 min. Se eliminaba el sobrenadante, que contenía la tripsina, y se resuspendía el sedimento en el volumen de medio deseado en función de la dilución que se iba a realizar. Se añadía una parte del resuspendido en el frasco de cultivo al que previamente se le había añadido medio de cultivo fresco; el volumen variaba en función del frasco como se indicó antes. Finalmente se dejaban en el incubador. Generalmente se necesitaba una gran cantidad de células metafásicas, por ello el resuspendido se repartía en 2–4 frascos de 225 cm<sup>2</sup>. En estudios iniciales se utilizaron 4 frascos 300 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson) con los que se obtuvo menor rendimiento en la obtención de células (sección 9.2).

### 8.3. Cultivo celular en presencia de colcemid®

El cultivo celular se paraba en metafase con el objetivo de poder obtener cromosomas metafásicos, para ello se hacían crecer las células en presencia de colcemid® (Gibco), que es una droga que se une a la tubulina, impidiendo la interacción con ella misma y evitando así el proceso de polimerización de los microtúbulos. Este hecho inhibe la dinámica de recambio de los microtúbulos impidiendo el proceso de polimerización global y, por lo tanto, evita la aparición del huso mitótico (Snyder y McIntosh, 1975; Alberts et al., 2008).

El cultivo se iniciaba una semana antes de la realización del experimento. Se partía de un vial congelado o de otro cultivo de células HeLa ya existente (sección 8.2), el cual se sembraba directamente en un frasco grande. Cuando las células llegaban a un 80–90 % de confluencia se tripsinizaban y se repartían por igual en 2–4 frascos dependiendo del experimento a realizar. A continuación debíamos esperar a que el cultivo llegara a un 80–90 % de confluencia. Durante este tiempo (2 ó 3 días), era de vital importancia controlar que las células no agotaran el medio de cultivo. Aproximadamente 30 h antes de añadir el colcemid®, los frascos se tripsinizaban nuevamente realizando una dilución 1/2–1/3 dependiendo de la confluencia<sup>3</sup>. Cuando se llegaba a un 80–90 % confluencia se añadía colcemid® (concentración final de 0.1 µg/ml) para que las células se fuesen parando en metafase. Antes de añadir el colcemid® se hacía un control visual y se observaba el número de células en división en ese momento (células redondas, refringentes y en suspensión, que están unidas por un pedúnculo a la superficie del frasco), que era de un 30 % aproximadamente. Las células se dejaban crecer 12 h en presencia de colcemid®. Este procedimiento está basado en el trabajo de Adolph (1980).

Al día siguiente se observaba el estado de las células en el microscopio óptico, el cual solía ser de un 80 % de células en suspensión. Finalmente se procedía a la

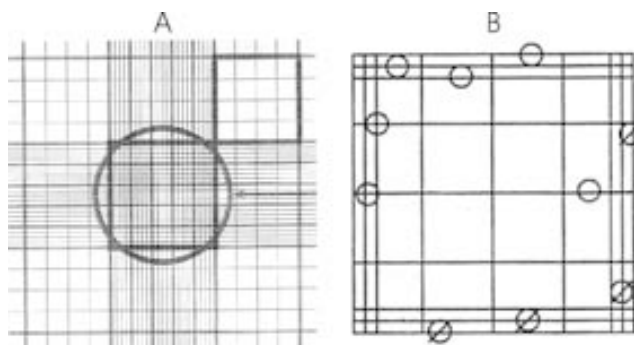
---

<sup>3</sup>Este proceso estimula el crecimiento celular incrementando el número de células en división y por lo tanto el número de células en metafase al añadir colcemid®.

obtención de las células y al recuento de las mismas.

## 8.4. Recuento de células

Después de recoger las células paradas en metafase (sección 9.2) se procedía a realizar un recuento. Se extraía una alícuota de las células resuspendidas en medio de cultivo y se diluía 1:2 en colorante Trypan blue (Sigma) al 0.4% (p/v). Este colorante penetra dentro de las células muertas, de tal manera que las células vivas tienen refringencia. Una vez preparada la dilución se podía realizar el recuento. Inicialmente se utilizó una cámara de Neubauer pero la mayor parte de los recuentos realizados en esta tesis se realizaron en el Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, ver Figura 8.2). En el caso de la cámara de Neubauer se introducía una gota de las células diluidas en Trypan blue y se realizaba el recuento de los cuatro campos, como se observa en la Figura 8.1. Para determinar el número de células se realizaba la media de los cuatro campos y se aplicaba la ecuación 8.1.

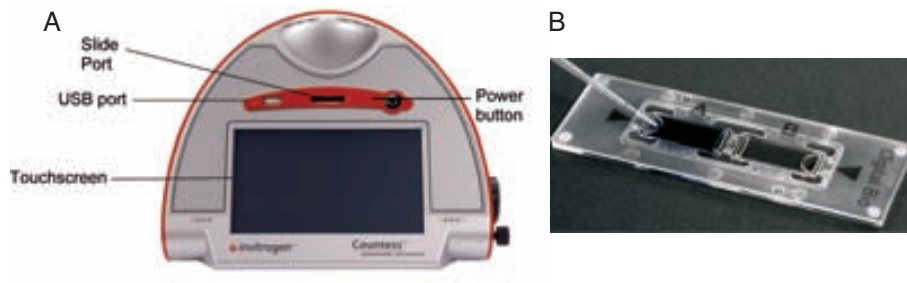


**Figura 8.1: Esquema de la cámara de Neubauer utilizada en el recuento de células.** (A) El círculo indica el campo cubierto por una magnificación 100x en el microscopio óptico. (B) Ampliación de uno de los campos de recuento de células. En el recuento se incluían todas las células que estaban dentro del cuadrante (○), excepto las que tocaban el borde izquierdo e inferior (∅).

$$\text{Células}/\mu\text{l} = \mathbf{X} \cdot 10 \cdot \text{Factor dilución.}$$

$$\mathbf{X} = \text{Media de los cuatro campos} \quad (8.1)$$

Para el recuento de células con el Countess™ (ver Figura 8.2A) se introducían 10  $\mu$ l de las células diluidas en Trypan blue (a la misma concentración que la usada en la cámara de Neubauer) en unas celdas proporcionadas por el mismo fabricante (ver Figura 8.2B). Para que el recuento fuese adecuado se debía calibrar el Trypan blue, para ello se realizaba un blanco con el propio equipo en las mismas condiciones que se empleaba en el recuento celular. El sistema además podía proporcionar información cuantitativa de la viabilidad celular.



**Figura 8.2:** Esquema del equipo Countess™. En **A** se observa el equipo utilizado para realizar el recuento de células. (**B**) Celda en la que se introducen 10  $\mu$ l de la solución que contienen las células. Una vez colocado el volumen la celda se introduce en el Countess™ para realizar el recuento de células.





## Capítulo 9

# Preparación de cromosomas metafásicos para estudios ultraestructurales

*Esta parte de la preparación es muy importante, ya que de ella depende la obtención del material que se utilizará en los tratamientos sucesivos, así como la obtención de material suficiente para poder analizar diversas condiciones. Es importante que los cromosomas mantengan al máximo su integridad estructural para poder estudiar adecuadamente su ultraestructura en función de las condiciones. También trata de obtener preparaciones de cromosomas de una pureza adecuada para nuestros estudios.*

### 9.1. Tampones utilizados

En la realización de los experimentos se utilizaron básicamente cuatro tampones diferentes. Los tampones utilizados fueron PM, PME, PMC y PA (ver composición en la Tabla 9.1). Normalmente se preparaba una solución madre de PM (10×) que se mantenía a 4 °C durante máximo dos semanas; en el caso del tampón PA [poliaminas: espermina (Sigma) y espermidina (Sigma)] se preparaba (1×) el día anterior a ser utilizado. Los tampones PME y PMC se preparaban a partir de la solución madre de PM. Adicionalmente, también se preparaba el tampón PAD; este tampón estaba formado por el tampón PA en el cual se disolvía la digitonina (Sigma) para tener una concentración final de 1 mg/ml. El tampón PAD debía estar fresco, por esta razón se preparaba en el momento de realizar el fraccionamiento celular. Se incubaba a 37 °C durante 20 min y se homogeneizaba con un pulso de vortex cada 5 min para resuspender el sedimento de digitonina<sup>1</sup>. Finalmente la solución se filtraba con un

---

<sup>1</sup>La digitonina es una molécula muy hidrofóbica por lo que es muy difícil de disolver en el tampón PA.

sistema de filtrado Steriflip™ (ver sección 10.1) para eliminar el exceso de digitonina (Craig, 1999).

Tabla 9.1: Tampones utilizados

<b>Tampón PM</b>	<b>Tampón PME</b>	<b>Tampón PMC</b>
Pipes 5 mM pH 7.2	Pipes 5 mM pH 7.2	Pipes 5 mM pH 7.2
NaCl 5 mM	NaCl 5 mM	NaCl 5 mM
MgCl <sub>2</sub> 5 mM*	MgCl <sub>2</sub> 5 mM*	MgCl <sub>2</sub> 5 mM
	EGTA-NaOH 1 mM pH 7.4	CaCl <sub>2</sub> 1mM
<b>Tampón PA</b>		
Tea-HCl 15 mM pH 7.5		
KCl 80 mM		
NaCl 20 mM		
Espermina 0.2 mM		
Espermidina 0.5 mM		
EDTA-NaOH 2 mM pH 7.4		
EGTA-NaOH 0.5 mM pH 7.4		

\* La mayoría de experimentos se realizaron en presencia MgCl<sub>2</sub> 5 mM excepto cuando se indique (en estos casos la concentración variaba entre 5–30 mM).

## 9.2. Obtención de las células

Aproximadamente 12 h después de haber añadido el colcemid® (ver sección 8.3) se observaba el estado de las células con el microscopio óptico y se procedía a realizar la extracción de las células HeLa de los 2–4 frascos mediante la técnica de *shake-off* (Narayanswamy y Hamkalo, 1987; Caravaca, 2004), que consiste en golpear los frascos lateralmente, con la palma de la mano, para acabar de desprender las células en metafase. Para evitar la formación de espuma durante el proceso, previamente se eliminaba el medio de cultivo de los frascos y se transfería a tubos cónicos de 50 ml. Seguidamente, se introducían 10 ml de PBS en cada frasco y se procedía al proceso de *shake-off*. Una vez realizado este proceso se transfería el PBS de todos los frascos, que contenía las células en suspensión, a un tubo cónico de 50 ml con ayuda de una pipeta conectada a un *pipetboy*. Después de recoger el PBS se observaban los frascos en el microscopio óptico para tener una idea del rendimiento del proceso (normalmente permanecían unidos a la pared un 30–40 % de las células). A continuación se centrifugaban los tubos en la centrífuga eppendorf Centrifuge 5702 a 300g y a RT durante 10 min. Una vez centrifugado, se descartaba el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. El sedimento resultante de todos los tubos (2–5 dependiendo del tipo de frasco utilizado) se resuspendía cuidadosamente en 10 ml finales de PBS con ayuda de una pipeta conectada al *pipetboy*. Cuando teníamos el sedimento resuspendido se extraía una alícuota de 50  $\mu$ l y se realizaba una dilución

1:2 con el colorante Trypan blue al 0.4% (p/v) y se procedía al recuento de células (sección 8.4).

Una vez realizado el recuento celular se centrifugaba nuevamente el tubo con los 10 ml de células HeLa a 300g y a RT durante 10 min. Finalmente se descartaba el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el sedimento que contenía las células HeLa se guardaba para extraer los cromosomas metafásicos.

### 9.3. Extracción de cromosomas

A partir del sedimento de células, procedentes del cultivo celular parado en metafase (ver sección 9.2), se procedía a realizar el fraccionamiento celular para una posterior obtención de los cromosomas. El sedimento se resuspendía en medio hipotónico (KCl 75 mM) a una concentración  $2 \times 10^6$  células/ml. Seguidamente se incubaba en un baño a 37 °C durante 10 min. La función del medio hipotónico era la de inflar las células por ósmosis facilitando así la rotura posterior de la membrana celular. Mientras tanto, se preparaba el tampón PAD (ver sección 9.1). Después de la incubación con medio hipotónico se trasvasaba la solución de células HeLa a 2–4 tubos Corex<sup>®</sup> y se centrifugaba a 275g en la centrífuga Allegra<sup>™</sup> 6R (Beckman Coulter) durante 5 min a RT. Se eliminaba el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur, posteriormente se resuspendía el sedimento de los 4 tubos en tampón PAD (en un volumen suficiente para tener  $1 \times 10^7$  células/ml) y finalmente se guardaba en hielo.

Una vez teníamos las células en PAD, se procedía a la rotura de la membrana celular. El uso del tampón PA permitía que los cromosomas mantuviesen la integridad estructural durante el proceso de extracción. Esto es debido a que las poliaminas tienen cargas positivas que le confieren una gran capacidad estructurante. Para romper la membrana celular de las células HeLa, se homogeneizaba la suspensión de células pasándola 15 veces por el pistón de un dounce de 2 ó 5 ml (proceso realizado a en hielo). Al finalizar la homogeneización se centrifugaba a 200g en la centrífuga Allegra<sup>™</sup> 6R durante 10 min a 4 °C. En este paso se trataba de eliminar los restos celulares que permanecían sedimentados en el fondo del tubo. Una vez centrifugado se recogía el sobrenadante (que contenía los cromosomas en suspensión) y se guardaban a en hielo. Por otra parte, el sedimento se resuspendía en 1 ml de PAD y se volvía a realizar las 15 pasadas con el Dounce en hielo. El homogeneizado se volvía a centrifugar a 200g en las mismas condiciones que en la centrifugación anterior. El sobrenadante resultante se transfería junto con el volumen de cromosomas guardados en hielo para su posterior estudio. Este método de fraccionamiento se adaptó de Gasser y Laemmli (1987).

## 9.4. Purificación en gradiente escalonado

Después de realizar el fraccionamiento celular (sección 9.3) se debían separar los cromosomas metafásicos de los restos celulares. Para purificar los cromosomas se utilizaron gradientes escalonados preformados. Los gradientes se sometían a un campo centrífugo, que permitía separar los cromosomas de los restos celulares. El hecho de que fuesen escalonados de concentración creciente hacia el fondo (como muestra la Figura 9.1 ó 9.2), permitía que en cada punto hubiese una mayor resistencia al avance del material. De esta manera aunque se utilicen fases de diferentes densidades, el proceso de separación es por velocidades de sedimentación y no por equilibrio de densidades.

### 9.4.1. Gradiente de sacarosa

En el protocolo base de purificación de cromosomas se utilizaron gradientes de sacarosa (Merck) escalonados preformados. Los gradientes de sacarosa se preparaban en presencia del tampón PM, y en fases iniciales en presencia del tampón PME (ver Tabla 9.1; pág. 72).

Los gradientes de sacarosa se prepararon en tubos de 7 ml (Nalgene centrifuge, Sigma). Para evitar que las diferentes fases se mezclaran por difusión se manipulaban con mucho cuidado, y se formaban con el tubo en hielo en el momento de ser utilizados. Se depositaban secuencialmente las diferentes fases con ayuda de una micropipeta para fluidos viscosos (Gilson). El volumen de cada una de las fases era 1.3 ml para la de 60 % y 0.875 ml para cada una de las restantes concentraciones (ver Figura 9.1). Las diferentes fases se preparaban a partir de una solución concentrada al 75 % (p/v) de sacarosa, se filtraban con un sistema Millex® (Millipore®; ver Tabla 10.1, pág. 80) y posteriormente se guardaban a 4 °C hasta su uso. Se preparaban 2–4 gradientes en función de la cantidad de material preparado en los cultivos celulares<sup>2</sup> (ver sección 8.2). Seguidamente se repartía el volumen deseado de la muestra (generalmente 1–3 ml) en los gradientes y se centrifugaba a 4000*g* (referenciado al fondo del tubo del gradiente) en el rotor JS 13.1 a 4 °C durante 15 min, con el freno puesto al mínimo para evitar que se deshiciera el gradiente. En estas condiciones los cromosomas se depositaban en forma de flóculo blanco en las interfases 40–50 % y 50–60 % de sacarosa. El material se recogía de las interfases con ayuda de una pipeta Pasteur. Previamente se descartaba el contenido del gradiente hasta llegar a las interfases de interés. Finalmente los cromosomas se guardaban en hielo o a 4 °C hasta el momento de ser utilizados. Los cromosomas purificados nunca se guardaron más de 48 h a 4 °C antes de realizar un experimento concreto. El material obtenido en estas condiciones tiende a agregarse y a adherirse en las paredes del tubo con lo

---

<sup>2</sup>Generalmente se realizaba un gradiente por cada frasco de cultivo a una confluencia 80–90 %, pero esta relación estaba sujeta al rendimiento de células obtenidas en cada experimento.



**Figura 9.1: Esquema del gradiente de sacarosa.** En este esquema se muestra las diferentes fases del gradiente escalonado. Una vez centrifugada la muestra, los cromosomas quedaban concentrados en las interfases 40-50 % y 50-60 % (p/v).

que se iba perdiendo la muestra paulatinamente. El protocolo fue extraído de Craig (1999).

#### 9.4.2. Gradiente de glicerol

También se realizaron gradientes escalonados de glicerol (Invitrogen) en el proceso de purificación de los cromosomas. En este caso los gradientes se realizaron en tampón PME con una concentración creciente de glicerol (Figura 9.2). Del mismo modo que en los gradientes de sacarosa, para evitar que las diferentes fases se mezclaran por difusión, se manipulaban con mucho cuidado y se formaban con el tubo en hielo en el momento de ser utilizado. El volumen de cada una de las fases era de 1.3 ml para la de 70 % (v/v) y 0.875 ml para cada una de las restantes (ver Figura 9.2). En este caso se partía de una solución concentrada de glicerol al 99.9 % que es altamente viscosa. Se preparaban 4 gradientes en tubos de 7 ml. Seguidamente se repartía el volumen de muestra (generalmente 1–3 ml), procedente del proceso de fraccionamiento (sección 9.3), en los 4 gradientes y se centrifugaban las muestras a 4000g (referenciado al fondo del tubo del gradiente) en el rotor JS 13.1 a 4 °C durante 15 min, con el freno puesto al mínimo para evitar que se deshiciera el gradiente. En estas condiciones los cromosomas se depositaban en forma de flóculo blanco en



**Figura 9.2: Esquema del gradiente de glicerol.** En este esquema se muestra las diferentes fases del gradiente escalonado. Una vez centrifugada la muestra, los cromosomas quedaban concentrados en la interfase 60-70 % (v/v).

la interfase 60-70 % de glicerol. Se descartaba el contenido del gradiente hasta llegar

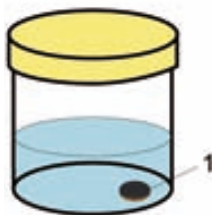
a la interfase de interés y el material se recogía con ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente los cromosomas se guardaban en hielo o a 4 °C (máximo 48 h) hasta la realización del experimento. El protocolo seguido es una adaptación del método descrito por Saitoh y Laemmli (1994).

## 9.5. Diálisis exhaustiva de la muestra

Para eliminar el exceso de sacarosa y glicerol de los gradientes escalonados (sección 9.4) se realizaba una diálisis exhaustiva de los cromosomas metafásicos. Este proceso era muy importante debido a que la elevada concentración de los gradientes podía interferir en el análisis posterior de los cromosomas.

### 9.5.1. Diálisis sobre rejilla

En este caso, la diálisis se realizó con los cromosomas previamente extendidos sobre la rejilla de microscopía electrónica (ver sección 10.5). Para realizar este tipo de diálisis abierta sin membrana, se utilizaron unas cámaras de polipropileno con tapa roscada (Plastiques Gosselin; Figura 9.3). Dentro de la cámara se introducían 4.5 ml de tampón PME y se enfriaba a 4 °C. En el momento de realizar la diálisis, después de depositar el material previamente purificado (sección 9.4.1 ó 9.4.2), se colocaba la rejilla (con el film de carbono hacia arriba) en el interior de la cámara con ayuda de unas pinzas de precisión #5 ó #7 (Sigma). Las rejillas se dejaban sumergidas durante 2 h a 4 °C. El lavado de los cromosomas se producía gracias a que la relación de volúmenes (volumen de material depositado respecto al volumen total de la cámara) era muy baja y, por lo tanto, la sacarosa o el glicerol se difundía. Finalmente se recogía la rejilla con ayuda de las pinzas para su posterior tratamiento.



**Figura 9.3: Cámara para la diálisis abierta en rejilla.** En esta figura se muestra la cámara utilizada para hacer la diálisis en rejilla y las incubaciones a 37 °C (sección 10.6.1). 1 rejilla de cobre para microscopía electrónica de 400 mesh (Sigma) con film de carbono (sección 10.3).

### 9.5.2. Diálisis en solución

También se realizaron diálisis exhaustivas en solución. Se utilizaban tubos de diálisis Medicell (Visking Size 2–18/32" ó 1–8/32"). Los tubos se preparaban previamente del siguiente modo: se cogían 3-4 m de tubos de diálisis y se sumergían

en 2 l de EDTA 1 mM pH 8.0 dentro de un matraz Erlenmeyer tapado con un vidrio de reloj. Se calentaba hasta la ebullición y se dejaba enfriar. A continuación se descartaba el líquido y se añadían 2 l más de EDTA 1 mM pH 8.0, repitiendo el proceso de ebullición-enfriamiento. Finalmente se vaciaba el matraz Erlenmeyer y se lavaban los tubos de diálisis 5 veces con agua destilada. Los tubos de diálisis se almacenaban a 4 °C en 1 l de agua destilada con unas 10-15 gotas de cloroformo para inhibir el crecimiento de microorganismos.

El material utilizado en la diálisis en solución provenía de los gradientes escalonados (secciones 9.4.1 y 9.4.2). Se cogía un trozo de tubo de unos 8 cm y se lavaba en agua destilada para eliminar el cloroformo que contenía la solución en la que se almacenaba. Posteriormente se sellaba con un clip por uno de los extremos. Después se introducía la suspensión de cromosomas purificados con ayuda de una micropipeta y se colocaba otro clip por el otro extremo quedando así herméticamente sellado. Este proceso se realizaba con guantes previamente lavados con agua destilada para evitar contaminar los tubos y por lo tanto el material cromosómico.

La diálisis se llevaba a cabo frente a 1 l de PM o PME en un vaso de precipitados de 1 l. Se realizaron 2 tipos diferentes de diálisis en solución: (i) Se realizaban a RT durante 4 h (se medía la temperatura con un termómetro, la cual fue de 20–24 °C). Se realizaba un cambio del volumen de equilibrado (1 l de PM/PME) cada 80 min, haciendo un total de tres cambios. (ii) El otro tipo de diálisis se realizó a 4 °C, durante 20 h. Se realizaron 2 cambios cada 3.5 h y la tercera fase de diálisis se prolongó hasta llegar a un total de 20 h. Finalmente el material dializado se extraía del tubo con ayuda de una micropipeta, se introducía en tubos de polipropileno y se guardaba en hielo hasta la realización del siguiente tratamiento.

## 9.6. Tratamiento mecánico de los cromosomas

Debido a la naturaleza compacta del cromosoma metafásico en condiciones fisiológicas resulta muy difícil el estudio de su estructura interna. Por ello, se realizaron tratamientos mecánicos para desestructurar el cromosoma metafásico y poder estudiar con mayor facilidad los elementos que lo componen. Se realizaron tres tipos de tratamiento mecánico diferentes: sonicado, homogeneizado con Polytron y tratamiento con jeringuilla. El material al que se realizaba los tratamientos mecánicos procedía siempre de una diálisis en solución (sección 9.5.2).

**Ultrasonificación:** Este proceso siempre se efectuaba en el aparato *Sonifier* 450 (Branson). Se realizaban 3 ciclos de 5 pulsos, entre ciclo y ciclo se esperaba 3 min con la muestra en hielo. El proceso se llevaba a cabo con un *output* de 2 unidades de intensidad (*duty cycle* del 50 %).

**Homogeneización:** Este tratamiento se realizaba con un Polytron (Kinetica AG) al que se le colocaba una varilla de 5.5 mm de diámetro (modelo PT-DA

120512EC). Se realizaban 4 homogeneizaciones de 30 s a la potencia 5. Después de cada fase de homogeneización se dejaban las muestras en hielo.

**Tratamiento con jeringuilla:** Este tratamiento mecánico se efectuó con jeringuillas de 1–5 ml en función del volumen de muestra y con una aguja *Precision-Glide*® 22G1 (Becton Dickinson). El material se aplicaba 10 veces a través de la jeringuilla realizando la máxima presión posible. Este método se estableció como el tratamiento mecánico estándar para la obtención de placas (ver los diferentes capítulos de la parte III).

Una vez finalizado el tratamiento mecánico se mantenía el material en hielo para realizar la siguiente etapa del proceso.



## Capítulo 10

# Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para el estudio del cromosoma metafásico

*La microscopía electrónica ha supuesto un gran avance para el estudio de la estructura de las biomoléculas en Biología Celular y Biología Molecular. Ha permitido conocer la forma, tamaño y parte de la función de la mayoría de orgánulos y estructuras supramoleculares que se conocen hasta el momento. Por esta razón, aún hoy en día la microscopía electrónica con sus múltiples variantes es una de las técnicas más utilizadas en el estudio de los complejos macromoleculares (Bozzola y Russell, 1992; Daban y Bermúdez, 1998; Wanner y Formanek, 2000; Robinson et al., 2006; Eltsov et al., 2008)*

### 10.1. Sistemas de filtrado y eliminación de contaminantes

La manipulación y preparación de las muestras en microscopía electrónica requiere unas condiciones de limpieza y esterilidad especiales para evitar posibles contaminaciones. Los tampones utilizados son un foco muy probable de posibles contaminaciones. Para prevenir esta posible vía de contaminación todo el material fungible utilizado en la preparación era estéril y los tampones se filtraban mediante sistemas de filtrado desechables. Los filtros empleados en este proceso tenían un diámetro de poro de  $0.22 \mu\text{m}$  para eliminar la presencia de microorganismos y partículas en suspensión. Según el volumen filtrado se utilizaron tres dispositivos diferentes (ver Tabla 10.1).

Durante la manipulación de las rejillas de microscopía electrónica es recomendable el uso de mascarilla quirúrgica y una zona de trabajo limpia. La manipulación de las rejillas de microscopía se realizaba con ayuda de unas pinzas de precisión #5 y #7 con recubrimiento de Teflón® (Sigma). En algunos casos, en los que se trabajó con muchas condiciones en el mismo experimento, se utilizaron pinzas desechables para microscopía electrónica (Ted Pella, Inc.).

Las pinzas de precisión debían estar limpias para evitar una posible contaminación con microorganismos/partículas durante la manipulación de las rejillas. Antes de cada experimento de microscopía se realizaba un lavado exhaustivo de las pinzas mediante sonicación durante 10 min. Se empleaba el aparato Bransonic™ 1510 (Branson), el cual estaba provisto de una cesta en la que se introducían las pinzas y se sumergían en una solución de SDS 2% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada. Una vez finalizado este proceso, se realizaban varios lavados en H<sub>2</sub>O destilada.

**Tabla 10.1: Sistemas de filtración utilizados**

Volumen filtrado	Sistema de filtración <sup>a</sup>
0–10 ml <sup>b</sup>	Millex®, con membrana ME-Millipore™
10–50 ml	Steriflip™, con membrana Millipore™ Express Plus
50–250 ml	Stericup con membrana Millipore™ GP Express

<sup>a</sup> Las membranas utilizadas en todos los dispositivos tenían un diámetro de poro de 0.22  $\mu$ m.

<sup>b</sup> En la filtración con la unidad Millex®, se aspiraba el medio con una jeringuilla del volumen requerido, se conectaba a el sistema de filtración, posteriormente se hacía pasar el volumen a través del filtro y finalmente se recogía en un tubo cónico estéril.

## 10.2. Evaporación de carbono y carbono-platino

El evaporador (Bal-Tec) es un sistema formado por los módulos QSG 060, EVM 30, Med 020 y EK 030. El sistema también consta de una cámara donde se forma un elevado vacío y en el que hay dispuestos dos cañones de electrones que evaporan partículas de una barra de carbono o carbono-platino. Las partículas evaporadas recubren la muestra; un dispositivo de cuarzo permite estimar el grosor de la capa depositada.

El carbono o carbono-platino que se utiliza en la evaporación se encuentra en forma de barra en el interior de cada uno de los cañones formando el ánodo (potencial tierra), a su alrededor tenemos situado el cátodo en forma de espiral. El cátodo, que posee un potencial negativo, se calienta desprendiendo electrones con una elevada aceleración hacia el ánodo. La elevada energía cinética de los electrones provoca la evaporación del material al impactar contra la barra. El flujo focalizado de partículas evaporadas se dirige hacia el soporte que contiene las rejillas o la mica

recién exfoliada, recubriendo la superficie con un delgado film. Este soporte es un disco que puede rotar a diferentes velocidades. El ángulo de incidencia ( $\alpha_{ap}$ ) de las partículas evaporadas sobre el soporte está compuesto por la suma de dos ángulos. Estos dos ángulos son el ángulo intrínseco del cañón respecto el eje vertical ( $\beta$ ) y, el ángulo de inclinación del soporte respecto a la vertical ( $\alpha_{inc}$ ). El ángulo  $\beta$  tiene un valor constante ( $8.9\pm 2.6^\circ$ ) que se determinó experimentalmente (Caravaca, 2004). El ángulo  $\alpha_{inc}$  se modificaba según el tipo de evaporación utilizado (ver Tabla 10.2). Era necesario hacer un vacío de como mínimo  $1\times 10^{-3}$  mbar en el interior de la cámara al evaporar carbono. Para realizar la evaporación de carbono-platino era necesario un vacío superior, del orden de  $1\times 10^{-6}$  mbar (el proceso duraba  $\sim 3$  h). Una vez realizado el vacío se seleccionaba el cañón de carbono o de carbono-platino y se especificaba el voltaje (V) y la intensidad (mA) (ver Tabla 10.2). Para realizar un control visual del nivel de evaporación, en cada proceso se introducía un fragmento de papel de filtro en el soporte en el que teníamos la mica o las rejillas.

**Tabla 10.2: Evaporación de carbono y carbono-platino**

Tipo de evaporación	$\beta^a$	$\alpha_{inc}^b$	Voltaje	Intensidad
Carbón	$8.9\pm 2.6^\circ$	$90^\circ$	1.8 kv	80 mA
Carbón-platino rotacional	$8.9\pm 2.6^\circ$	$5^\circ$	1.6 kv	60 mA
Carbón-platino unidireccional	$8.9\pm 2.6^\circ$	$1^\circ$	1.6 kv	60 mA

<sup>a</sup> Ángulo entre los cañones del evaporador y eje vertical.

<sup>b</sup> Ángulo entre la horizontal del soporte y el eje vertical.

Para evaporar carbono se fijaba un trozo de  $2.5\times 2.5$  cm de mica recién exfoliada (Ted Pella, Inc) al soporte. El soporte se colocaba con un ángulo de  $90^\circ$  y se programaba para que el film de carbono tuviera un grosor de 2.5 nm. Se seleccionaba el cañón de carbono y se realizaba el vacío durante 30 min. Una vez alcanzado el vacío, se especificaba el voltaje, se iniciaba el proceso y se iba incrementando paulatinamente la intensidad hasta la indicada para ese proceso (ver Tabla 10.2). Al finalizar la evaporación, se realizaba un control visual con ayuda del papel de filtro (colocado previamente en el soporte). La fina capa de carbono se dejaba reposar durante al menos 24 h antes de ser utilizada lista para su uso como sustrato de las muestras de microscopía electrónica.

### 10.3. Preparación de rejillas para microscopía electrónica

Las muestras analizadas en microscopio electrónico se depositaban sobre rejillas de cobre de 3 mm de diámetro (400 mesh, Sigma). Las rejillas tienen una cara mate y una cara brillante. El film de carbono se depositaba sobre la cara mate de las rejillas (sección anterior). La manipulación de las rejillas siempre se realizaba con

pinzas de precisión. Durante el proceso de preparación de las rejillas se trabajaba con máscara quirúrgica para evitar posibles contaminaciones.

En primer lugar las rejillas se lavaban con acetona analítica (Merck) durante 2–3 min en el interior de una cápsula de petri. Posteriormente se secaban en papel Whatman y finalmente se dejaban con la cara mate hacia arriba sobre papel de filtro en el interior de una cápsula de petri durante 5 min.

Para depositar el film de carbono sobre las rejillas se utilizaba un sistema compuesto por un embudo buckner de 5 cm de diámetro conectado a un tubo de silicona de 1 cm de diámetro con una llave de paso. La llave se cerraba y se llenaba el embudo con H<sub>2</sub>O Milli-Q. Dentro del embudo se colocaba un soporte anular de PVC (3 cm de diámetro interior y 4.5 cm de diámetro exterior) con una malla de nylon de 80  $\mu\text{m}$  de poro. Se colocaban entre 25 y 30 rejillas ordenadas sobre el soporte de nylon con la cara mate hacia arriba. Se introducía el trozo de mica con el film de carbono de  $\sim 2.5$  nm de grosor con un ángulo de  $\sim 45^\circ$  respecto al plano de la superficie de agua. Este proceso, cuidadosamente realizado, desprendía el film de carbono de la mica que se quedaba flotando en la superficie del agua. Con ayuda de unas pinzas se disponía el film encima de las rejillas y se abría la llave de paso del tubo. El nivel de agua bajaba lentamente y el film de carbono se depositaba sobre las rejillas. Se introducía el soporte de PVC-rejillas en el interior de un desecador y se realizaba el vacío (0.5–1 h). Las rejillas se dejaban secar al menos 12 h en el desecador y finalmente se guardaban dentro de una cápsula de petri sellada con parafilm<sup>TM</sup>. Las rejillas preparadas con este método se podían almacenar durante meses.

#### 10.4. Activación de las rejillas

Antes de realizar la extensión sobre las rejillas era necesario activar el film de carbono con cargas positivas para incrementar la afinidad del DNA y los complejos proteína-DNA (Coggins, 1987). Para ello se utilizaba el colorante Alcian blue (Serva). Esta sustancia confiere carácter hidrofílico al film de carbono, de manera que los cromosomas y la cromatina tienen una mayor adhesión. Se preparaba una solución 2 mg/ml de Alcian blue en ácido acético 3% (v/v). Se cogían 50  $\mu\text{l}$  de la solución y se diluían en 4.95 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Esta solución se preparaba fresca en cada proceso de activación y era efectiva durante 30 min (Sogo et al., 1986). A continuación, se colocaban 500  $\mu\text{l}$  de la solución diluida de Alcian blue en un cubreobjetos que estaba dispuesto sobre una hoja de parafilm<sup>TM</sup> y se depositaban las rejillas deseadas con el carbono en contacto con la solución. Este proceso se debía realizar con mucho cuidado para no romper el film de carbono. Inmediatamente se colocaban las rejillas durante 5 min en otro cubreobjetos que contenía 500  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q, de esta manera se eliminaba el exceso de Alcian blue. Finalmente las rejillas se sacaban del agua, se secaban con papel Whatman y se dejaban sobre parafilm<sup>TM</sup> con el carbono hacia arriba hasta el momento de extender la muestra (Aragay et al., 1991).

## 10.5. Extensión de la muestra en las rejillas

Debido a la configuración y al modo en que se obtienen las imágenes, en microscopía electrónica de transmisión la muestra se ha depositar sobre un sustrato de carbono de baja densidad electrónica. En este punto se detallan los métodos utilizados para extender los cromosomas y las placas de cromatina sobre las rejillas de microscopía (sección 10.3).

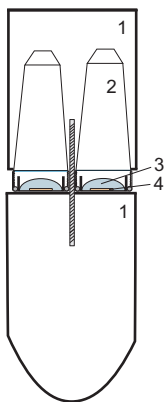
### 10.5.1. Extensión por centrifugación

La extensión por centrifugación fue el método general utilizado para depositar los cromosomas y las placas de cromatina en microscopía electrónica (adaptación de Miller y Beatty 1969 y Zentgraf et al. 1987). Generalmente la muestra se depositaaba sobre rejillas previamente activadas (ver sección anterior), pero en algún caso se utilizaron rejillas sin activar (sección 15.3.2).

El proceso de extensión requería que la rejilla estuviera perpendicular al campo centrífugo, para ello se utilizaron dos sistemas diferentes:

1. Inicialmente se utilizaba un sistema que consistía en colocar  $100 \mu\text{l}$  de muestra en un eppendorf de 0.5 ml que contenía un taco de agarosa al 3% (p/v) en tampón PME o PA en función del material a sedimentar. Una vez colocado el volumen de muestra se ponía la rejilla sobre el taco de agarosa con el film carbono hacia arriba. Este sistema se introducía en el interior de un eppendorf de 1.5 ml sin tapón que permitía utilizar el adaptador de nylon (modelo 344497, Beckman). La centrifugación se realizaba en un rotor JS 13.1 durante 10 min a  $1500g$   $4^\circ\text{C}$  (Caño, 2003; Caravaca, 2004).
2. Prácticamente la totalidad de los experimentos se realizaron utilizando una sistema de sedimentación como el que se puede ver en la Figura 10.1. Este sistema consistía en un tubo de polipropileno de 1.5 ml con tapón roscado y junta tórica. El tapón de este tipo de tubo tiene una cavidad en el centro en la que se colocaban  $75\text{--}100 \mu\text{l}$  de muestra según el experimento. Se disponían los tapones invertidos con la muestra sobre una hoja de parafilm<sup>®</sup> que a su vez estaba sobre hielo. Seguidamente se colocaba la rejilla tratada con Alcian blue (sección 10.4) en el fondo de cada tapón, con el carbono hacia arriba. Los tapones, roscados en el correspondiente tubo, se introducían invertidos en el adaptador de nylon tal como se indica en la Figura 10.1. Una vez montado el sistema se colocaba el adaptador en los *buckets*. A continuación se centrifugaban las muestras en el rotor JS 13.1 a  $1500g$  (calculados a la altura de la rejilla) y  $4^\circ\text{C}$ . La centrifugación se realizaba durante 10 min, excepto en algún caso en el que la centrifugación se realizó durante 1 y 30 min. Al finalizar la centrifugación se mantenía el tubo en posición invertida y se desenroscaba el tapón. Finalmente, se le daba la vuelta al tapón y la rejilla quedaba en la

superficie de la gota. A continuación con ayuda de unas pinzas se recuperaba la rejilla.



**Figura 10.1:** Esquema del sistema utilizado para depositar los cromosomas sobre la rejilla mediante centrifugación. **1** Adaptador de *bucket* para eppendorf del rotor JS 13.1 (Beckman); **2** Microtubo de 1.5 ml con tapón roscado y sellado mediante una junta tórica; **3** Muestra procedente de diversos tratamientos; **4** Rejilla de cobre para microscopía electrónica de 400 mesh con film de carbono (sección 10.3).

## 10.5.2. Curación

Las curaciones consistían en dejar el material cromosómico en presencia del tapón durante un tiempo variable. Este proceso se llevó a cabo para estudiar el comportamiento y dinámica de las placas de cromatina en solución a lo largo del tiempo. Para ello, se realizaron curaciones de material en suspensión y extendido sobre rejilla.

### 10.5.2.1. Curación sobre rejilla

El material utilizado en este apartado procedía de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1) al que se le realizó una diálisis en solución frente a PME (sección 9.5.2) y un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6).

Las curaciones sobre rejilla se realizaron mediante dos procedimientos:

1. Se introducía la rejilla en el interior de los tapones utilizados en la extensión por centrifugación (sección 10.5.1) que contenían 100  $\mu\text{l}$  de muestra. Se colocaban los correspondientes tubos y se curaban durante 24 ó 48 h a 4 °C, de esta manera el material se iba adsorbiendo sobre las rejillas de microscopía electrónica.
2. En este caso las placas se extendieron por centrifugación sobre las rejillas (ver sección 10.5.1) y posteriormente se curaron en los mismos tapones (ver arriba) durante 2 h, 24 h, 48 h ó 3 días a 4 °C. A algunas rejillas se les realizó un lavado antes de la curación de la muestra. El lavado consistía en introducir la rejilla con el material extendido en un tapón de polietileno invertido (modelo 3081, Deltalab) que contenía 400  $\mu\text{l}$  de tampón PME. Finalmente se insertaba el tubo al tapón y se curaba en PME a 4 °C durante el mismo tiempo indicado antes.

### 10.5.2.2. Curación en suspensión

El material cromosómico utilizado en las curaciones en suspensión tenía la misma procedencia que el utilizado en la curación sobre rejilla.

El material tratado mecánicamente con jeringuilla se curó en suspensión en el interior de un eppendorf a 4°C durante 24 ó 48 h. Una vez pasado este tiempo, la muestra se centrifugó sobre las rejillas de microscopía como se describió en la sección 10.5.1.

## 10.6. Tratamiento de los cromosomas en TEM

Se realizaron diversos tratamientos tanto a los cromosomas metafásicos nativos como a los sometidos a tratamientos mecánicos. Los tratamientos aplicados y la metodología empleada en la preparación del material, se realizaron para intentar demostrar la existencia de las placas de cromatina en el cromosoma metafásico.

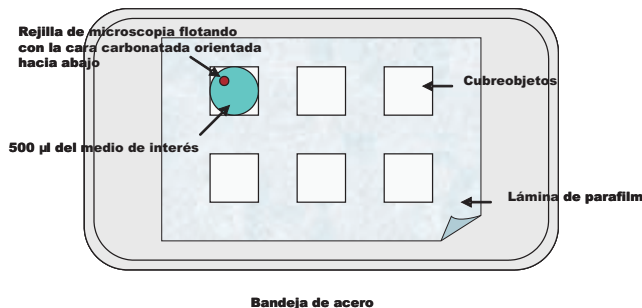
### 10.6.1. Incubación a 37°C

En esta etapa, el material depositado sobre rejilla era sometido a un cambio de medio en PME y a una incubación a 37°C. Esta incubación se realizaba para intentar desestructurar parcialmente los cromosomas y poder estudiar su ultraestructura. El material sometido a la incubación a 37°C provenía de diversas condiciones. Las incubaciones se realizaban con el material depositado sobre rejilla. Para incubar las muestras se utilizó un baño de agua (Hetofrig, HETO). Las incubaciones se llevaban a cabo mediante dos métodos diferentes:

1. Inicialmente se realizaban en un dispositivo (Figura 10.2) adaptado de Caravaca (2004). Este dispositivo consistía en una bandeja de acero inoxidable sobre la cual se colocaba una lámina de parafilm®. Encima de esta lámina se disponían cubreobjetos en un número que variaba en función de las condiciones y tiempos a ensayar. Una vez montado el sistema se dejaba flotando el dispositivo en el incubador y se agregaban 500  $\mu$ l de PME en los cubreobjetos en los que se realizaba la primera fase de incubación. Seguidamente, con ayuda de unas pinzas, se colocaban las rejillas con el film de carbono hacia abajo. Para evitar que la evaporación de la solución pudiese cambiar las condiciones de la incubación, se realizaban sucesivos cambios de las rejillas a otros cubreobjetos con 500  $\mu$ l de PME recién agregado.
2. Este método de incubación consistía en utilizar las cámaras empleadas en los lavados (sección 9.5, Figura 9.3, pág. 76). Al estar herméticamente cerrado, este sistema impedía que el agua del tampón se evaporara. Se añadían 3 ml de PME, se disponían las cámaras en una gradilla y se introducían en el incubador. A continuación con ayuda de las pinzas se colocaban las rejillas en el interior

de la disolución con PME con el film de carbono hacia arriba y se incubaban durante el tiempo deseado.

Los tiempos de incubación para los dos métodos fueron de 0.5–3 h a 37 °C.



**Figura 10.2:** Dispositivo diseñado para realizar cambios de medio en cromosomas ya extendidos sobre rejillas de microscopía electrónica. (Figura adaptada de Caravaca 2004).

### 10.6.2. Digestión con RNasa

Se realizaron digestiones enzimáticas con RNasa (Roche) para determinar si el RNA tenía algún papel estructural en las placas. El material utilizado en este ensayo provenía del gradiente de sacarosa (sección 9.4.1) y un proceso de diálisis (sección 9.5.2). La digestión se realizó sobre material que provenía directamente de la diálisis, o sobre material al que adicionalmente se le había realizado un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6). En los dos casos se realizó una digestión con el material en suspensión y con la muestra previamente extendida sobre la rejilla. Las digestiones se llevaban a cabo durante 30 min a 37 °C. En las digestiones en solución se trasvasaban 300 µl de material a un tubo eppendorf, posteriormente se introducía en el incubador, y se añadía un volumen de RNasa adecuado para tener una concentración de 0.5, 3 ó 10 mg/ml. En el caso de las digestiones con el material extendido se utilizó el dispositivo usado en los cambios de medio (Figura 10.2). Se colocaban las rejillas con el film de carbono hacia abajo sobre 500 µl de PME. En el momento de iniciar la digestión se añadía el volumen de RNasa necesario para tener las mismas concentraciones que en la digestión en suspensión.

### 10.6.3. Desnaturalización parcial en presencia de NaCl

La desnaturalización parcial en presencia de NaCl se realizó para tratar de demostrar la presencia de cromatina en el interior de las placas. Para ello se llevaron a cabo dos estrategias. En la primera se desnaturalizaban las placas antes de realizar un entrecruzamiento de las muestras, en la segunda se entrecruzaba la muestra suavemente antes de desnaturalizar las placas con NaCl para desestructurar sutilmente su estructura.



### 10.6.3.1. Desnaturalización pre-entrecruzamiento

El material utilizado en esta etapa provenía de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), una incubación-diálisis (sección 9.5.2) y un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6).

En este caso se realizó una desnaturalización durante un tiempo corto (2–40 min) en 4 ml de PME con NaCl 2 M en el interior de las cámaras descritas en la sección 9.5.1. Posteriormente se realizaba un lavado secuencial de concentración decreciente de NaCl. Este proceso secuencial se realizaba en cubreobjetos dispuestos sobre una hoja de parafilm<sup>®</sup>. Primero se introducía la rejilla durante 5 min en un cubreobjetos con 400  $\mu$ l de una solución 400 mM de NaCl en H<sub>2</sub>O Milli-Q. Posteriormente se cambiaba a otro cubreobjetos durante 5 min con 400  $\mu$ l de una solución 80 mM de NaCl en H<sub>2</sub>O Milli-Q. Después de este proceso se realizaba un entrecruzamiento típico de la muestra (ver sección 10.7.1) y finalmente se hacía un lavado (sección 10.8).

### 10.6.3.2. Desnaturalización post-entrecruzamiento

El material utilizado en esta etapa provenía de un gradiente de glicerol (sección 9.4.2), una incubación-diálisis (sección 9.5.2) y un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6).

En este caso antes de desnaturalizar las placas se realizó un entrecruzamiento suave en tampón PME (ver sección 10.7.1) para fijar parcialmente la estructura. La desnaturalización se realizó durante 45 min en 4 ml de PME con NaCl 1 M ó 2 M, según el caso, en el interior de las cámaras descritas en la sección 9.5.1. Posteriormente se realizaba un lavado secuencial de concentración decreciente de NaCl como el descrito en la sección anterior. Finalmente se realizaba un lavado (sección 10.8).

## 10.7. Entrecruzamiento de las muestras

Este proceso se realizaba para preservar la estructura de los cromosomas nativos o después de sufrir los diversos tratamientos. Este paso es muy importante, ya que en microscopía electrónica la muestra se expone a un haz intenso de electrones. El entrecruzamiento se realizaba con glutaraldehído (Fluka), un potente entrecruzador que reacciona preferentemente con los grupos amino de la lisinas y en menor grado con las bases nitrogenadas. Esto proporciona una fuerte fijación que permite mantener la estructura de las muestras (Narayanswamy y Hamkalo, 1987; Bozzola y Russell, 1992).

### 10.7.1. Entrecruzamiento en rejilla

En el proceso de entrecruzamiento se partía de una solución ~25 % de glutaraldehído (v/v). Esta solución se diluía 1:10 en el tampón en el cual estaba el material sedimentado sobre la rejilla. Era muy importante que la solución diluida se preparara justo antes de ser utilizada y se mantuviera en hielo para minimizar la pérdida de actividad del glutaraldehído. El glutaraldehído es muy tóxico y volátil por lo que siempre se ha de trabajar en una campana extractora de gases.

El protocolo estándar de entrecruzamiento era el siguiente: Se extendía una hoja de parafilm® en la que se disponían los cubreobjetos a los que se les añadían 400  $\mu\text{l}$  de la solución al 2.5 % de glutaraldehído y se dejaba la rejilla incubando durante 10 min con el film de carbono hacia abajo. Se utilizaba un cubreobjetos para cada condición y como máximo se colocaban 3-4 rejillas en cada cubreobjetos.

También se realizó un proceso de entrecruzamiento más suave para poder llevar a cabo el proceso de desnaturalización parcial (ver sección 10.6.3.2). Para ello se realizó el entrecruzamiento durante 30 min a RT con una solución al 0.01 % de glutaraldehído.

### 10.7.2. Entrecruzamiento en solución

La fijación en solución se realizaba antes de extender el material cromatínico encima de las rejilla de microscopía. Este procedimiento nos permitía estudiar la estructura de las placas en solución.

El entrecruzamiento en solución se realizaba en tubos eppendorf. Se añadía a la muestra un volumen de glutaraldehído concentrado para tener una concentración final de 0.2 % (v/v) y se dejaba incubando en hielo durante 20 min. Una vez finalizado el tiempo se extendía la muestra sobre las rejillas (sección 10.5.1).

## 10.8. Lavado final y deshidratación de las muestras

Una vez se han finalizado todos los tratamientos se ha de realizar un lavado final al material extendido sobre las rejillas. Este lavado se llevaba a cabo para eliminar las posibles trazas residuales de las sustancias aplicadas sobre el material durante el proceso de preparación. En experimentos iniciales se efectuaba un lavado durante 5 min de las rejillas en cubreobjetos con 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q. En este paso se colocaba la rejilla con el film de carbono hacia abajo, ya que la rejilla se quedaba en la superficie por tensión superficial. Pero en la mayoría de experimentos de esta tesis, el protocolo general constó de un lavado muy exhaustivo que se realizó en el interior de las cámaras (Figura 9.3, pág. 76). Se introducía 4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q en el interior de la cámara, posteriormente se colocaba la rejilla en el fondo (con el film de carbono hacia arriba) y se dejaba haciendo el lavado durante 20 min.

Finalmente se realizaba el proceso de deshidratación de las muestras. Las rejillas recién lavadas se sumergían en una solución de etanol absoluto durante 4–5 s y se dejaban secar (con el carbono hacia arriba) sobre papel Whatman un mínimo de 2 min. Este procedimiento eliminaba por completo el agua, de manera que no interfería al efectuar la observación en el microscopio electrónico. Finalmente, las muestras se guardaban en un porta rejillas con plástico antiestático (Sigma) que nos permitía tenerlas numeradas y almacenadas.

## 10.9. Tinción de las muestras

El microscopio electrónico de transmisión genera las imágenes haciendo pasar un haz de electrones a través de la muestra. Estos electrones se dispersan proporcionalmente al número atómico de los átomos que la componen. El material biológico está compuesto por elementos de un número atómico pequeño, con lo que presenta un índice de dispersión de los electrones bajo. Para incrementar el contraste de este tipo de muestras se realiza una tinción con metales pesados. Los metales pesados acumulados incrementan la densidad de la muestra y en consecuencia se produce un incremento en el contraste de las imágenes obtenidas (Bozzola y Russell, 1992). En nuestro caso se decidió utilizar carbono-platino como medio de contraste. Al evaporarse, el platino viaja en línea recta y se condensa en forma de pequeñas partículas nanométricas al chocar contra la muestra (ver sección 10.2).

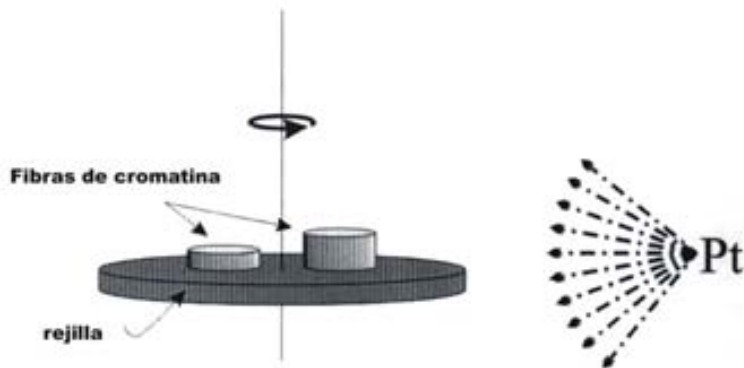
### 10.9.1. Platinado unidireccional

En el platinado unidireccional el soporte en el cual se colocaban las rejillas permanecía inmóvil con un ángulo  $\alpha_{inc}$  de  $1^\circ$  durante el proceso de evaporación del carbono-platino (ver Tabla 10.2, pág. 81). Al realizar este proceso se consigue que las partículas de platino se depositen sobre la muestra, de esta forma provocábamos que detrás de las estructuras se creara una zona inaccesible a las partículas evaporadas, dando lugar a una sombra. La altura de una partícula se podía determinar midiendo la longitud de la sombra creada por la estructura (ver sección 14.1.1; Bozzola y Russell, 1992).

### 10.9.2. Platinado rotacional

En este caso el soporte del evaporador se inclinaba con un  $\alpha_{inc}$  de  $5^\circ$  (ver Tabla 10.2, pág. 81). Después de realizar el vacío a  $1 \times 10^{-6}$  mbar se hacía girar la muestra a 100 rpm (3 barras en el indicador de velocidad) y se procedía a realizar la platinación hasta conseguir un grosor de  $\sim 1$  nm carbono-platino.

Las partículas evaporadas se acumulan diferencialmente en función de la disposición del material con respecto al haz de platinación (ver Figura 10.3). De manera que, cuanto más perpendicular al haz esté dispuesto el objeto mayor cantidad de



**Figura 10.3: Esquema del proceso de platinación rotacional.** Ejemplo correspondiente a fibras cortas de cromatina 30-40 nm de diámetro. Al utilizar un ángulo de platinación pequeño se consigue que el platino se acumule mayoritariamente en la cara lateral del cilindro que representa la fibra (Figura adaptada de Martín 1999).

partículas incidirá. La acumulación diferencial y el hecho de utilizar un ángulo de platinación pequeño nos permitía realzar la existencia de elementos muy bajos depositados sobre el film de carbono (Bartolomé et al., 1994; Bermudez, 1994).

## 10.10. Observación y obtención de micrografías en TEM

Las muestras platinadas se observaron en los microscopios electrónicos de transmisión H7000 (Hitachi) a 100-kV y Jeol JEM-1400 a 80-kV. En el microscopio H7000 las micrografías se obtuvieron mediante una cámara CCD Megaview III (Soft Imaging Sistem) y el software AnalySIS 3.2 (Soft Imaging Sistem) que nos permitía observar la muestra y modificar parámetros de las imágenes en tiempo real. Las micrografías analógicas se tomaron con la cámara incorporada en el microscopio electrónico; se realizaba una exposición de 1.5 ó 2 s. La digitalización de los negativos se realizaba con ayuda de un densitómetro GS-700 (Bio-Rad). En el microscopio JEM-1400 las micrografías se obtenían con la cámara CCD Erlangshen ES1000W (Gatan, Inc.) y el software DigitalMicrograph™ (Gatan, Inc.). Los aumentos más utilizados fueron entre 5000× y 30000×. Ocasionalmente también se realizaron magnificaciones de hasta 80000× aumentos.

---

En la calibración del microscopio Hitachi H7000 se utilizaron unas rejillas (Bal-Tec) que contenían 54000 líneas por pulgada (Caño, 2003; Caravaca, 2004). El microscopio Jeol JEM-1400 se calibraba mediante redes de difracción de 2160 líneas/mm<sup>2</sup> montadas en rejillas y cristales de catalasa (Bal-Tec) con tinción negativa y espaciados de 8.75 nm (Castro-Hartmann, 2009).



# Capítulo 11

## AFM para el estudio de las placas de cromatina

*La microscopía de fuerza atómica es una técnica que tiene múltiples ventajas respecto a otros tipos de microscopías. Como ya se ha explicado en la introducción (sección 6.2), el microscopio AFM permite trabajar en líquido. Esto supone un gran avance en Biología Molecular ya que se trata de una técnica no destructiva con resolución nanométrica en medio acuoso. Los tejidos, células enteras u orgánulos no se han podido estudiar con detalle en su ambiente natural acuoso. Con el desarrollo de este tipo de técnicas es posible estudiarlas in-situ (Murphy et al., 2006). Por estas razones en los últimos años la microscopía AFM se ha convertido en una herramienta muy útil para los biólogos celulares y moleculares. La microscopía AFM nos ha permitido visualizar las placas de cromatina en solución, con esta técnica hemos complementando los estudios de microscopía electrónica realizados previamente en nuestro grupo y en el transcurso de esta tesis doctoral.*

### 11.1. El microscopio AFM

El microscopio de fuerza atómica es un equipo con una resolución vertical y espacial subnanométrica y con una resolución de fuerza que puede estar en el rango de las decenas de pN. Debido a esto son instrumentos muy sensibles a vibraciones mecánicas y al ruido eléctrico generado por otros equipos. Un AFM suele ir montado en cámaras de aislamiento electro-acústico y encima de una mesa especial que lo aísla mecánicamente del suelo (ver sección 11.3 y Figura 11.1). Este tipo de microscopio suele instalarse en la planta baja o en el sótano de un edificio para asegurarnos un aislamiento mecánico extra.

Un AFM es un equipo muy flexible en lo que se refiere al *hardware* que lo compone. Dependiendo de la aproximación experimental que se necesite se puede implementar el equipo a medida. Los elementos básicos que componen todos los equipos

de AFM son:

**Microscopio:** Dónde va colocada la muestra, y donde están los componentes básicos de un AFM (ver sección 11.2).

**Electrónica:** Este elemento es el que controla el funcionamiento del microscopio, se encarga de que el sistema de *feedback* detector-piezo funcione adecuadamente. También controla todos los parámetros relacionados con el movimiento de la punta durante el escaneado de la superficie estudiada.

**Computadora:** El ordenador es el medio a través del cual se introducen los valores de referencia a la electrónica y se visualizan los resultados en forma de imágenes o de gráficas en función de la modalidad empleada.



**Figura 11.1: Equipo AFM MFP 3D-BIO utilizado en esta tesis.** Este AFM está integrado en un microscopio óptico Nikon. El conjunto está dispuesto en una cámara de protección electro-acústica y aislado de las vibraciones mecánicas del suelo.

En el transcurso de las diferentes fases experimentales de esta tesis se han utilizado diferentes microscopios en función de los objetivos. Son los siguientes:

1. *Multimode* (Digital Instruments) equipado con un escáner J AS 130V y controlado con una electrónica Nanoscope IV (Digital Instruments).
2. MFP 3D-BIO (Asylum Research).
3. *Dimension 3100* (Digital Instruments) controlado con una electrónica Nanoscope IV.



## 11.2. Partes del AFM

### 11.2.1. El *holder*

El *holder* es la pieza en la que va montada la punta. Cuando se trabaja en modo AM-AFM (ver sección 6.2.2.2) la punta oscila a una frecuencia concreta y el *holder* es el encargado de proporcionar la vibración a la punta. En esta tesis se han utilizado generalmente *holders* diseñados para trabajar en líquido. Éste mantiene el ambiente acuoso, ya que por tensión superficial se forma un espacio líquido entre el soporte en el que se deposita la muestra y el propio *holder*. Se ha de controlar el volumen de líquido contenido para evitar cambios de concentración y deshidratación. En algunos experimentos también se utilizó un *holder* diseñado para trabajar en seco con el microscopio *Multimode*.

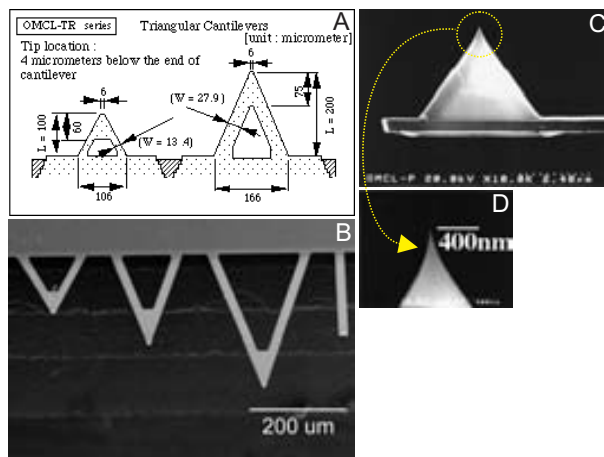
### 11.2.2. La sonda

La sonda consiste en una punta micro-fabricada muy afilada que está montada al final de un *cantilever* (o micropalanca), que tiene una longitud de 50–200  $\mu\text{m}$  (Magonov y Yerina, 2005). Los *cantilevers* están dispuestos en chips debido a que el proceso de fabricación es similar al de los microchips (Lee et al., 2003; Dobson et al., 2005). El extremo de la punta es la zona de la sonda que entra en contacto con las muestra y tiene un radio ( $R$ ) que va desde los 5 a los 30 nm. Hay dos tipos diferentes de *cantilever* (ver Figura 11.2): Los de geometría rectangular (*beam-shaped*) y los de geometría triangular (*v-shaped*). En todos los apartados de AFM se utilizaron puntas triangulares de nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ).

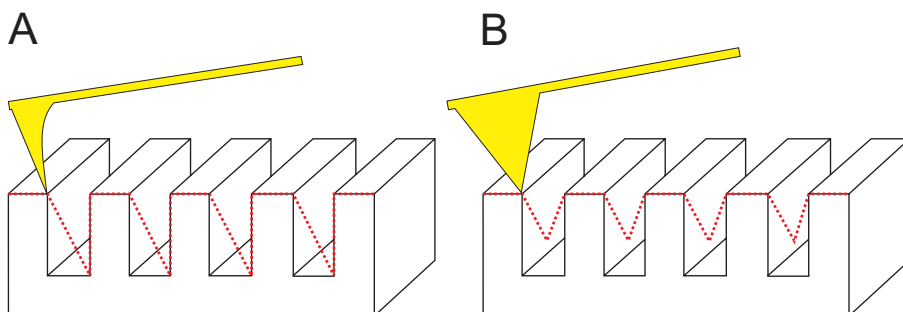
Estas puntas son las más usuales para la obtención de imágenes en líquido con muestras biológicas. También son unas puntas aptas para su uso en Espectroscopia de Fuerza Atómica y Microscopía de Fuerza Lateral ya que el rango de fuerza vertical y lateral generada está dentro del rango de resistencia del material biológico. Debido a la transparencia del  $\text{Si}_3\text{N}_4$  a la luz visible, normalmente, tienen un recubrimiento de Au y Cr en la parte trasera del *cantilever* para mejorar la reflexión del láser.

La relación de aspecto de la punta, que no es más que la ratio entre la longitud total de la punta y la anchura en el centro, es un parámetro muy importante. Para determinar la topografía de una muestra con forma atrincherada hay que utilizar puntas con una elevada relación de aspecto como se muestra en la Figura 11.3A, mientras que para medidas estándar o imágenes aplanadas una punta con una relación de aspecto baja es suficiente.

Todas las imágenes adquiridas con el microscopio *Multimode* y los análisis de fricciones obtenidos con el *Dimension* 3100 se obtuvieron con *cantilevers* triangulares de 100 nm OMCL-TR400PSA (Olympus) con una constante de fuerza nominal de 0.08 N/m; en los experimentos de desnaturalización en tiempo real, obtenidos con el MFP 3D-BIO, mayoritariamente se utilizaron los *cantilevers* de 200 nm (constante



**Figura 11.2: Puntas de AFM.** (A) Esquema proporcionado por Olympus de las puntas OMCL-TR400PSA en el que se observa una parte del chip y dos *cantilevers*. (B) Imagen de microscopía electrónica de barrido en la que se muestran *cantilevers* triangulares y rectangulares de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  montados en el mismo chip. (C) Detalle de una punta piramidal de AFM. (D) Ampliación de la zona delimitada por el círculo en C; se puede observar cómo la terminación de la punta es muy afilada lo que permite obtener una gran resolución.



**Figura 11.3: Relación de aspecto vs. topografía.** (A) punta con una elevada relación de aspecto, adecuada para obtener imágenes de muestras con trincheras profundas. Incluso en este caso en el que la punta puede determinar de forma precisa la profundidad, no hay un ajuste exacto de la forma. Por lo tanto, la elección de la punta para cada aproximación experimental es extremadamente importante. (B) punta con una baja relación de aspecto, que determina erróneamente tanto la profundidad como la forma del objeto, en este caso. Las líneas de puntos marcan la imagen topográfica registrada por la punta mientras que las líneas sólidas indican la forma del objeto. Figura adaptada de Oncins (2007).

nominal de 0.02 N/m; ver Figura 11.2A). En algunos experimentos de fricción, se utilizaron puntas triangulares DNP-C (Veeco) con una constante de 0.32 N/m.

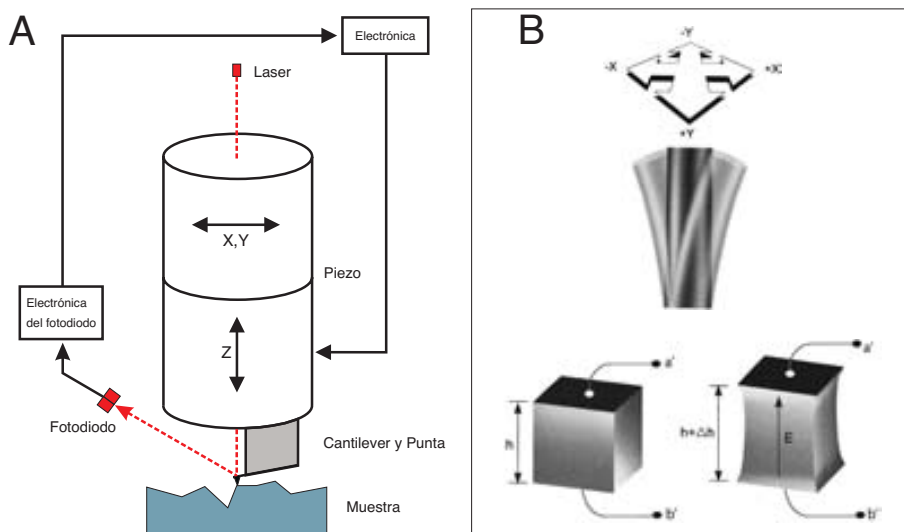
### 11.2.3. El detector

El método más común para determinar la deflexión del *cantilever* es el láser (Alexander et al., 1989). En primer lugar el láser se debía microposicionar de manera que incidiera sobre la parte posterior del *cantilever* reflejándose en el detector. De esta manera cuando la punta se deflexiona durante el escaneado debido a la topografía, este movimiento se monitoriza en el fotodetector como un movimiento del punto del láser (ver sección 6.2.1). Por lo tanto, el fotodetector transforma el movimiento mecánico del *cantilever* en una señal eléctrica (Magonov y Yerina, 2005). Los fotodetectores más sencillos tienen dos segmentos, que dan información del movimiento vertical de la punta. También hay fotodetectores de cuatro segmentos que además dan información de la deflexión lateral y por lo tanto permiten realizar medidas de fuerza lateral (ver sección 6.4). Todos los equipos utilizados en esta tesis tenían fotodetectores de cuatro segmentos. Para el caso de las imágenes topográficas el uso del segmento vertical del fotodetector era suficiente, pero en el caso de las medidas obtenidas por LFM (ver sección 6.4) era necesario el uso de los cuatro segmentos. La señal detectada por el fotodetector se envía al *feedback* de la electrónica que lo mantiene constante durante el escaneado de la muestra. Dependiendo del tipo de señal procesado por el *loop* del *feedback* de la electrónica tenemos diferentes modos de AFM (ver sección 6.2.2).

### 11.2.4. El piezoeléctrico

El piezoeléctrico es el elemento encargado de posicionar y desplazar la sonda en el rango del micrómetro con una precisión de sub-Ångström (Cidade et al., 1998; Magonov y Yerina, 2005). En primer lugar es el encargado de realizar el movimiento de escaneado de la muestra a través del plano  $x-y$ ; en segundo lugar mueve la muestra en el eje  $z$  en respuesta a la topografía de la misma como se muestra en la Figura 11.4B. Los materiales piezoeléctricos se expanden o contraen de una manera muy reproducible y controlada cuando se les aplica un voltaje externo. Debido a la naturaleza policristalina del material utilizado para construir los dispositivos piezoeléctricos, estos elementos tienen cierta histéresis o desviación; este comportamiento es imperceptible cuando se escanean áreas muy pequeñas.

Dependiendo de la configuración del microscopio podemos encontrar el movimiento del piezoeléctrico asociado a la muestra o a la sonda. En el primer caso la sonda está fija y es la muestra la que se mueve en el plano  $x-y$  para ir escaneando la muestra y en el eje  $z$  para adaptarse a la deflexión del *cantilever*. En el segundo caso es la punta la que está unida al piezoeléctrico y la que lleva cabo los movimientos en  $x-y$  y  $z$  como se muestra en la Figura 11.4A.



**Figura 11.4:** Esquema del piezoeléctrico de un AFM. En (A) se muestran los principales elementos que intervienen en el *feedback* que regula la posición de la punta. En este caso se observa un sistema en el que el *cantilever* está unido al piezo y en el que un único piezotubo mueve horizontal y verticalmente la sonda. (B) (Arriba) Ejemplo de movimiento del piezo en el plano horizontal al aplicar un voltaje sobre él. (Debajo) Movimiento en el eje  $z$  de un piezo; después de aplicar un voltaje entre  $a'$  y  $b'$  se puede observar un  $\Delta h$  o extensión del piezo (Figura adaptada de Cidade et al. 1998).

### 11.3. Accesorios de un equipo de AFM

#### 11.3.1. Aislamiento acústico/eléctrico

Como se indicó en la sección 11.1 los AFM son altamente sensibles a vibraciones y ruido eléctrico debido a su configuración y modo de funcionamiento. Para aislar acústica y eléctricamente los AFM se suelen introducir en unos habitáculos que cierran herméticamente y aíslan el equipo del exterior como se muestra en la Figura 11.1.

De los tres equipos utilizados en esta tesis, dos de ellos estaban provistos de este tipo de aislamiento. El *Dimension 3100* estaba aislado en una cámara de aislamiento acústico (TMC). En el caso del *Asylum MFP 3D-BIO* la cámara de aislamiento diseñada específicamente para este equipo fue fabricada por *Integrated Dynamics Engineering*.

### 11.3.2. Aislamiento mecánico

El aislamiento mecánico del suelo se obtuvo con una mesa especialmente diseñada para absorber las vibraciones. En esta tesis se utilizaron dos sistemas para aislar los equipos mecánicamente. En el caso del microscopio MFP 3D-BIO se utilizó una tabla TS isolation series (Herzan), que era capaz de aislar activamente entre 0.7–1000 Hz. El microscopio *Dimension 3100* y el *Multimode* estaban dispuestos sobre mesas antivibraciones 68-500 SERIES (TMC), que utilizan gases (aire o nitrógeno) para generar un sistema flotante que absorbe las vibraciones del suelo.

## 11.4. Frecuencia de vibración de la punta en AM-AFM

Cuando se trabaja en AM-AFM *mode* o *tapping mode* hay un contacto intermitente entre la punta y la sonda a diferencia de lo que ocurre en el *contact mode* (ver introducción, sección 6.2.2). La intermitencia es debida a que la punta oscila o vibra a una frecuencia y amplitud determinada (Zhong et al., 1993). Esta oscilación es generada por un piezoeléctrico localizado en el *holder* que permite modular la frecuencia de resonancia del *cantilever*, que puede tener valores entre 0.1 y 100 kHz.

Antes de obtener las imágenes, se ha de ajustar la frecuencia de vibración. Generalmente el fabricante proporciona la frecuencia nominal aproximada para cada *cantilever*. Esta frecuencia depende del material, geometría de la punta y medio en el que vibra. Las puntas OMCL-TR400PSA con los *cantilever* de 100 y 200  $\mu\text{m}$ , en líquido resuenan alrededor de 7 y 3 kHz, respectivamente. En el caso de las imágenes tomadas con el microscopio MFP 3D-BIO se utilizó una frecuencia de vibración de  $\sim 13$  kHz. El ajuste de la frecuencia de la punta se realizaba con ayuda de una rutina integrada en el *software* del microscopio. Esta rutina realiza un barrido de frecuencias mostrándonos el patrón<sup>1</sup> con los picos de resonancia del *cantilever* en el medio y condiciones de trabajo utilizadas en cada experimento. Una vez obtenido este patrón se puede asignar la frecuencia de vibración en el armónico nominal proporcionado por el fabricante<sup>2</sup>. Generalmente se asignaba la frecuencia un 5–10 % por debajo del máximo debido a que los *cantilever* tienen una deriva hacia frecuencias mayores a medida que se realizan las imágenes topográficas.

---

<sup>1</sup>El patrón consta de unos picos a diferentes frecuencias y con diferentes intensidades que indican los armónicos de la punta.

<sup>2</sup>Esta es la frecuencia de vibración libre o de equilibrio ya que es la que tiene la punta cuando no está en contacto o cercana a una superficie. El acercamiento a una superficie perturba el patrón de vibración de la punta como se explicó en la sección 6.2.2.2.

## 11.5. Eliminación de contaminantes en técnicas nanométricas

Del mismo modo que en microscopía electrónica (ver sección 10.1) en las técnicas de sonda próxima también hay que evitar la presencia de contaminantes químicos y/o biológicos. En estudios con AFM cualquier contaminante puede inducir a errores por ello se procedía a lavar cuidadosamente todas las partes del microscopio que entran en contacto con la muestra, y todos los tampones utilizados fueron filtrados.

### 11.5.1. Eliminación de contaminantes de la sonda

El lavado de las puntas es un punto clave en cualquier aproximación experimental con equipos de sonda próxima, ya que es precisamente la punta el elemento a través del cual obtenemos imágenes topográficas, y curvas de fuerza. La presencia de contaminantes en la sonda puede alterar considerablemente los resultados obtenidos. En el caso de la obtención de imágenes topográficas, la forma de la punta es muy importante (sección 11.2.2). Si en la zona de contacto de la punta con la muestra existe una impureza adsorbida puede provocar un cambio en la imagen registrada por el equipo.

La eliminación de contaminantes de las puntas de AFM se realizaba con un limpiador de puntas UV-Ozono PSD (Novascan Technologies, Inc.). Este sistema permitía eliminar los restos de materia orgánica gracias a la emisión de luz ultravioleta en las longitudes de 185 y 254 nm. En presencia de un ambiente con oxígeno esta emisión provoca una producción significativa de  $O_3$  y excitación molecular. La combinación de estos dos elementos conduce a la eliminación de la materia orgánica a nivel molecular. Este proceso permitía reutilizar las puntas de AFM, lo cual resulta muy importante en LFM (ver sección 12.2).

### 11.5.2. Eliminación de contaminantes en el *holder* y en los accesorios

También se realizó un proceso de limpieza de todos los elementos que entraban en contacto con las muestras durante la manipulación del material cromatínico en AFM. Todos los tampones se filtraron debidamente (ver sección 10.1). Los diversos recipientes y puntas de pipeta utilizados para extender la muestra (sección 11.8) o realizar las diversas diluciones se lavaron exhaustivamente con etanol- $H_2O$  MilliQ para eliminar posibles restos e impurezas. Del mismo modo los sistemas de mica-Teflón® en la que se extendía la muestra también sufrían el mismo proceso de lavado de etanol- $H_2O$  MilliQ.

Una vez montada la punta en el *holder* se procedía a realizar una limpieza en un baño con ultrasonidos. Se sonicaba el conjunto *holder*-sonda durante aproximadamente 5 min y seguidamente se realizaba un lavado final con etanol- $H_2O$  MilliQ.

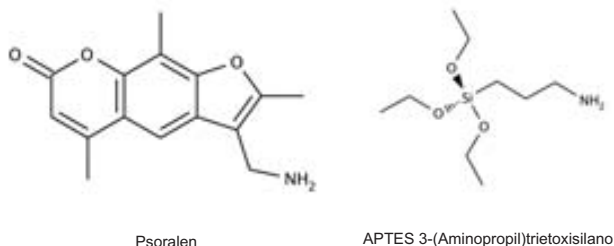
## 11.6. Modificaciones químicas de la punta de AFM

En espectroscopia de fuerza atómica es muy usual recubrir las puntas con metales (García-Manyes et al., 2006) o modificarlas químicamente con compuestos orgánicos (Hinterdorfer et al., 1996; Chen y Moy, 2002). Esto permite unir moléculas de interés para poder determinar fuerzas de interacción. Se modificaron puntas con moléculas orgánicas para tratar de realizar experimentos de *force-clamp* (Wiita et al., 2007) con las placas de cromatina.

### 11.6.1. Puntas silanizadas

Para poder unir moléculas a una punta esta se ha de activar. La silanización de las puntas es el primer paso para poder unir otras moléculas de interés. El reactivo APTES [3-(aminopropil)trióxosilano] (Sigma; Figura 11.5) se incorpora porque substituye átomos de Si de la red cristalina que forma el  $\text{Si}_3\text{N}_4$  de la punta, de manera que finalmente la punta queda recubierta de cadenas aminopropil.

Para silanizar las puntas en primer lugar se realizaba una limpieza con el sistema UV-Ozono (sección 11.5.1) durante 20 min. Se colocaba una gota de APTES en el fondo de un desecador, se introducían las puntas limpias en el interior (colocadas en una cápsula de petri abierta) y se realizaba el vacío durante 30 min. Una vez pasado el tiempo se paraba la bomba de vacío y se dejaba el desecador bajo vacío durante 30 min más.



**Figura 11.5:** Estructura química de los dos compuestos químicos que se utilizaron para recubrir las puntas de AFM.

### 11.6.2. Puntas con psoralen<sup>®</sup>

El psoralen<sup>®</sup> (Sigma) es una molécula que es capaz de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA. Esta molécula tiene propiedades fotoquímicas, de manera que si se irradia a 365 nm una solución de DNA en presencia de psoralen<sup>®</sup>, éste reacciona químicamente formando mono y diaductos con el DNA; si se irradia a 390 nm solo se forman monoadductos. Por esta razón este reactivo se ha utilizado ampliamente en el estudio de la estructura del DNA (Goldenberg et al., 1988).

Para unir psoralen<sup>®</sup> a las puntas silanizadas se utilizó un brazo espaciador, que debidamente activado, se unía al grupo amino del psoralen<sup>®</sup> (Figura 11.5).

## 11.7. Preparación del soporte de mica para AFM

En microscopía de fuerza atómica el soporte en el cual se extiende la muestra ha de ser extremadamente plano y liso. Los substratos más comunes para AFM en Biología son las superficies de vidrio y la mica (Kindt et al., 2002). En esta tesis se utilizó mica. La mica es un mineral compuesto por silicatos que forman una estructura laminar. Esta estructura es fácilmente exfoliable debido a que las fuerzas de interacción entre los diferentes planos son más débiles que las fuerzas que estabilizan de las láminas del mineral. Al exfoliar un fragmento de mica obtenemos un plano limpio y extremadamente plano ideal para realizar experimentos de AFM.

### 11.7.1. Mica para imágenes topográficas y AFS

En la obtención de imágenes topográficas y los experimentos de indentación (capítulo 17) se utilizó mica muscovita Grado V1<sup>3</sup> (Ted Pella, Inc), esta mica una vez exfoliada forma unos planos muy perfectos.

Se recortaban cuidadosamente trocitos de mica de 3×3 mm y se exfoliaban varias veces, utilizando cinta adhesiva, para asegurar que no quedasen láminas entreabiertas<sup>4</sup>. Los trozos de mica estaban enganchados, con un Loctite® especial para plásticos, encima de un disco de Teflón® (9 mm de diámetro). Finalmente, dependiendo del microscopio utilizado el conjunto mica-Teflón® se unía (con pegamento mural) a otro soporte. En el caso del *Multimode* se unía a un disco de metal de 15 mm de diámetro (Ted Pella, Inc) que permitía anclar la muestra al escáner gracias a un imán. En el microscopio MFP 3D-BIO el soporte mica-Teflón® se unía a un portaobjetos.

### 11.7.2. Mica para el análisis mediante LFM

Para LFM también se utilizó mica muscovita Grado V1. En LFM las medidas se han de realizar en una superficie muy lisa y horizontal para que los valores de fricción obtenidos sean correctos. Por ello, se utilizó mica cortada directamente por el fabricante (discos de 9.9 mm de diámetro; Ted Pella, Inc); esta mica tiene todos los planos perfectamente sellados y paralelos.

La mica se enganchó encima de un disco de Teflón® (15 mm de diámetro) con un pegamento Mural. El disco de Teflón® a su vez iba fijado con el mismo pegamento a un disco de metal de 15 mm de diámetro (Oncins et al., 2005).

---

<sup>3</sup>La mica muscovita se clasifica en diferentes grados V1–V10 en función de propiedades visuales como el grado de aplanamiento de las superficies, coloración y otras características que definen la utilidad y el grado de pureza. Los grados aptos para AFM son el V1 ó V2.

<sup>4</sup>Al cortar la mica se pueden desprender parcialmente capas internas provocando que las imágenes o la toma de curvas de  $F_v$  vs.  $\delta$  no sea correcta. Esto es debido a que la lámina de mica entreabierta puede vascular creando una superficie inestable.



## 11.8. Extensión de la muestra sobre mica

### 11.8.1. Extensión por centrifugación-curación

La extensión por centrifugación se utilizó para extender cromosomas o para incrementar la cantidad de cromatina depositada sobre las superficie de mica (sección 11.7) en los experimentos de curación (sección 16.5). En la extensión de cromosomas, el material procedía de un gradiente de sacarosa (ver sección 9.4.1) en presencia de PME. Se introducían 400  $\mu\text{l}$  en un tapón de polietileno invertido (el mismo sistema que se describe en la sección 10.5.2.1). Posteriormente se introducía el disco de mica-Teflón® (mica de 3×3 mm) con ayuda de unas pinzas y se insertaba el tubo de 5 ml manteniendo el tapón invertido. El tubo se centrifugaba invertido en el interior de un falcon de 50 ml durante 5 min a 1500g en la centrífuga Allegra 6 (Beckman Coulter) a RT.

El material al que se le realizó una curación provenía de una diálisis en solución con PME (ver sección 9.5.2). Se centrifugaba el material en el interior de los tapones (como se describe arriba) durante 5 min en la centrífuga Allegra 6R a 4 °C. Después de 40 min se realizaba un lavado introduciendo el disco de mica-Teflón® en un tapón con 800  $\mu\text{l}$  de tampón PME, se insertaba el tubo y se dejaba curar *overnight* a 4 °C.

Al finalizar estas operaciones, los discos de mica-Teflón® con la muestra depositada se engancharon al disco metálico de 15 mm de diámetro para visualizar la muestra en el microscopio.

### 11.8.2. Extensión por adsorción y curación

La adsorción ha sido el método más utilizado en esta tesis para extender las placas de cromatina sobre la mica. Se depositaban 10  $\mu\text{l}$  de muestra sobre la mica de 3×3 mm ó 120  $\mu\text{l}$  sobre los discos de 9.9 mm diámetro y se dejaban adsorbiendo durante 5 min. Finalizado este tiempo se realizaba un lavado con el tampón en el que estaba disuelto el material cromatínico (o en el tampón adecuado en el caso de realizar un cambio de medio). El lavado se realizaba eliminando, en primer lugar, todo el volumen de la solución depositada sobre la mica<sup>5</sup>, y añadiendo después, con ayuda de otra pipeta, un volumen aproximadamente igual al extraído. Este ciclo se repetía 5–6 veces de manera que se eliminaba totalmente el exceso de material. Finalmente se dejaba equilibrar el sistema en el tampón cómo mínimo 5 min antes de introducir la muestra en el microscopio.

En algún experimento se realizó una curación después de adsorber el material. Este procedimiento era similar al utilizado en las curaciones en las que el material se extendió por centrifugación (ver sección anterior). Se introdujeron 400  $\mu\text{l}$  en un tapón de polietileno invertido que contenía el disco de mica-Teflón®. Después de 40

---

<sup>5</sup>En este paso era extremadamente importante que la mica siempre estuviese cubierta por el tampón.

min se realizó un lavado introduciendo el disco de mica-Teflón® en un tapón con 800  $\mu$ l de tampón PME, se insertaba el tubo y se dejaba curar *overnight* a 4 °C.

## 11.9. Entrecruzamiento de las muestras en AFM

En casi todas las muestras analizadas mediante AFM en esta tesis no ha sido necesario realizar ningún tipo de fijación. No obstante, en los casos especificados en los resultados se realizó entrecruzamientos químicos. El procedimiento utilizado era similar al que se utilizó para TEM (sección 10.7.1). Después de extender y lavar la muestra se realizaba un cambio de medio que contenía glutaraldehído al 2.5% (los cambios de medio se realizaban del mismo modo que en los lavados) y se dejaba reaccionar durante 10 min a RT. Al final se lavaba la muestra para eliminar el exceso de glutaraldehído.

## 11.10. Secado de las muestras en AFM

La mayoría de las imágenes obtenidas en AFM se realizaron en medio líquido, pero en algunos casos se obtuvieron imágenes de contacto en seco para tratar de incrementar la resolución.

El proceso de deshidratación se realizaba después de un entrecruzamiento con glutaraldehído para preservar la estructura de la cromatina. Se hacían 6 lavados con 1 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ. Se colocaba el disco de mica-Teflón® inclinado y se deslizaba el líquido lentamente para no arrastrar el material adsorbido en la mica. Se eliminaba el exceso de H<sub>2</sub>O MilliQ con papel Whatman, haciéndolo contactar por un extremo de la mica, y finalmente se secaba cuidadosamente con un flujo de argón.

## 11.11. Obtención de imágenes en AFM

Se utilizaron los tres microscopios indicados en la sección 11.1. La adquisición de las imágenes se realizó a través del *software* con el que se controlaba el microscopio. En el caso de los microscopios Veeco se utilizó el programa Nanoscope 5.0. El microscopio MFP 3D-BIO utilizaba la implementación MFP 3D (Asylum Research) instalada sobre el programa Igor Pro 5.0 (WaveMetrics).

Las imágenes se tomaban a 512 líneas y 512 píxeles por línea en todos los microscopios. Generalmente se obtuvo la imagen topográfica y la imagen de amplitud, pero en algunos casos también se registró la imagen de fases (imágenes no mostradas en el trabajo). Las imágenes registradas en líquido se obtuvieron con AM-AFM *mode* y en algún caso en *contact mode* (sección 16.3). También se obtuvieron imágenes en seco (sección 16.6). Todas las imágenes del apartado de LFM (microscopio *Dimension* 3100) se obtuvieron con *contact mode* en líquido.

# Capítulo 12

## AFS y LFM para el estudio de las placas de cromatina

*En esta tesis se ha realizado una aproximación biofísica al estudio de las placas con la idea de obtener información de las propiedades mecánicas de la cromatina compacta. Algunas de las metodologías empleadas se han utilizado muy poco en Biología Molecular pero son muy útiles en los estudios de ciencias de materiales.*

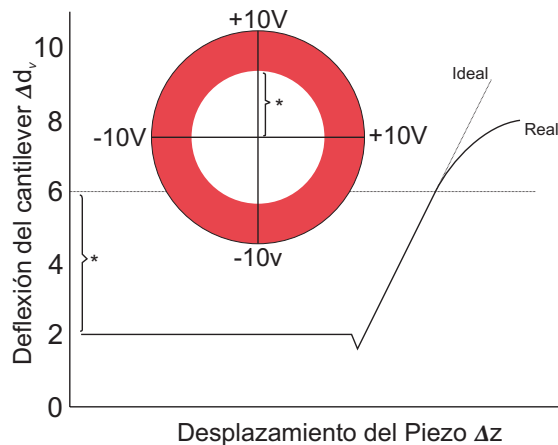
### 12.1. AFS: Nanoindentación

La nanoindentación (sección 6.3.1) es una potente herramienta para el estudio de las propiedades elásticas y mecánicas en materiales diversos. Para poder realizar estos estudios es necesario obtener una curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  a partir de la cual se puede extraer información del comportamiento biomecánico de las placas. El material utilizado en este apartado provenía de una diálisis en solución (sección 9.5.2) que posteriormente había sido tratado mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6). Se realizaron nanoindentaciones de placas en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM y 20 mM.

#### 12.1.1. Calibración vertical de al punta

En AFM se puede considerar que un *cantilever* tiene un comportamiento flexible y elástico siempre que  $\Delta d_v$  esté en un rango de valores moderado, ya que a valores elevados pueden ocurrir desviaciones. La deflexión se monitoriza a través de un láser que se refleja sobre un fotodetector, que tiene un zona de trabajo lineal definida, como muestra la Figura 12.1. La fuente de error más común suele ser debida a que el láser se refleja en la zona no lineal del fotodetector, la zona alejada del centro.

Hay diferentes métodos para medir experimentalmente la constante de fuerza vertical ( $k_v$ ) del *cantilever* en AFM. La calibración vertical de cada una de las puntas utilizadas se realizó mediante el método de *thermal noise* (Florin et al., 1995)



**Figura 12.1: Sensibilidad del detector en AFM.** Las curvas  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  se suelen utilizar para determinar el rango en el que el fotodetector tiene un comportamiento lineal, típico de un muelle ideal de acuerdo con las leyes de Hooke. El fotodetector imaginario con un rango de  $\pm 10V$  en el eje vertical y horizontal es lineal en la región  $\pm 6V$ . Si asumimos que hay una simetría radial, la zona no lineal es la zona roja del fotodetector; la zona lineal en el eje vertical positivo está marcada con un (\*) tanto en el fotodetector como en la curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$ . No se debe trabajar en la zona roja del fotodetector. Figura adaptada de Oncins (2007).

en un microscopio de fuerza atómica MFP 1D (Asylum Research). Este método está basado en el espectro térmico del *cantilever*, el cual es aproximadamente un oscilador armónico (Drobek et al., 2001; Stark et al., 2001). Una vez se han determinado los parámetros del espectro térmico, la constante del *cantilever* se puede obtener a partir del teorema de equipartición:

$$\Delta F = \sqrt{\frac{4k_b T B k_v}{\omega_0 Q}} \quad (12.1)$$

Donde  $\Delta F$  es la amplitud RMS de la vibración de la palanca a su frecuencia de resonancia,  $k_b$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $B$  es la medida del ancho de banda,  $\omega_0$  es la frecuencia de resonancia libre del *cantilever* y  $Q$  es un factor relacionado con la anchura del pico de resonancia (Oncins, 2007). El valor de  $k_v$  obtenido varía bastante en función de la posición del láser en el *cantilever* y del tipo de medio (líquido, aire o vacío) en el cual se realizan las medidas (Maali et al., 2005).

### 12.1.2. Adquisición de curvas $\Delta d_v$ vs. $\Delta z$

En la realización de los experimentos de indentación de las placas se utilizó el microscopio *Multimode*. Este microscopio nos permite obtener imágenes topográficas para localizar las placas de cromatina y posteriormente realizar curvas de fuerza de forma localizada. Para realizar este tipo de medida se ha de operar el microscopio en el modo de “curvas de fuerza”. En este modo el sistema de *feedback* [que en los otros modos (AM-AFM y *contact mode*) mantiene constante  $\Delta d_v$ ] está desconectado, lo que permite mover el *cantilever* a lo largo del eje  $z$  mientras se registra  $\Delta d_v$ . Se utilizaron *cantilevers* triangulares de 100  $\mu\text{m}$  de largo. Previamente a la realización de las indentaciones sobre cromatina, se obtenían curvas de fuerza sobre mica en el mismo tampón para determinar la *sensitivity* vertical ( $S_v$ ), definida como:

$$S_v = \frac{\Delta d_v}{\Delta z} \quad (12.2)$$

$S_v$  (V/nm) es la pendiente en la región de contacto de una curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  obtenida sobre una superficie extremadamente menos elástica que el *cantilever*. En este sistema todo movimiento en  $z$  es proporcional a la deflexión real de la punta ( $d$ ; en nm), que es detectada como un voltaje por el fotodetector.

## 12.2. LFM: Nanotribología

La Nanotribología ha sido una potente herramienta para la ciencia de superficies de materiales duros y actualmente se están desarrollando aplicaciones de esta metodología para materiales blandos y biológicos (Torrent-Burgués et al., 20XX). Para poder extraer datos de  $F_f$  y del coeficiente de fricción se ha de tener un diseño experimental que nos permita obtener datos cuantitativos de  $F_f$  y  $F_v$  simultáneamente sobre la misma zona de estudio. Esto hace que la configuración básica de un AFM tenga que ser implementada para realizar experimentos de LFM. Los experimentos de Microscopia de Fuerza Lateral o de Fuerza de Fricciones se realizaron en colaboración con Gerard Oncins del Servei de Tècniques Nanomètriques de los Serveis Científic-Tècnics de la UB (SCT-UB) en el Parc Científic de Barcelona (PCB).

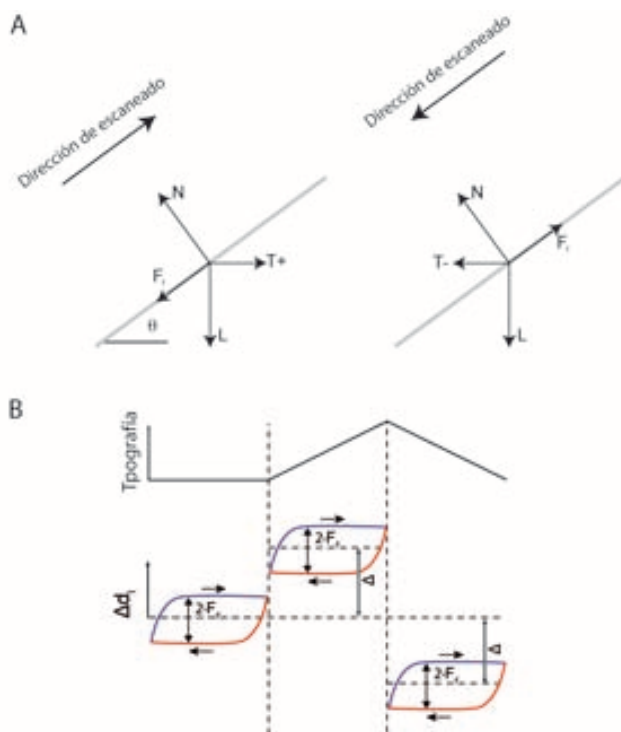
### 12.2.1. Calibración lateral del punta

Para poder obtener valores cuantitativos de la  $F_f$  existente entre la punta y las placas de cromatina fue necesario encontrar la constante lateral del *cantilever* ( $k_l$ ) y la *sensitivity* lateral ( $S_l$ ; sección 6.4.2). Existen diferentes métodos (Green et al., 2004; Liu et al., 1996; Cain et al., 2000). El método desarrollado por Ogletree et al. (1996) en el grupo de Miquel Salmeron es conocido como *wedge calibration method*, el cual es el más utilizado actualmente. Este método es el que se ha utilizado para calibrar lateralmente los *cantilevers* utilizados en esta tesis (Oncins, 2007). Este

método está basado en la determinación de la fuerza vertical y la fuerza de fricción en una superficie inclinada. La fuerza de fricción se produce al deslizar la punta sobre la superficie inclinada y se mide la señal de fricción a medida que incrementamos la  $F_v$  sobre la superficie.

Cuando la punta contacta con la superficie, a medida que se esta moviendo por la rampa, la  $F_f$  se puede descomponer en dos contribuciones perpendiculares, la fuerza de carga ( $L$ ) y la de tracción ( $T_+$  o  $T_-$ ). Dependiendo de la dirección del movimiento, estas fuerzas están contrarrestadas por la superficie, la cual aplica una fuerza normal ( $N$ ) paralela al eje de la punta ( $F_v$ ) y una  $F_f$  perpendicular a la  $F_v$  (ver Figura 12.2) y opuesta a  $T$ . Este equilibrio es válido sólo cuando los dos cuerpos se desplazan uno respecto al otro, ya que en una fricción estática  $T \ll F_f$  y por lo tanto no hay movimiento relativo de los cuerpos. Este equilibrio se define como:

$$\begin{aligned} F_v &= L \cos \theta \pm T_{\pm} \sin \theta \\ F_f &= T_{\pm} \cos \theta \pm L \sin \theta \end{aligned} \quad (12.3)$$



**Figura 12.2: Balance de fuerzas de fricción implicadas en el *grid* de calibración.** (A) Balance de las fuerzas cuando la punta escanea una superficie inclinada de subida (derecha) y de bajada (izquierda). (B) Loops esquemáticos de fricción sobre una superficie con diferentes inclinaciones (la imagen superior muestra la topografía escaneada) en los que se muestra el valor de  $\Delta d_l$ . La anchura del loop de fricción ( $2 \cdot F_f$ ) es independiente del ángulo de la superficie escaneada, por el contrario el *offset* del loop ( $\Delta$ ) de fricciones varía mucho en función de la inclinación. Los valores de  $2 \cdot F_f$  y  $\Delta$  se miden en un rango de  $F_v$  sobre una superficie de inclinación conocida para calibrar la respuesta de fuerza lateral del *cantilever*. Figura adaptada de Ogletree et al. (1996).

Donde  $\theta$  representa la inclinación del pendiente. El valor de  $T_{\pm}$  es proporcional a  $\Delta d_l$ , siendo la *sensitivity* lateral ( $S_l$ ), expresada en  $N/V$ , el factor de proporcionalidad:

$$T = S_l d_l \quad (12.4)$$

Una vez conocido el valor de  $S_l$  se puede determinar la fuerza de fricción  $F_f$  a partir de:

$$2F_f = 2F_{f0} \cdot S_l \quad (12.5)$$

Donde  $2F_f$  es la anchura del *loop* de fricción y el valor de  $F_{f0}$  es el obtenido experimentalmente en V con el fotodetector.

Cuando  $F_f$  es linealmente dependiente de la  $F_v$ , la adhesión ( $F_A$ ) se suele tratar como una fuerza constante y aditiva a  $F_v$ :

$$F_f = \mu(F_v + F_A) \quad (12.6)$$

Donde  $\mu$  es el coeficiente de fricción.

Para la calibración de nuestros experimentos se utilizó una rejilla de calibración de SiO<sub>2</sub> modelo TGG01 ( $\mu$ Masch), con unas crestas de 1.8  $\mu$ m de altura, una distancia de 3  $\mu$ m entre picos y un vértice con un ángulo de 70°.

Hay diversos factores que pueden modificar la calibración lateral. La  $S_l$  depende de la posición del láser en la parte trasera del *cantilever* y de su reflexión en el fotodetector. La mayoría de fotodetectores que podemos encontrar en un AFM comercial tienen una cierta deriva física a lo largo de cada uno de los ejes, con lo que el movimiento del láser en el eje  $x$  conlleva a un movimiento en el eje  $y$  asociado. Este efecto puede provocar un desalineamiento entre el paso del láser y el fotodetector y en consecuencia una descalibración del *cantilever*. Cualquier movimiento del fotodetector implica un desajuste de la calibración. Por lo tanto, una vez que la punta está calibrada lateralmente, no se puede hacer nada que modifique el paso del láser o la posición de la punta. De lo contrario, se obtendrían datos de fricción erróneos.

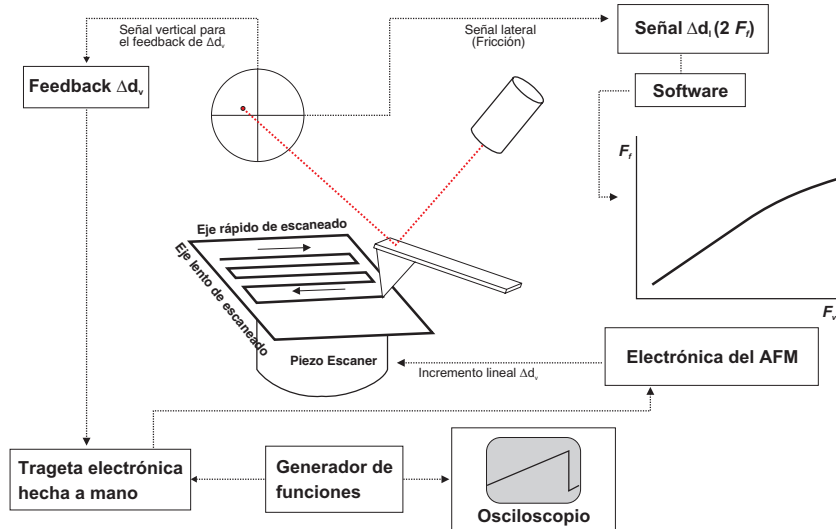
### 12.2.2. Obtención de la curva $F_f$ vs. $F_v$

Para determinar el valor cuantitativo de  $\mu$  se obtuvieron curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$ . Este tipo de curva se consigue aplicando una  $F_v$  cada vez mayor a medida que se registran simultáneamente los valores  $F_f$ . Para poder realizar un experimento de LFM es necesario implementar un AFM comercial básico (ver componentes en la sección 11.1), en la Figura 12.3 se muestra el esquema experimental que se utilizó para obtener las curvas  $F_f$  vs.  $F_v$  con el microscopio *Dimension 3100*.

Para obtener las medidas de fricción vs. fuerza vertical se utilizó una onda ascendente generada por un generador de funciones externo (Agilent Technologies) que se restaba a la señal ( $\Delta d_v$ ) del fotodetector a través de un módulo de acceso de señales (Digital Instruments) utilizando una tarjeta fabricada específicamente para estos experimentos<sup>1</sup>. El voltaje resultante se reinsertaba a la señal del fotodetector

<sup>1</sup>Esta tarjeta nos permite integrar la señal del generador de funciones al módulo de acceso de señales.

vertical a través del módulo de acceso de señales, esto permitía que el *feedback* de control mantuviese un incremento lineal de  $F_v$  a medida que se iba realizando el experimento de  $F_f$  vs.  $F_v$ . Al restar una onda lineal creciente a la señal  $\Delta d_v$  se producía una variación del *setpoint* de referencia, de manera que el piezoeléctrico se extendía para contrarrestarlo, provocando una mayor fuerza vertical.



**Figura 12.3:** Esquema experimental de LFM para obtener curvas  $F_f$  vs.  $F_v$ . A medida que la punta escanea la muestra a una cierta fuerza  $F_v$ ,  $\Delta d_v$  se va procesando. Al mismo tiempo el *feedback* de la electrónica va controlando  $\Delta d_v$  después de ser manipulada (ver texto), para ser devuelto al piezo escáner.

Para que las medidas de fricción sean comparables el área y la frecuencia de escaneo han de ser siempre las mismas. Por esta razón siempre se realizaban escaneos de 300 nm de lado a 6.1 Hz con 512 líneas y 512 píxeles por línea. Como resultado se obtenía una curva de  $F_f$  vs.  $F_v$  de una baja fuerza a una alta fuerza vertical cada 84 s.



## Capítulo 13

# Desnaturalización de las placas en AFM y LFM

*Partiendo de la hipótesis de que las placas son un elemento estructural básico del cromosoma metafásico y que en consecuencia deberían estar compuestas de cromatina, se realizaron diversos tratamientos de desestructuración de las placas con diferentes agentes desnaturizantes elegidos especialmente para demostrar esta hipótesis. La idea central era tratar de inferir la composición de las placas ampliamente observadas por nuestro grupo y en el transcurso de esta tesis doctoral, a partir del estudio de los efectos causados por los diferentes agentes desnaturizantes sobre las propiedades de las placas analizadas mediante AFM y LFM.*

### 13.1. Agentes desnaturizantes

Los agentes desnaturizantes utilizados fueron:

**EDTA:** Se utilizó una solución madre 400 mM EDTA, 5 mM Pipes pH 7.2.

**NaCl:** Se utilizó una solución madre 4 M NaCl, 5 mM Pipes pH 7.2.

**Pronasa:** La pronasa (Roche) es un coctel de endo- y exoproteasas no específicas procedente de *Streptomyces griseus* que generalmente digiere las proteínas hasta llegar a aminoácidos. Se pesaba aproximadamente 1 mg pronasa y se guardaba a 4°C en los tubos de 1.5 ml con tapa roscada (sección 10.5.1) para que no se hidrataran. Cuando se tenían que utilizar se añadía PMC<sup>1</sup> para tener una concentración final de pronasa 1 mg/ml. Esta solución se preparaba al justo antes de ser usada y se mantenía en hielo para evitar al máximo la autoproteólisis.

---

<sup>1</sup>El tampón PMC contiene Ca<sup>2+</sup> 1 mM ya que algunas proteasas como es el caso de la proteinasa K requieren este ion para su actividad (ver Tabla 9.1; pág. 72).

**Tripsina:** Se pesaban alícuotas aproximadamente 1 mg de tripsina (Sigma) en los tubos indicados en el apartado anterior y se mantenía a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Justo antes de su utilización, se disolvía en PMC para tener una concentración final de 1mg/ml.

**Nucleasa micrococcal:** Se disolvía en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ la nucleasa micrococcal (MNasa; Sigma) necesaria para tener una concentración final 1 mg/ml y se guardaba a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para poder comparar experimentos en días diferentes, se determinó la actividad de las disolución de MNasa antes de cada experimento (ver sección siguiente). Antes de realizar la desnaturalización, se diluía el volumen necesario de MNasa en PMC y se guardaba en hielo hasta ser utilizada.

### 13.2. Cálculo de actividad de la nucleasa micrococcal

La actividad de la MNasa se determinaba midiendo la hipercromicidad a 260 nm provocada por la degradación del DNA de doble cadena al ser digerido (Cuatrecasas et al., 1967). El análisis de la actividad se realizaba con DNA de timo de ternera (Sigma) a una concentración  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  disuelto en Tris-HCl 10 mM pH 8.8. Se colocaba 1 ml de la solución de DNA en la cubeta del espectrofotómetro Cary 400 Bio (Varian). Acto seguido, se colocaban  $5\ \mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  1M y  $1\ \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  1 M (la MNasa es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente), se introducía la cubeta en el espectrofotómetro y se dejaba atemperar al menos unos 30 s para que el volumen de reacción llegara  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez atemperado se introducían  $5\ \mu\text{l}$  de MNasa diluida 1/100 en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, se mezclaba rápidamente con ayuda de una micropipeta y se realizaba una cinética de 3 min. Este proceso se repetía con 10 y 15  $\mu\text{l}$  de MNasa diluida. En todos los casos la cinética tenía un incremento de la absorción respecto al tiempo; a partir de la zona lineal podíamos determinar la actividad aplicando:

$$\text{Actividad}(AU) = \frac{A_{m\acute{a}x} - A_{m\acute{i}n}}{tV} \quad (13.1)$$

Donde,

$A_{m\acute{a}x}$ :  $A_{260}$  máxima dentro de la zona lineal escogida.

$A_{m\acute{i}n}$ :  $A_{260}$  mínima dentro de la zona lineal escogida.

$t$ : Tiempo (en min) transcurrido en la zona escogida.

$V$ : Volumen (en  $\mu\text{l}$ ) de MNasa diluida 1/100 añadidos en el ensayo.

### 13.3. Desnaturalización en tiempo real

Se realizó un seguimiento en el tiempo del efecto de los diferentes agentes descritos en la sección 13.1 sobre las placas de cromatina. Estos experimentos se llevaron a cabo en el microscopio MFP 3D-BIO con AM-AFM *mode*.

Se partía de material procedente de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), que fue dializado (sección 9.5.2), tratado mecánicamente (sección 9.6) y posteriormente se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.7.1).

La idea era monitorizar la desnaturalización de las placas de cromatina debido al efecto de los diferentes agentes desnaturalizantes. Se añadía el agente mientras la punta iba escaneando la muestra para poder seguir el proceso de desnaturalización en tiempo real.

Una vez se tenía una placa localizada, como referencia de estabilidad, se realizaban varias imágenes topográficas en la misma zona con la misma magnificación. Acto seguido se eliminaba cuidadosamente una parte del volumen con ayuda de una punta de micropipeta fina y alargada para cargar geles electroforéticos. En algunos casos el agente desnaturalizante se añadió sin eliminar volumen de tampón. Finalmente, se añadía un volumen con extremo cuidado debido a que una aplicación demasiado rápida del tampón o el contacto fortuito de la pipeta con el *holder* del microscopio podía provocar la deslocalización de la placa en estudio. El volumen de tampón eliminado y el volumen de agente reañadido era variable en función de cada muestra (ver capítulo 19 para más detalles). El proceso de eliminación y/o adición podía repetirse varias veces en una misma serie. El volumen de tampón que contenía la muestra después de la extensión y los lavados (sección 11.8.2) era aproximadamente 60–80  $\mu\text{l}$ . Se adquirían imágenes topográficas consecutivas a lo largo del tiempo<sup>2</sup> observando la evolución de la estructura.

### 13.4. Análisis de fricción en presencia de agentes desnaturalizantes

Se estudió el comportamiento mecánico de fricción (ver sección 12.2) de placas nativas (en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM y 20 mM) y después de la desnaturalización provocada por diferentes agentes sobre la misma muestra. Se partía de material procedente de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), dializado (sección 9.5.2) y tratado mecánicamente (sección 9.6) que posteriormente se adsorbía sobre mica recién exfoliada (sección 11.7.2). El análisis de fricción se realizó con el microscopio *Dimension* 3100.

---

<sup>2</sup>Generalmente se tomaba como  $t=0$  el momento en el que se añadía el agente desnaturalizante después del control de estabilidad.

### 13.4.1. Adición

En los experimentos de fricción, la adición de agentes desnaturalizantes normalmente no se realizó mientras la punta escaneaba la muestra (excepto en algún caso en el que se indicará específicamente). Generalmente se obtenían curvas  $F_f$  vs.  $F_v$  sobre una muestra en condiciones nativas. Posteriormente se separaba la punta de la superficie<sup>3</sup>, se realizaba la eliminación de una parte del volumen de tampón y se añadía el volumen adecuado del agente desnaturalizante. Una vez introducido el nuevo volumen se mezclaba con extremado cuidado con la misma micropipeta para tratar de homogeneizar la solución.

### 13.4.2. Cambio de medio

Para controlar mejor la concentración de los agentes desnaturalizantes, se realizaron cambios de medio directamente sobre la muestra adsorbida sobre mica. Generalmente se obtenían curvas  $F_f$  vs.  $F_v$  sobre una muestra en condiciones nativas. Posteriormente se extraía la muestra del microscopio y se realizaba un cambio de medio con un procedimiento similar al realizado en los lavados (ver sección 11.8.2), eliminando el tampón y añadiendo la solución con la concentración adecuada del agente desnaturalizante. Finalmente, se reintroducía la muestra en el microscopio y se obtenían curvas  $F_f$  vs.  $F_v$  sobre las placas.

---

<sup>3</sup>La muestra no se sacaba del holder del microscopio, de manera que la punta nunca dejaba de estar en contacto con el líquido para evitar que se descalibrara (sección 12.2.1).

## Capítulo 14

# Procesamiento de las imágenes y tratamiento de los datos

### 14.1. Procesamiento de las imágenes de TEM

Las imágenes obtenidas seguían un procesamiento informático en mayor o menor grado dependiendo de la procedencia. En el caso de las imágenes obtenidas mediante fotografía convencional, los negativos se digitalizaron en un escáner G5-700 Imaging densitometer (Biorad Laboratories) a una resolución de 600 ppi. Las imágenes se guardaron en el formato TIFF (Tagged Format File Format). Las imágenes digitalizadas se procesaban mediante los programas Photoshop™ CS2 y PhotoStyler® 2.0. En el caso de las imágenes obtenidas con las cámaras digitales, se realizaba una inversión (para tener una imagen en forma de negativo). Finalmente se añadían las barras de calibración a las imágenes y se montaban las figuras utilizando el programa Corel Draw™ 11 y X3 .

#### 14.1.1. Determinación de alturas

Uno de los objetivos de este trabajo era determinar la altura de las placas extruídas de cromosomas. Para ello se realizó un sombreado unidireccional (sección 10.9.1) de tal manera que se podía determinar la altura conociendo el ángulo de platinación y la longitud de las sombras. La determinación de la longitud de las sombras se realizó a partir de las imágenes tomadas con la cámara digital y utilizando el programa MetaMorph® 5.0r1 (Universal Image Corporation). Éste programa está diseñado para parametrizar imágenes previamente calibradas con el propio programa haciendo uso de referencias de la propia imagen.

La determinación de la altura de las placas se efectuó mediante el uso de esferas de látex ( $\sim 90$  nm de diámetro; Balzers Union) como referencia interna. Después del lavado final (ver sección 10.8), se añadían 10  $\mu$ l de una suspensión que contenía

$5 \times 10^9$  bolas/ml durante 5 min sobre las rejillas. Finalmente se realizaba un lavado de 5 min en 4 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q en el interior de las cámaras descritas en la sección 9.5.1.

Las partículas de látex son esferas perfectas. Por lo tanto, se puede considerar que el diámetro es igual a la altura y el ángulo de platinado de la esfera se puede calcular a partir del diámetro y la longitud de la sombra tomada desde el centro de la esfera hasta el final de la sombra (Bermudez, 1994; Caravaca, 2004, ver Figura 14.1A). Teniendo en cuenta esta consideración podemos decir que,

$$\tan \alpha_{ap} = \varnothing / L \quad (14.1)$$

Dónde:

$\tan \alpha_{ap}$ : Tangente del ángulo de platinación (ver Figura 14.1A).

$\varnothing$ : Diámetro y altura de la esfera de látex platinada ( $\overline{AC}$  en Figura 14.1A).

$L$ : Longitud de la sombra ( $\overline{AB}$  en Figura 14.1A).

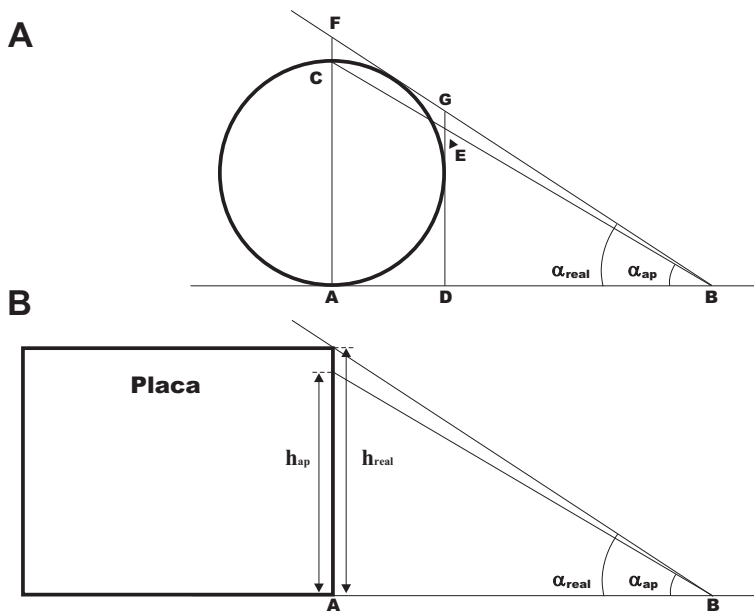
Mediante el valor de  $\tan \alpha_{ap}$  (determinado a partir de una o varias esferas de látex) y el valor de las sombras de las placas (ver Figura 14.1B), se puede determinar la altura de las placas cercanas a las esferas de látex con la siguiente expresión:

$$h_{ap} = \tan \alpha_{ap} \cdot L_p \quad (14.2)$$

$h_{ap}$ : Altura aparente de la placa (ver Figura 14.1B).

$L_p$ : Longitud de la sombra de la placa ( $\overline{AB}$  en Figura 14.1B).

Siempre que era posible, se realizaban mediciones en diferentes puntos a lo largo de una misma placa y se calculaba la altura media. Los valores obtenidos mediante el análisis de ( $h_{ap}$ ) no se corresponden con los valores de altura real de las estructuras platinadas ( $h_{real}$ ; ver Figura 14.1B). Debido a problemas geométricos de la platinación de las esferas de látex, los valores de  $\alpha_{ap}$  obtenidos deberían ser modificados mediante un factor de corrección para poder obtener  $\alpha_{real}$ . No obstante, se decidió no aplicar el factor de corrección a los datos, porque tal como se había observado previamente (Caravaca, 2004) el factor de corrección no modificaba significativamente el valor de los datos (su contribución era inferior a la desviación estándar). La representación de los datos en forma de histograma se realizó con el programa Sigmaplot® 8.0.



**Figura 14.1: Determinación de la altura de un placa.** (A) Representación gráfica de la recta tangente aparente y real de una esfera. (B) Representación de una placa. Con el ángulo de inclinación aparente obtenido a partir de una esfera ( $\alpha_{ap}$ ), se puede determinar la altura aparente de las placas ( $h_{ap}$ ) que es ligeramente inferior a la altura de las placas ( $h_{real}$ ). Figura adaptada de Caravaca (2004).

## 14.2. Procesamiento de las imágenes de AFM

Las imágenes que se obtienen de un AFM rara vez pueden utilizarse directamente. Normalmente se les ha de aplicar diferentes filtros en función de cada imagen debido a desviaciones y/o tendencias que producen artefactos al escanear la muestra. Los filtros que se utilizaron usualmente eran:

**Flatten:** Se utiliza para eliminar artefactos debidos a una deriva vertical ( $z$ ) del escáner, pendiente de la imagen, protuberancias o cualquier cosa que pueda alterar el patrón de la imagen entre las diferentes líneas de escaneado. El *flattening* modifica la imagen línea a línea. Consiste en eliminar la salida vertical entre las líneas en la dirección rápida del escaneado mediante la aplicación de un polinomio (de orden 0, 1, 2 ó 3) que es ajustado y restado a cada línea. Normalmente, si tenemos cuerpos muy grandes y de altura considerable se han de proteger o enmascarar antes de realizar el *flattening*.

**Planefit:** Comúnmente se utiliza para eliminar ángulos de inclinación y la curvatura de la imagen tomada como un global (también posee los mismos órdenes que

en el caso del *flatten*).

**Erase scan lines:** Elimina líneas en la imagen debido a saltos o arrastramiento de material con la punta. Este proceso elimina la línea seleccionada por el promedio de las dos adyacentes.

Normalmente los mismos programas que se utilizan para obtener las imágenes (ver sección 11.11) tienen estas rutinas implementadas. También se utilizó en algún caso el *software* WsXM (Nanotec Electrónica).

### 14.2.1. Determinación de alturas a partir de secciones topográficas

Una vez se habían procesado las imágenes, se podía realizar un análisis de la altura de las placas en solución. Para ello el *software* del microscopio también tiene una rutina que permite realizar secciones/cortes de las imágenes topográficas a lo largo de un trazo. Sobre la sección se pueden acotar puntos a partir de los cuales se obtiene el grosor de las placas. A la hora de obtener las cotas se tuvo mucho cuidado de situarlas en una posición adecuada y representativa de la placa de la cual se quería obtener el grosor. Las imágenes analizadas para obtener los datos de altura se obtuvieron con el microscopio *Multimode*. La representación gráfica de las secciones se realizó con el programa Origin Pro® 6.0 (OriginLab®) y los histogramas se realizaron con el programa SigmaPlot® 8.0.

## 14.3. Tratamiento de los datos de nanoindentación

A partir de los datos obtenidos en los experimentos de nanoindentación de las placas de cromatina (sección 12.1.2), se podían extraer los datos del comportamiento mecánico de las placas de cromatina, para extraer esta información los datos se debían manipular.

### 14.3.1. Obtención de curvas $F_v$ vs. $\Delta z$

Para saber la fuerza que ejerce la punta sobre la muestra se necesita obtener la relación entre la deflexión real del *cantilever* ( $d$ ) y  $\Delta d_v$  (i.e.  $S_v$ ; sección 12.1.2) a medida que obtenemos la curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$ . Para poder transformar  $\Delta d_v$  en  $F_v$  necesitamos saber el valor de  $k_v$  una vez calibrada la punta (sección 12.1.1).

Cuando la punta y la muestra están en contacto,

$$\Delta z = \delta + \frac{\Delta d_v}{S_v} \quad (14.3)$$

Donde  $\delta$  es la indentación. Si la muestra es muy rígida en comparación con el *cantilever*, entonces  $\delta \sim 0$  y por lo tanto:



$$\Delta z = \frac{\Delta d_v}{S_v} \quad (14.4)$$

Donde  $\Delta z=d$  (ver sección 12.1.2). Si aplicamos la ley de Hooke (ecuación 6.1),

$$F_v = dk_v$$

Entonces,

$$F_v = \frac{\Delta d_v}{S_v} k_v \quad (14.5)$$

### 14.3.2. Obtención de curvas $F_v$ vs. $\delta$

Las curvas  $F_v$  vs.  $\delta$  nos dan información acerca del comportamiento mecánico de las placas cuando las comprimimos con la punta. Las curvas  $F_v$  vs.  $\delta$  también nos permiten obtener información del comportamiento elástico y plástico de la estructura. Teniendo en cuenta que las placas de cromatina son blandas (poco rígidas) en comparación al *cantilever* de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , podemos considerar que:

$$\delta = \Delta z - \frac{\Delta d_v}{S_v} \quad (14.6)$$

Por lo tanto con esta ecuación tenemos todos los elementos para convertir una curva  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  en una curva  $F_v$  vs.  $\delta$

Las transformaciones matemáticas de los datos de  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z \rightarrow F_v$  vs.  $\Delta z \rightarrow F_v$  vs.  $\delta$  se realizaron con el programa Origin Pro® 6.0. En algunas condiciones los parámetros mecánicos de las placas se obtuvieron con el programa SPIP™ (Image Metrology), este programa nos permitía transformar los datos a  $F_v$  vs.  $\delta$ , pero solo nos permitió trabajar con parte de los puntos obtenidos en las curvas  $\Delta d_v$  vs.  $\Delta z$  con lo que los datos eran aproximados.

### 14.3.3. Determinación de alturas a partir de curvas $F_v$ vs. $\delta$

Las curvas de  $F_v$  vs.  $\delta$  también permiten extraer información de la altura, ya que en todo momento hay un control de la posición de la punta respecto a la muestra y la superficie sobre la que se ha extendido (ecuación 14.6). La altura se determinaba midiendo la distancia entre el punto en el que se establece el contacto punta-muestra y el punto en el cual la punta toca la superficie de mica.

### 14.3.4. Cálculo del módulo de Young

El módulo Young de las placas de cromatina se determinó a partir de las curvas  $F_v$  vs.  $\delta$ . Para realizar los cálculos se tomó el tramo que iba desde la zona en la que había un régimen de comportamiento elástico hasta el punto en el que se observaba

una deformación plástica de la placa (i.e. penetración brusca). Los datos del módulo de Young se ajustaron a partir de los datos experimentales de  $F_v$  y  $\delta$  mediante la ecuación de Hertz (Radmacher, 2002; ver sección 6.3.2, ecuación 6.2):

$$F_v = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^{3/2} \sqrt{R}$$

Donde  $E$  es el módulo de Young (calculado en Pascals; Pa),  $\nu$  es el coeficiente de Poisson (0.5 en nuestro caso) y  $R$  el radio de la esfera que forma el vértice de la punta ( $\sim 15$  nm, de acuerdo con el fabricante). El ajuste de los datos experimentales de  $F_v$  y  $\delta$  se realizó con el programa Origin Pro® 6.0.

El cálculo del estrés mecánico (medido en Pascals)<sup>1</sup> necesario para producir una deformación plástica de las placas, se realizó considerando que la punta tiene una forma parabólica en el vértice (de radio  $R$ ; Weisenhorn et al., 1993) y que el comportamiento elástico de las placas se ajustan al modelo de Hertz, entonces:

$$r_{par}(\delta) = \sqrt{R\delta} \quad (14.7)$$

Donde  $r_{par}$  es el radio de la superficie de la punta que contacta con la placa a medida que progresa la deformación elástica de la muestra.

Entonces, el cálculo del estrés mecánico para deformar plásticamente las placas teniendo en cuenta la ecuación 14.7 es:

$$estrés = \frac{F_{pl}}{\pi R\delta} \quad (14.8)$$

Donde  $F_{pl}$  es la fuerza a la cual se observa el comportamiento plástico de la placa de cromatina.

## 14.4. Tratamiento de los datos de LFM

A partir de los datos obtenidos en los experimentos de fricción sobre placas de cromatina (12.2.2) se pueden extraer los datos del comportamiento mecánico.

### 14.4.1. Obtención de las curvas $F_f$ vs. $F_v$

Una vez obtenidos los datos de fuerza de fricción vs. fuerza vertical en forma de archivo Nanoscope, estos se trataban matemáticamente para poder obtener curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$ . Se introducían las calibraciones tanto vertical (sección 12.1.1) como lateral (sección 12.2.1) a la curva de fuerza obtenida a partir de los datos del fotodetector. Para ello se utilizó un *script* para Matlab® (MathWorks™), proporcionado por el

<sup>1</sup>Recordemos que el estrés mecánico es la presión existente entre la placa y la punta ( $F_v/A$ ), donde  $A$  es el área de la punta que contacta con la superficie).

laboratorio de R. Carpick<sup>2</sup>, que automatiza el proceso de transformación de las curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$ .

#### 14.4.2. Determinación del coeficiente de fricción ( $\mu$ )

Para determinar el coeficiente de fricción se utilizan las curvas  $F_f$  vs.  $F_v$ . De acuerdo con la ecuación básica 6.6, sabemos que:

$$\mu = \frac{F_f}{F_v} \quad (14.9)$$

Para obtener  $\mu$  se calculaba la pendiente en la zona de contacto en la cual la fuerza de fricción incrementa linealmente con la fuerza vertical (ver Figura 20.1B, pág. 200).

---

<sup>2</sup>Web: <http://nanoprobenetwork.org/welcome-to-the-carpick-labs-software-toolbox>



## Parte III

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## Capítulo 15

# Estudios del cromosoma metafásico mediante TEM

*En el inicio de este trabajo se utilizó la microscopía electrónica de transmisión para determinar las condiciones de existencia de las placas de los cromosomas metafásicos de células HeLa. A lo largo de esta etapa se realizaron muy diversos controles y tratamientos para intentar demostrar que las placas no eran el resultado de un artefacto químico-físico producido por el método de preparación o de observación de los cromosomas. El cromosoma metafásico en condiciones aproximadamente fisiológicas está altamente compactado, lo que dificulta extremadamente su estudio si se quiere preservar al máximo su estructura interna. Debido a esta complejidad, se realizaron diferentes tratamientos y condiciones que nos permitieran analizar mejor las placas de cromatina en el interior del cromosoma metafásico compacto. Por otra parte, los estudios con TEM han permitido observar las placas con un elevado grado de resolución.*

### 15.1. Cromosomas purificados con gradiente escalonado

En la purificación de los cromosomas se utilizaron dos tipos de gradientes diferentes. En el protocolo base de purificación establecido en nuestro grupo se realizaba un gradiente escalonado (30–60 %) de sacarosa (sección 9.4.1). Para descartar la posibilidad de que la aparición de las placas estuviese causado por la presencia de sacarosa durante la preparación de la muestra, se purificaron cromosomas metafásicos en gradientes escalonados (40–70 %) de glicerol (sección 9.4.2). El material purificado provenía directamente de la extracción de los cromosomas (sección 9.3), se colocaba en el gradiente preformado y se centrifugaba (sección 9.4).

Después de realizar el proceso de purificación con gradientes de sacarosa/glicerol se podían observar cromosomas metafásicos que mantenían su integridad estructural, como se muestra en la Figura 15.1A y D. Este tipo de gradientes nos permitía

purificar los cromosomas eliminando los restos celulares y parte de la cromatina que se extraía conjuntamente con los cromosomas. Al mismo tiempo, la purificación con este tipo de gradiente provocaba una concentración de los cromosomas que facilitaba la visualización del material mediante microscopía TEM o AFM (ver capítulo 16). Sin embargo, en algunos casos los cromosomas estaban parcialmente desestructurados y presentaban extrusiones de material, en las que en muchos casos se podía observar claramente placas de cromatina imbricadas como se muestra en la Figura 15.1 (**B**, **C**, **E** y **F**). Los resultados obtenidos demuestran que la aparición de placas es independiente del tipo de gradiente utilizado.

## 15.2. Cromosomas dializados exhaustivamente en PME

Una vez se habían purificado los cromosomas (sección 9.4) se realizó una diálisis exhaustiva en solución durante 4 h (sección 9.5.2) o en rejilla (sección 9.5.1) para eliminar la sacarosa/glicerol utilizados en la formación del gradiente. Este tratamiento se realizó para demostrar que las placas no eran un artefacto debido a una elevada concentración del compuesto utilizado en la formación de los gradientes.

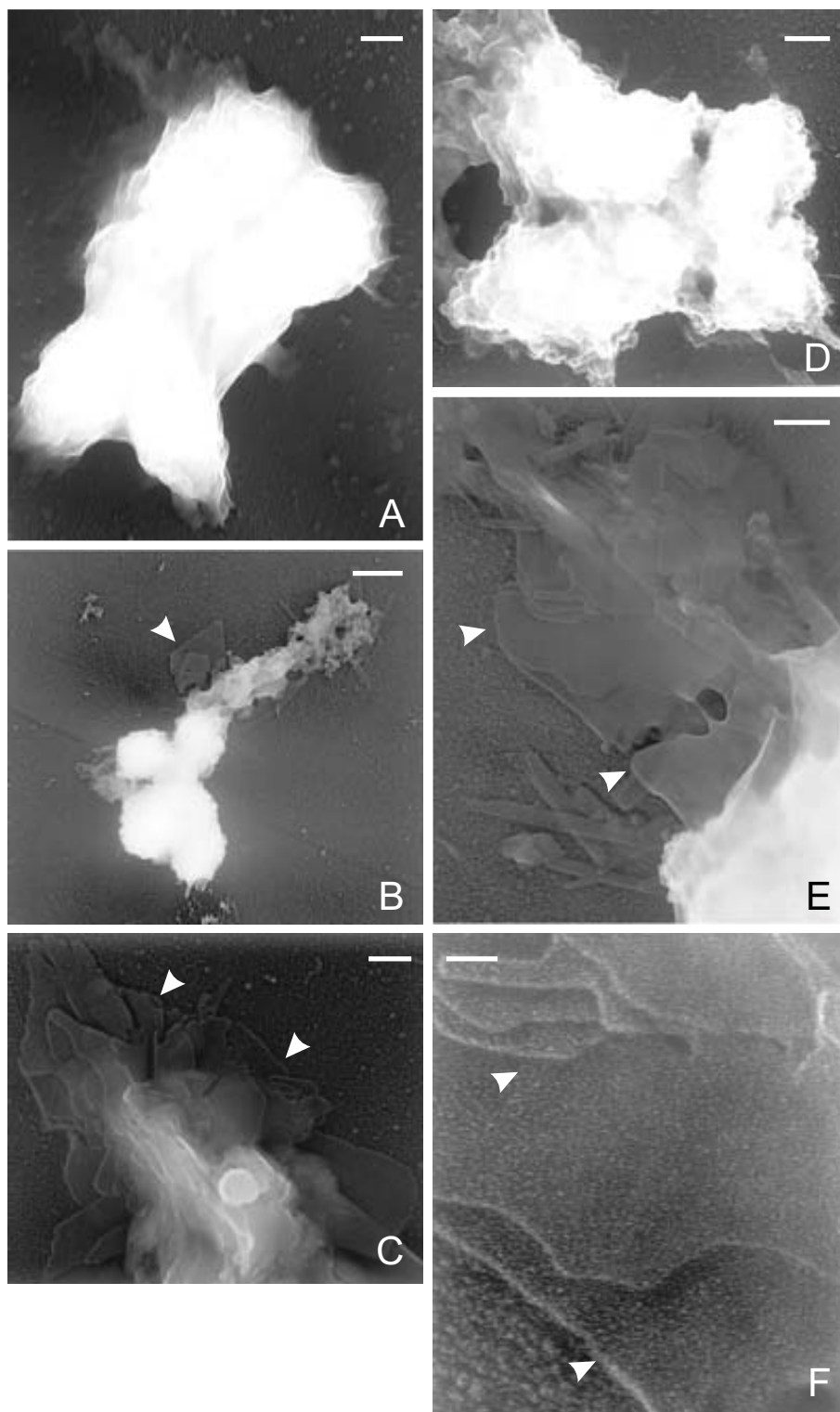
Después de la diálisis se observaban cromosomas bien formados (Figura 15.2**A**, **C–E**; pág. 128) indicando que el material mantenía la integridad estructural después de este proceso. La observación de placas perfectamente formadas, después de realizar una diálisis exhaustiva, como se puede observar en la placa asociada al cromosoma en **C** o claramente en **B** y **F**, indicaba que la presencia de placas en nuestras muestras no estaba provocado por la elevada concentración de los reactivos utilizados en la formación de los gradientes escalonados.

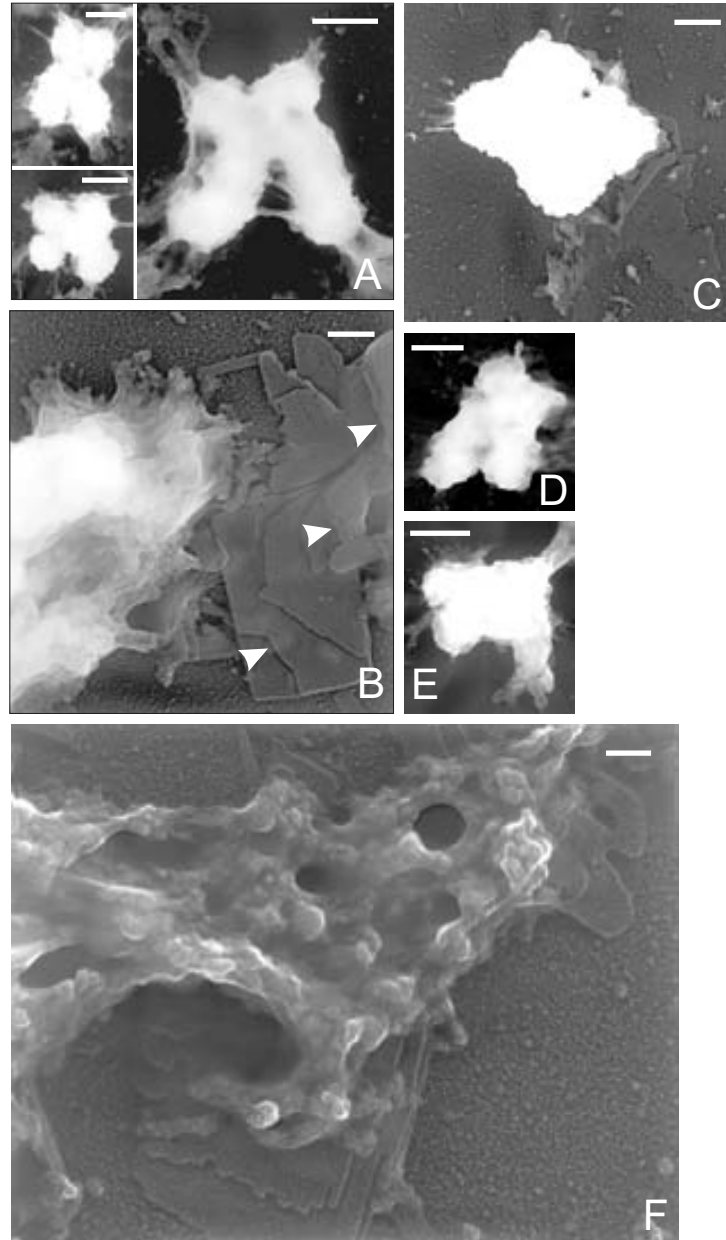
Una propiedad ampliamente observada en las placas estudiadas mediante TEM, es que tienen una gran tendencia a apilarse dando lugar a estructuras multilaminares (Figura 15.2**B**, pág. 128; ver también por ejemplo la Figura 15.1**F**). Estos resultados corroboraban la observación del material directamente después de realizar la extracción de los cromosomas en tampón PA (sin sacarosa ni glicerol; ver Figura 15.3; pág. 129) y de cromosomas a los que se les realizó un cambio de medio en PME a 37°C (ver Figura 15.4; pág. 130). Por otra parte, confirman datos experimentales obtenidos con cromosomas en diferentes condiciones realizados con anterioridad en nuestro laboratorio (Caravaca, 2004).

---

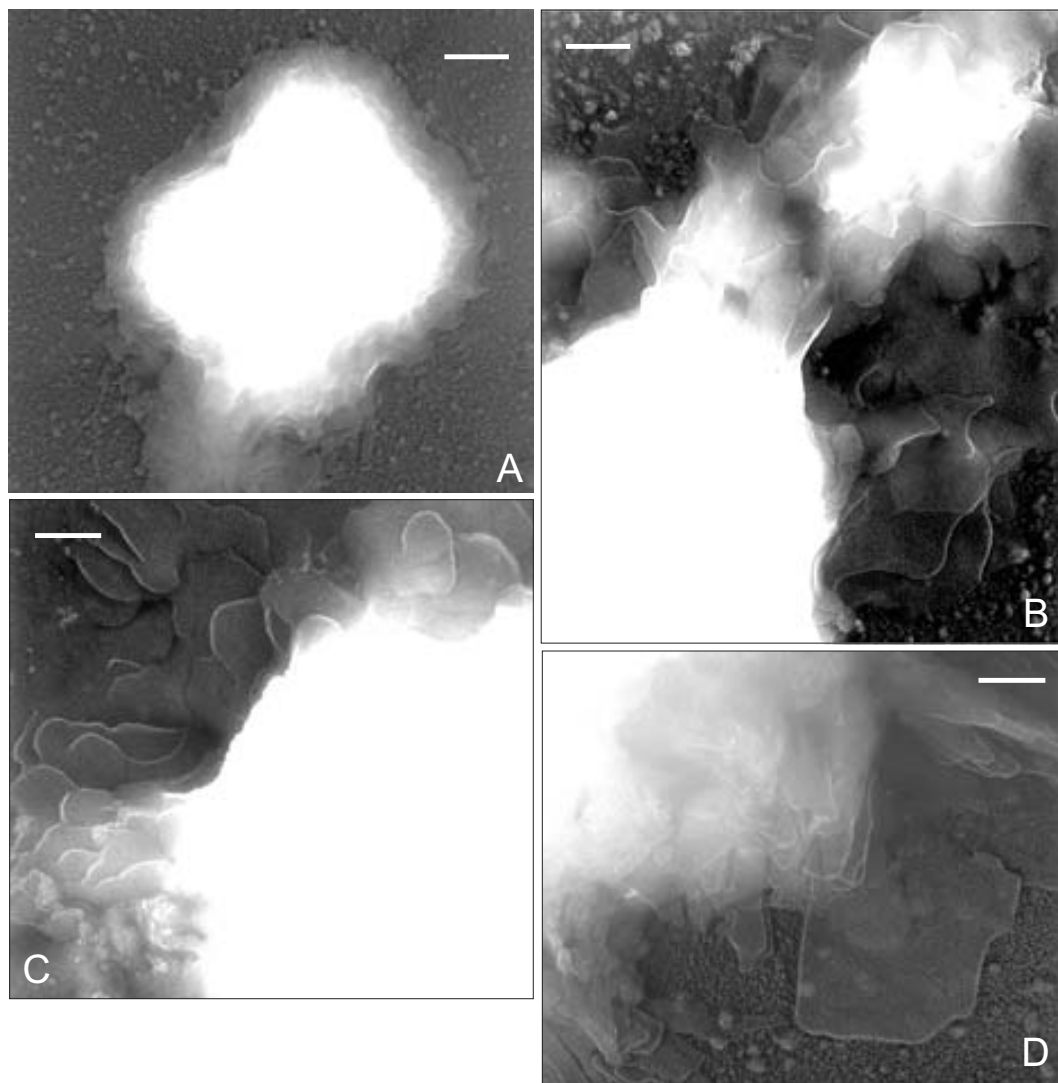
**Figura 15.1 (en la página siguiente):** Micrografías de cromosomas después de la purificación con gradiente escalonado en tampón PME. Material procedente de un gradiente de sacarosa (**A–C**) y de un gradiente de glicerol (**D–F**). (**A** y **D**) Imágenes típicas de un cromosoma metafásico compacto, en **D** se pueden apreciar claramente las cromátides y la zona centromérica. (**B** y **E**) Corresponde a una emanación de placas (indicado con flechas) de cromosomas metafásicos. (**C** y **F**) Detalle de placas de cromatina (indicado con flechas). Barras: **B** 600 nm; **A**, **C–E** 200 nm; **F** 60 nm.



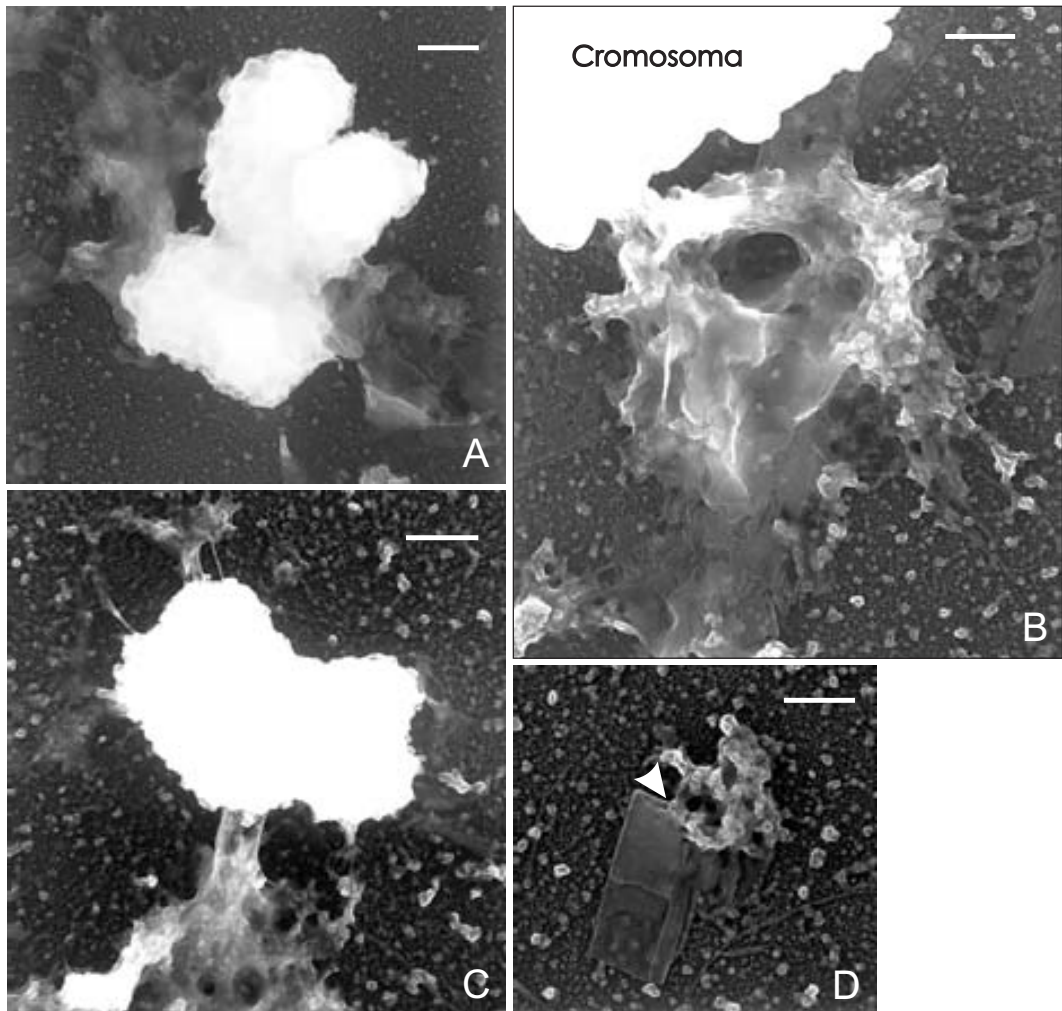




**Figura 15.2: Micrografías de cromosomas después de una diálisis exhaustiva en PME.** El material dializado procedía de un gradiente de sacarosa (A–C) o de un gradiente de glicerol (D–F). (A, B, E y F) Cromosomas dializados en solución frente a PME durante 4 h a RT (sección 9.5.2). (C y D) Cromosomas extendidos sobre rejilla y dializados durante 2h frente a PME en las cámaras (sección 9.5.1). (A, D y E) Ejemplos de cromosomas metafásicos con el típico contorno placoso. En C se puede apreciar placas por el fondo de carbono emanadas del cromosoma. (B) Emanación de placas muy bien formadas, procedentes de un cromosoma, en las que se puede apreciar la tendencia de las placas a apilarse a través de las caras dando lugar a estructuras multilaminares (indicado con puntas de flecha). (F) Magnificación de una emanación en la que se observan algunas placas. Barras: A, D y E 600 nm; B y C 200 nm; F 100 nm.



**Figura 15.3: Micrografías de cromosomas en presencia de PA.** Cromosomas procedentes directamente de la extracción en presencia del tampón PA (sección 9.3). (A) Cromosoma metafásico compacto que mantiene bastante bien la integridad estructural. En B–D se pueden ver claramente placas muy bien estructuradas emanando de los cromosomas. El tampón poliaminas es altamente estructurante y ha sido ampliamente utilizado en la extracción de cromosomas (Adolph, 1980; Gasser y Laemmli, 1987). Notar que incluso utilizando este tampón, en algunos casos, los cromosomas estaban parcialmente desestructurados. Barras: A 300 nm; B–D 200 nm.



**Figura 15.4: Cromosomas incubados en PME a 37 °C.** Después de la extracción en presencia de poliaminas (sección 9.3) se realizó un cambio de medio con PME y una incubación a 37 °C (sección 10.6.1). Las incubaciones desestructuraban parcialmente los cromosomas permitiendo estudiar con mayor facilidad su ultraestructura. Las incubaciones se realizaron durante 0.5 h (A), 2 h (B y D) y 3 h (C). (A) Cromosoma metafásico estructuralmente íntegro del que emanan placas de su interior. (B) Cromosoma en el que las placas están claramente imbricadas con cromatina de morfología granular y amorfa. En D se puede observar (indicado con una flecha) el nexa de unión entre una placa y cuerpos de 30–40 nm. Barras: C 400 nm; A, B y D 300 nm.

## 15.3. Controles realizados en TEM

Se realizaron controles adicionales para descartar que las placas estuvieran causadas por la metodología empleada en la preparación de la muestra.

### 15.3.1. Rejillas sin muestra extendida

Rutinariamente se realizaban blancos de microscopía electrónica que consistían en realizar exactamente todo el proceso a una rejilla: extensión, entrecruzamiento, lavados y deshidratación. Se hacían todos los tratamientos necesarios mimetizando el procedimiento realizado sobre las muestras, pero con la diferencia de que en las rejillas que actuaban como blanco se extendía el tampón sin la muestra.

Teniendo en cuenta que en microscopía electrónica las muestras sufren un proceso de deshidratación, podría pensarse que las placas son un producto de la cristalización de los tampones utilizados, pero los resultados obtenidos indican que éste no es el caso. En la Figura 15.5 se muestra un campo típico de un blanco, en el que no se observan placas ni formaciones cristalinas.



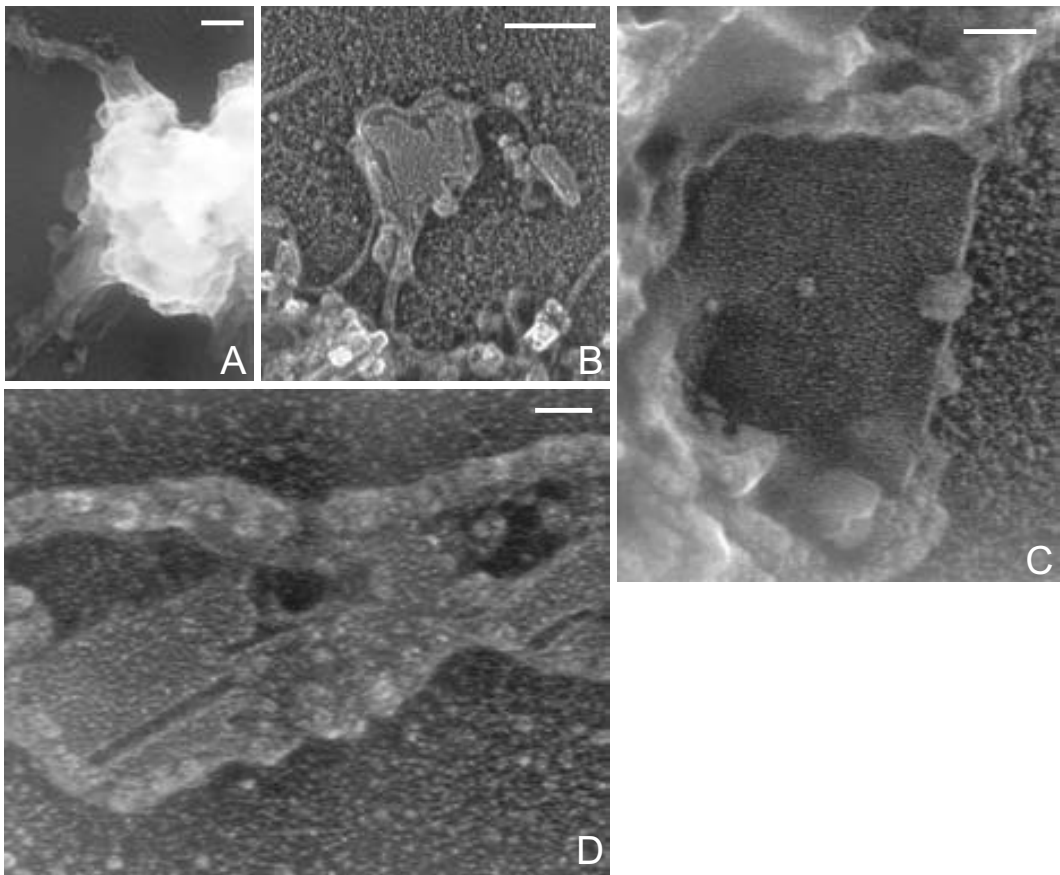
**Figura 15.5: Ejemplo de un blanco de TEM.** Este blanco corresponde a una extensión (sección 10.5.1) de tampón PME en presencia del 60 % de glicerol, seguida de una diálisis sobre rejilla (sección 9.3) a la que finalmente se le realizó un entrecruzamiento típico (sección 10.7.1) y un platinado rotacional (sección 10.9.2). Barra: 500 nm.

### 15.3.2. Rejillas sin activación con Alcian blue

El colorante Alcian blue recubre la superficie de carbono de las rejillas confiriéndole una carga positiva. Esto favorece la adsorción de la cromatina, debido a que la rejilla activada está cargada negativamente a pH fisiológico (ver sección 10.4).

El Alcian blue se utilizó de forma sistemática en todos los experimentos. Se realizaron controles en los que se extendió el material sin la activación previa con

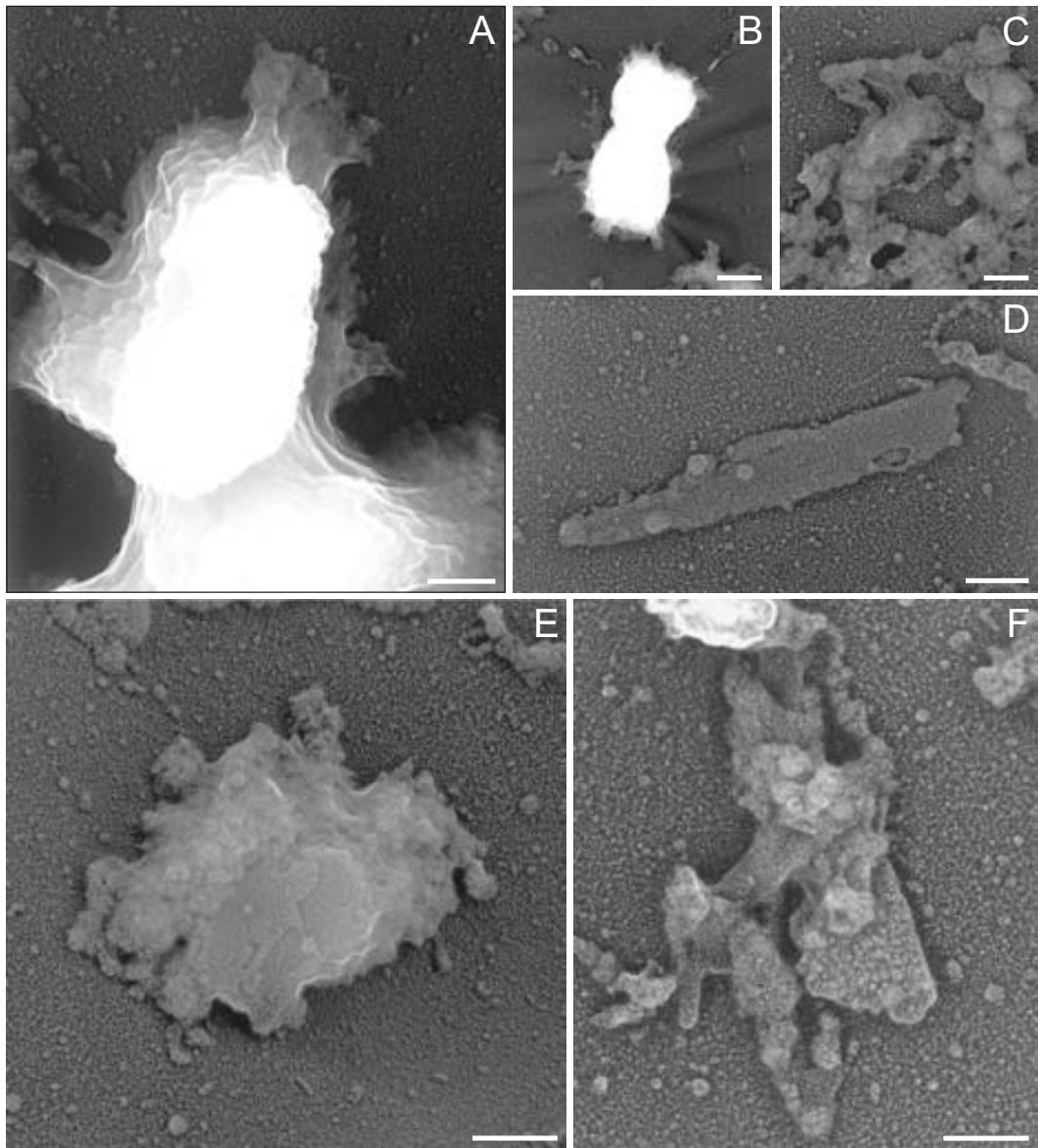
Alcian blue para determinar si era el causante de la formación de las placas. El material utilizado en esta parte del trabajo provenía de gradientes de glicerol (sección 9.4.2) al que se le realizó una diálisis en solución frente a PME (sección 9.5.2) y un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6). Los resultados obtenidos indicaban que los cromosomas extendidos sobre rejillas sin el tratamiento con Alcian blue también presentaban placas bien estructuradas, como se puede observar en la Figura 15.6. Estos experimentos demuestran que el Alcian blue no es el causante de la aparición de las placas en las muestras de microscopía electrónica.



**Figura 15.6:** Cromosomas extendidos sobre rejillas sin activación con Alcian blue. En **A** se puede observar parte de un cromosoma. (**B–D**) Placas perfectamente formadas. Barras: **A** y **B** 200 nm; **C** 100 nm; **D** 60 nm.

### 15.3.3. Cromosomas entrecruzados en solución

En la mayoría de micrografías que se obtuvieron en el apartado de microscopía TEM se realizó un entrecruzamiento de la muestra sobre rejilla (sección 10.7.1). Para poder determinar si las placas eran un elemento preexistente a la extensión, se realizó un entrecruzamiento de los cromosomas, en solución, antes de la extensión (ver sección 10.7.2). En la Figura 15.7 se pueden observar micrografías del material entrecruzado en solución. En **B** se puede observar un cromosoma bien estructurado y en **A** parte de un cromosoma que presenta un contorno claramente placoso. La observación más detallada del material encontrado por el fondo, mostraba la presencia de placas (**D** y **F**), e imbricadas con material cromatínico amorfo (**C** y **E**). La presencia de placas bien formadas, indica que estas estructuras están formadas en solución y su existencia es independiente de la extensión de la muestra sobre una superficie, como es el film de carbono de las rejillas de TEM.



**Figura 15.7: Cromatina entrecruzada en solución.** El material al que se le realizó el entrecruzamiento en solución provenía de una gradiente de sacarosa (sección 9.4.1) al que se le realizó una diálisis en solución (sección 9.5.2) y un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6). En estas muestras se omitió el proceso de entrecruzamiento en rejilla después de la extensión. Barras: B 600 nm; A, C–F 200 nm.



## 15.4. Cromosomas tratados mecánicamente

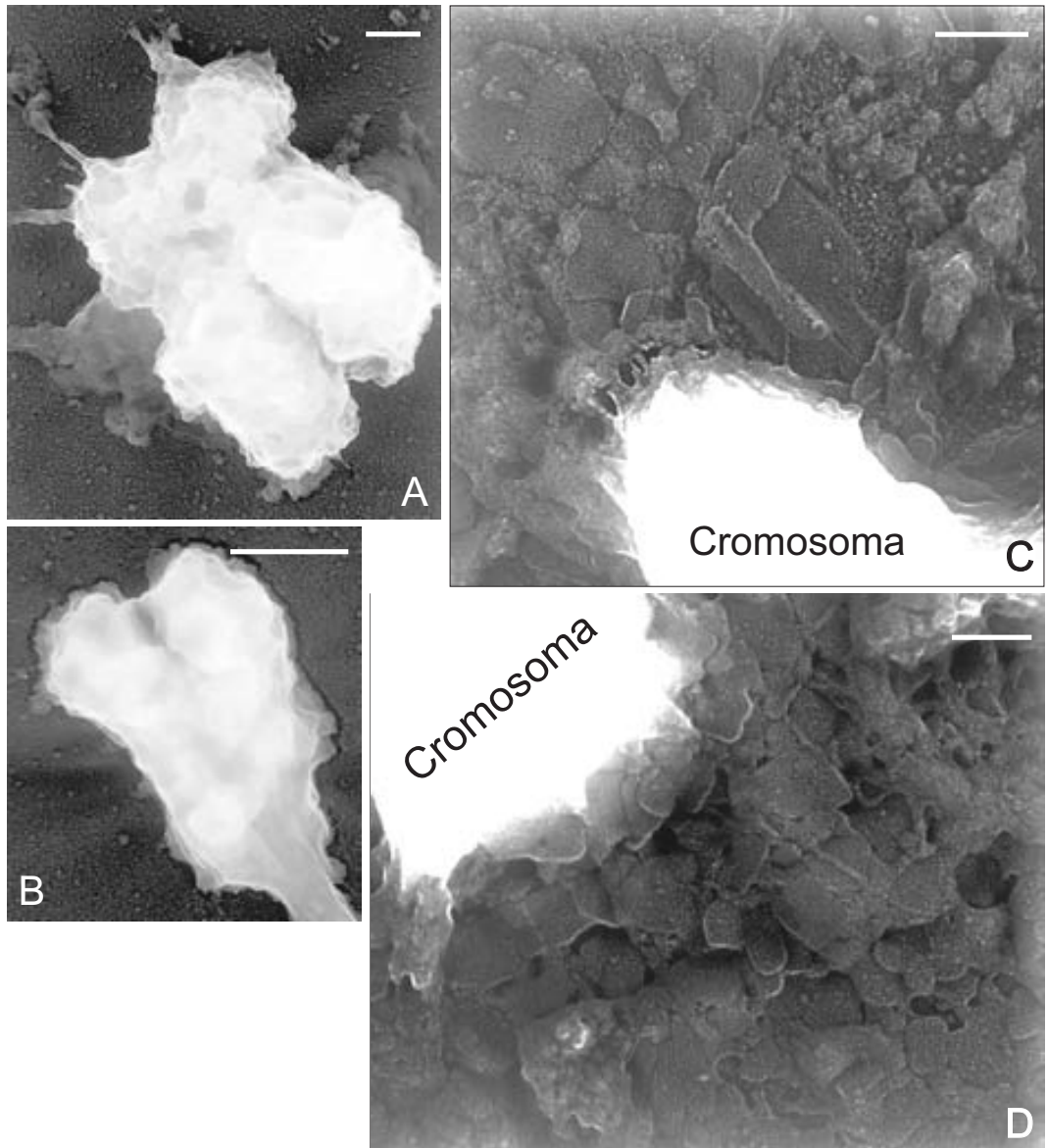
El uso de tratamientos mecánicos ha ayudado ampliamente en el estudio del cromosoma metafásico compacto. La idea inicial al utilizar un tratamiento de este tipo era la de incrementar el rendimiento de placas presentes en la muestra. Se utilizaron diferentes métodos (sección 9.6), para desestructurar mecánicamente los cromosomas metafásicos procedentes de una diálisis en solución (sección 9.5.2).

### 15.4.1. Tratamiento con polytron y ultrasonidos

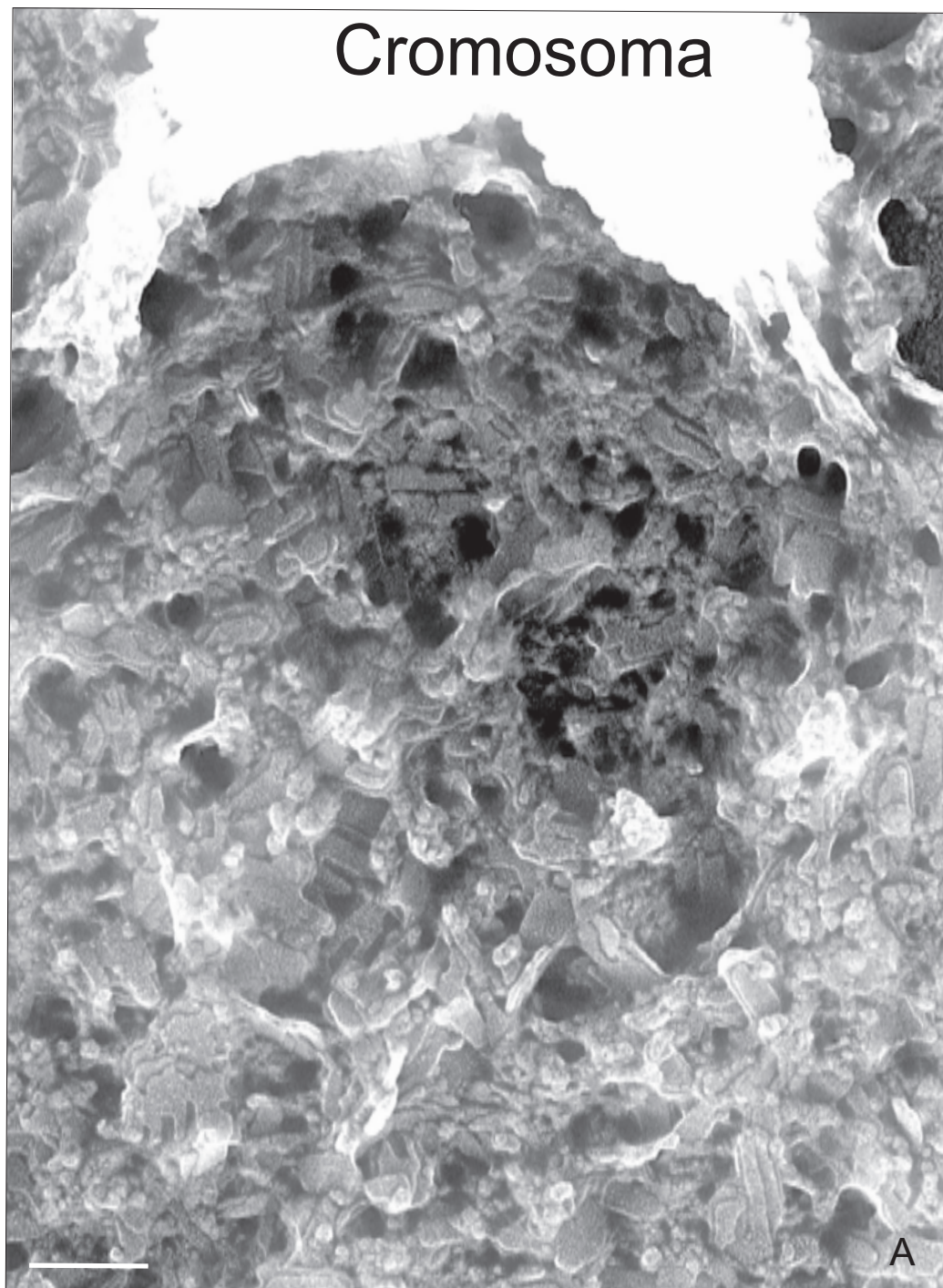
Tanto en la homogeneización con polytrón como con ultrasonidos no se consiguió un rendimiento de obtención de placas muy elevado. En el caso de la homogeneización con polytrón se podían observar bastantes cromosomas íntegros como se puede ver en la Figura 15.8A y algunas placas (**C** y **D**), aunque este era un fenómeno muy aislado. Por otra parte, generalmente las placas observadas siempre estaban asociadas a un cromosoma o fragmento de éste. En el material ultrasonicado, en algún caso se pueden observar cromosomas íntegros como se muestra en la Figura 15.8B, pero en general las muestras ultrasonizadas estaban muy desestructuradas y no presentaban placas. Probablemente, esto es debido a que la ultrasonización es un proceso demasiado agresivo que no permite preservar la integridad de una placa de cromatina.

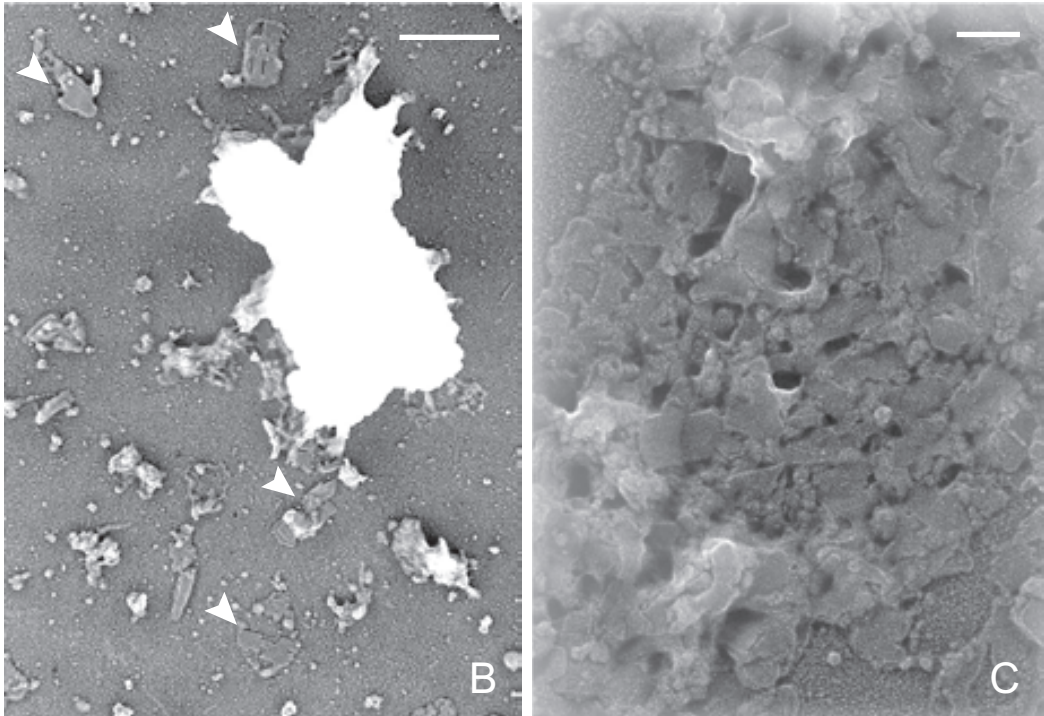
### 15.4.2. Tratamiento con jeringuilla

El tratamiento con jeringuilla, en comparación con los tratamientos con ultrasonidos o con polytron es mucho menos agresivo. Este tratamiento proporcionaba un elevado rendimiento de producción de placas. Los cromosomas obtenidos con este tratamiento, generalmente, estaban menos dañados que con la ultrasonización o con el polytron y contenían algunas placas interconectadas con el material extruído, como se observa claramente en la Figura 15.9A (pág. 138). Otro fenómeno diferencial del tratamiento con jeringuilla era que la gran mayoría de placas observadas se encontraban dispersas, e independientes, por los alrededores de los cromosomas, como se puede ver indicado con flechas en **B**. Teniendo en cuenta estos resultados el tratamiento mecánico con jeringuilla (descrito en la sección 9.6) se utilizó como método estándar de obtención de placas para su posterior estudio con diferentes métodos.



**Figura 15.8: Tratamiento mecánico con polytron y ultrasonidos.** Estos tratamientos se efectuaron sobre cromosomas purificados con gradiente de sacarosa (**A** y **B**; sección 9.4.1), y con gradiente de glicerol (**C** y **D**; sección 9.4.2). La extensión se realizó mediante centrifugación (sección 10.5.1) durante 1 min (**A** y **B**) ó 30 min (**C** y **D**). (**A**, **C** y **D**) son muestras tratadas con polytron. (**B**) Muestra tratada mediante sonicación. En **C** y **D** se pueden observar placas directamente relacionadas con los cromosomas de los cuales emanan. Barras: **B** 600 nm; **A**, **C**-**D** 200 nm.





**Figura 15.9 (empieza en la página anterior): Tratamiento mecánico con jeringuilla.** Éste tratamiento se efectuó sobre cromosomas purificados con gradiente de sacarosa (**A** y **B**; sección 9.4.1), y con gradiente de glicerol (**C**; sección 9.4.2) La extensión se realizó mediante centrifugación (sección 10.5.1) durante 1 min (**A** y **B**) ó 30 min (**C**). (**A**) Cromosoma que extruye una gran “colada” de material en la que hay imbricadas una gran cantidad de placas. (**C**) Ejemplo de placas no asociadas a un cromosoma dispuestas sobre el film de carbono. Las flechas en **B** señalan placas aisladas procedentes de cromosomas metafásicos. Barras: **B** 600 nm; **A** y **C** 200 nm.

## 15.5. Cromosomas digeridos con RNasa

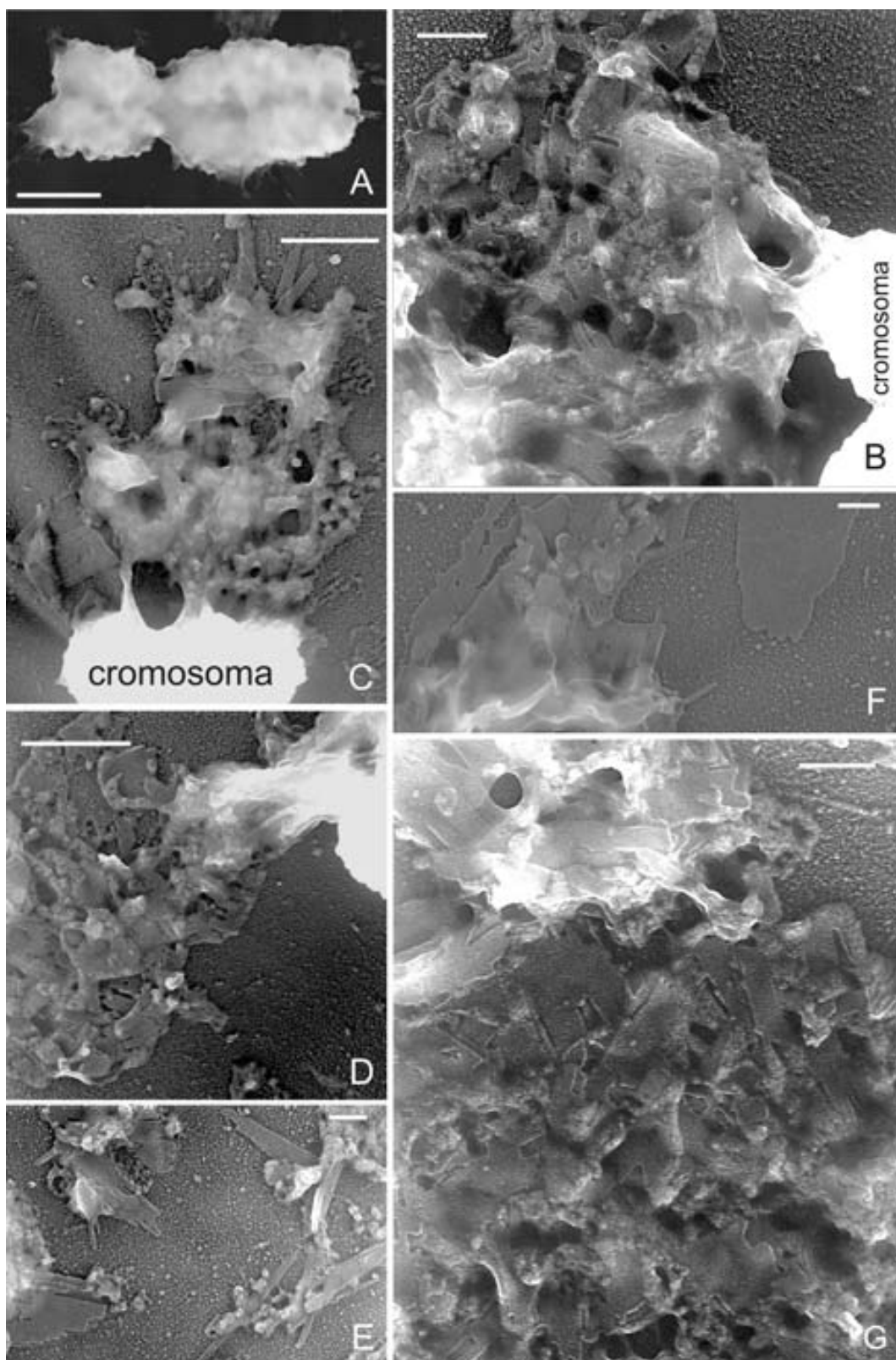
Se ha descrito que los cromosomas metafásicos presentan una capa pericromosómica (Gautier et al., 1992; Hernandez-Verdun y Gautier, 1994). Según los autores, la capa pericromosómica estaría compuesta por proteínas nucleolares, ribonucleoproteínas y diferentes RNAs (*nucleolar RNA* y *small nucleolar RNA*). Un estudio posterior realizado por Uchiyama et al. (2005) en el que se obtuvo el proteoma de cromosomas metafásicos purificados, mostraba la existencia de un grupo de proteínas que los autores llaman como CPPs (Chromosome Peripheral Proteins). Este grupo de proteínas, que en su gran mayoría son ribonucleoproteínas, supuestamente están situadas en la periferia del cromosoma. Para descartar que el RNA de la capa pericromosómica tuviese un papel estructural en las placas de cromatina, se realizó una digestión con RNasa de los cromosomas y de las placas emanadas de estos.

Las digestiones se realizaron sobre material extendido en rejilla y material en suspensión (sección 10.6.2). Las concentraciones de RNasa ensayadas fueron de 0.5, 3 y 10 mg/ml. Las muestras provenían de un tratamiento mecánico con jeringuilla o de una incubación-diálisis en PME durante 4 h.

El análisis mediante microscopía electrónica mostraba que después de la digestión de los cromosomas con RNasa, estos estaban estructurados y mantenían la forma típica (ver Figura 15.10A). En zonas parcialmente desestructuradas se podían observar placas perfectamente (**B** y **C**). También se observaban placas procedentes de material disociado de los cromosomas digeridos con RNasa después del tratamiento mecánico con jeringuilla (**E–G**). Estos resultados descartan la posibilidad de que el RNA presente en la capa pericromosómica tenga un papel estructural en la formación de las placas de cromatina.

---

**Figura 15.10 (en la página siguiente): Digestión de los cromosomas con RNasa.** Las digestiones se realizaron a 37 °C sobre material extendido (**A** y **E**) o en suspensión (**B–D**, **F** y **G**). El material se purificó con un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1) y se dializó en solución frente a PME (sección 9.5.2). Adicionalmente **E–G** fue tratado mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6). Las digestiones se realizaron con una concentración de RNasa de: **A**, **B**, **E** y **F** 0.5 mg/ml; **C** y **G** 3 mg/ml y **D** 10 mg/ml. Barras: **A** y **C** 600 nm; **B** y **D–G** 200 nm.



## 15.6. Placas desnaturalizadas parcialmente en presencia de NaCl

En el campo de la cromatina es ampliamente conocido que el NaCl entre 0.6–2 M provoca la disociación de las partículas núcleo aisladas (Burton et al., 1978; Yager et al., 1989; Aragay et al., 1991; Bartolomé et al., 1995; Bermúdez et al., 1998). Teniendo en cuenta este fenómeno, se realizaron desnaturalizaciones parciales con NaCl a diferentes concentraciones para tratar de demostrar que las placas tenían el comportamiento típico de la cromatina.

### 15.6.1. Desnaturalización pre-entrecruzamiento

Se realizaron desnaturalizaciones antes de entrecruzar los cromosomas (sección 10.6.3.1). En este caso el material provenía de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), una incubación-diálisis (sección 9.5.2) y un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6). Las desnaturalizaciones se llevaron a cabo en presencia de NaCl 2 M a diferentes tiempos. Los resultados indicaban que en los diferentes tiempos ensayados había una desaparición de los cromosomas metafásicos y una desnaturalización importante de las placas. Un fenómeno generalizado en este tipo de condición era que todo el fondo estaba completamente cubierto de material con morfología reticular o granular, como se pudo observar en las micrografías de la Figura 15.11 (pág. 143). Por otra parte, era común observar zonas en las que había cromatina fibrilar delimitando pequeñas placas en su interior, este tipo de estructura se puede interpretar como la silueta de una placa que ha sido prácticamente desestructurada (círculo en Figura 15.11A). La presencia de pequeñas placas, incluso en estas condiciones, indica que son estructuras intrínsecamente muy estables.

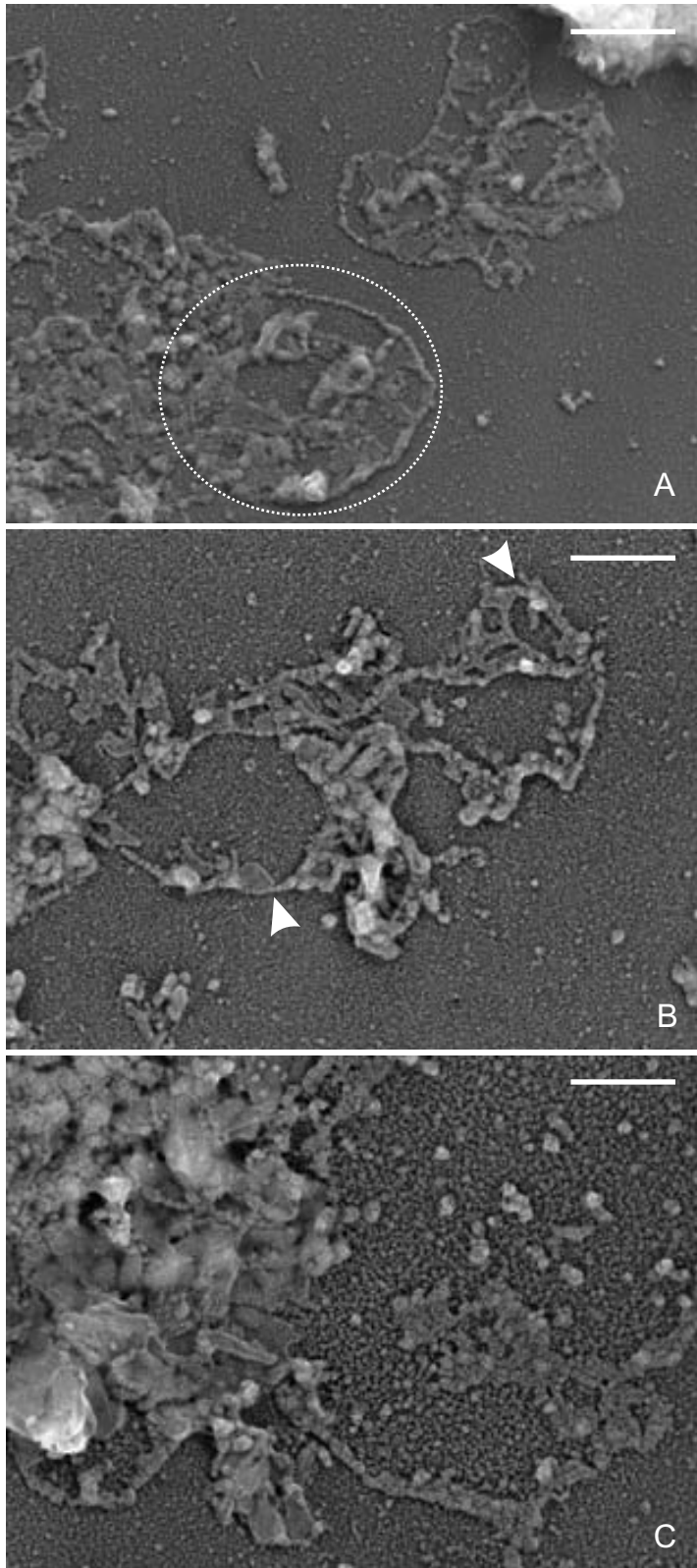
### 15.6.2. Desnaturalización post-entrecruzamiento

Además de los estudios realizados con placas desnaturalizadas previamente al entrecruzamiento (ver sección anterior), se realizaron experimentos de desnaturalización de cromosomas con elevadas concentraciones de NaCl (ver sección 10.6.3.2), pero con material previamente entrecruzado suavemente con glutaraldehído al 0.01 %. Como se puede ver en la Figura 15.12 (pág. 144), en estas condiciones se podían observar placas que mantenían mejor su integridad estructural en comparación con las placas desnaturalizadas antes del entrecruzamiento (ver Figura 15.11). Muchas de las placas presentaban desnaturalizaciones parciales y se podían observar multitud de fibras producidas por el efecto del NaCl (ver por ejemplo **A**, **B** y **E**). Las fibras observadas en este caso presentaban un amplio rango de diámetros (6–28 nm). Las fibras más finas observadas (diámetro < 10 nm) podrían ser DNA sin histonas. La mayoría de fibras tenían un grosor inferior al de las fibras de 30–40 nm; el diámetro promedio observado era de  $15.8 \pm 5.5$  nm ( $n=33$ ). Esto seguramente es debido a que

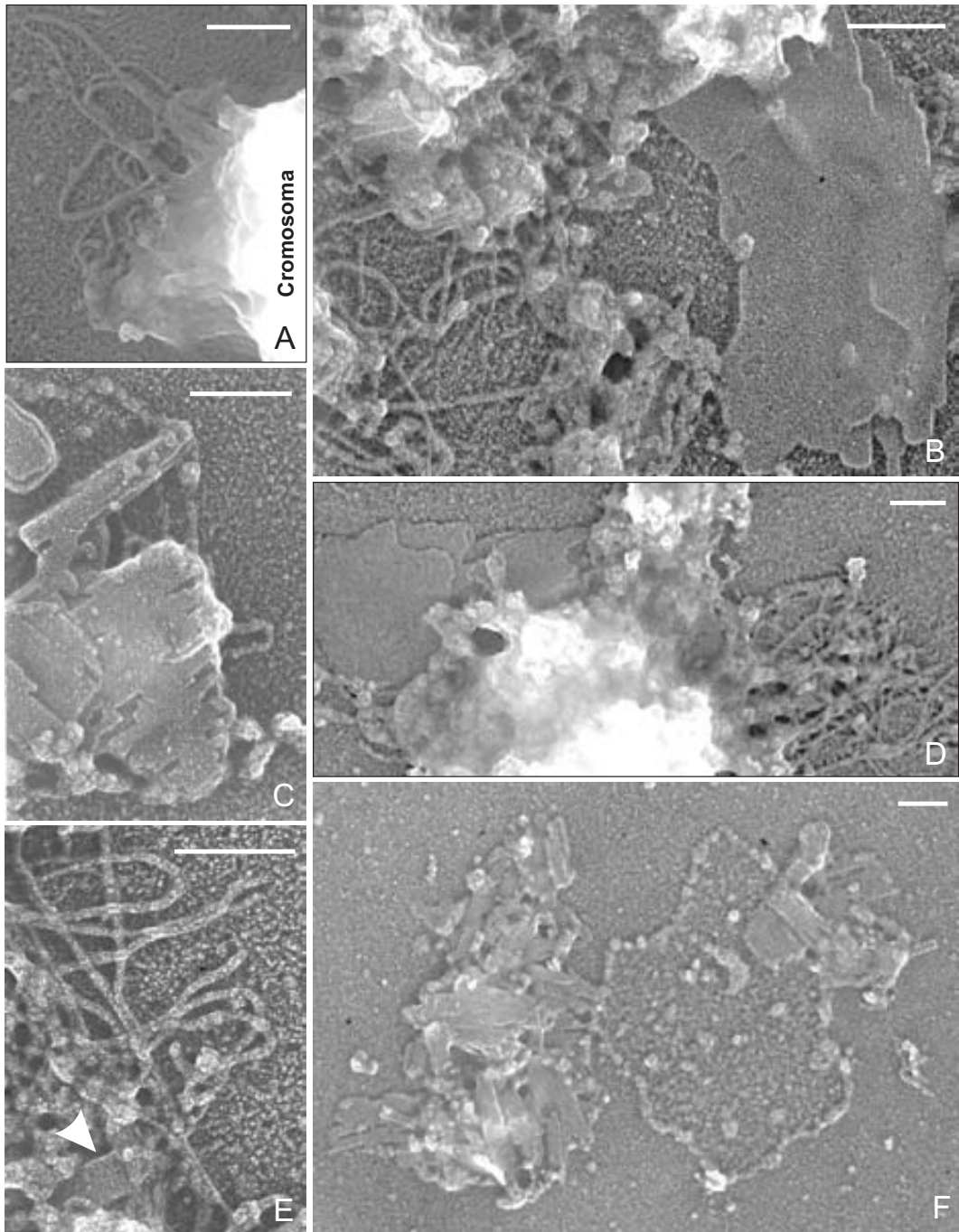
las fibras, en presencia de elevadas concentraciones de sal, están parcialmente desnaturalizadas, debido a la pequeña cantidad de glutaraldehído utilizado para fijar las muestras en este experimento.

Por otra parte, si observamos el fondo, del mismo modo que en las placas desnaturalizadas previamente al entrecruzamiento, se observan formaciones reticulares (ver Figura 15.12C y F) más marcadas en comparación con las demás condiciones estudiadas. Esta textura reticular podría ser debida a la presencia de una gran cantidad de DNA o de complejos DNA-histona dispersos por el fondo de la rejilla.





**Figura 15.11: Placas desnaturalizadas con NaCl antes del entrecruzamiento.** Las desnaturalizaciones se realizaron en presencia de NaCl 2 M durante 2 (A), 5 (B) y 20 min (C). El círculo en A delimita una zona en la que se puede ver la posible silueta de una placa prácticamente desnaturalizada. En B las flechas indican la zona de conexión directa entre una placa y una fibra de cromatina parcialmente desestructurada. Barras: 500 nm



**Figura 15.12: Desnaturalización de placas en presencia de elevadas concentraciones de NaCl después de un entrecruzamiento suave.** Los cromosomas metafásicos fueron purificados en un gradiente de glicerol (sección 9.4.2), dializados en solución frente a PME (sección 9.5.2) y tratados mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6). Después de la extensión y el entrecruzamiento durante 30 min a baja concentración de glutaraldehído (0.01%) en la misma solución utilizada en la diálisis; las muestras se incubaron en la rejilla con una solución que contenía NaCl 1 M (**D** y **F**) ó 2 M (**A-C** y **E**). La flecha blanca en **E** indica una placa rodeada por cromatina plegada irregularmente. Barras: 200 nm.

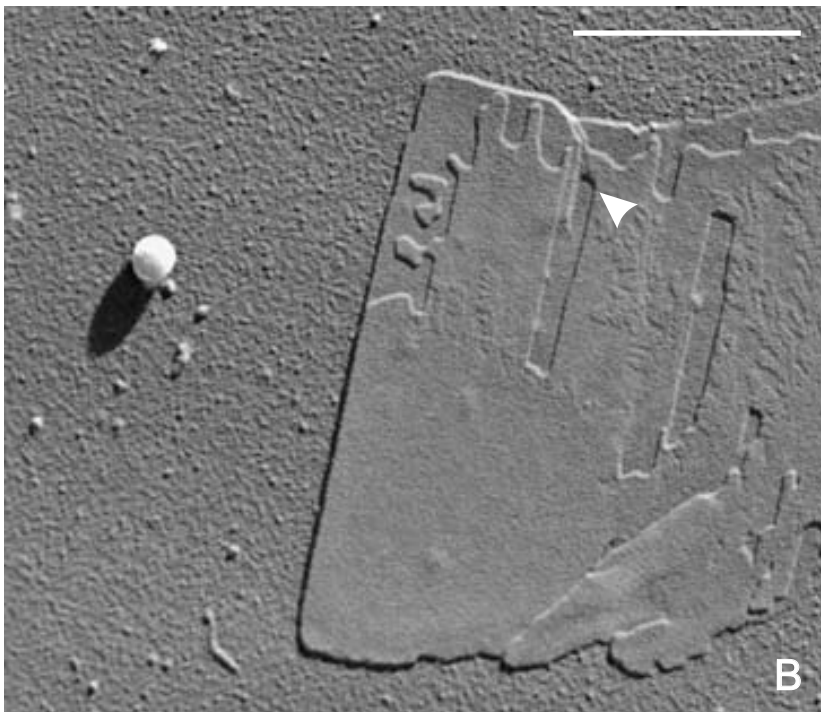
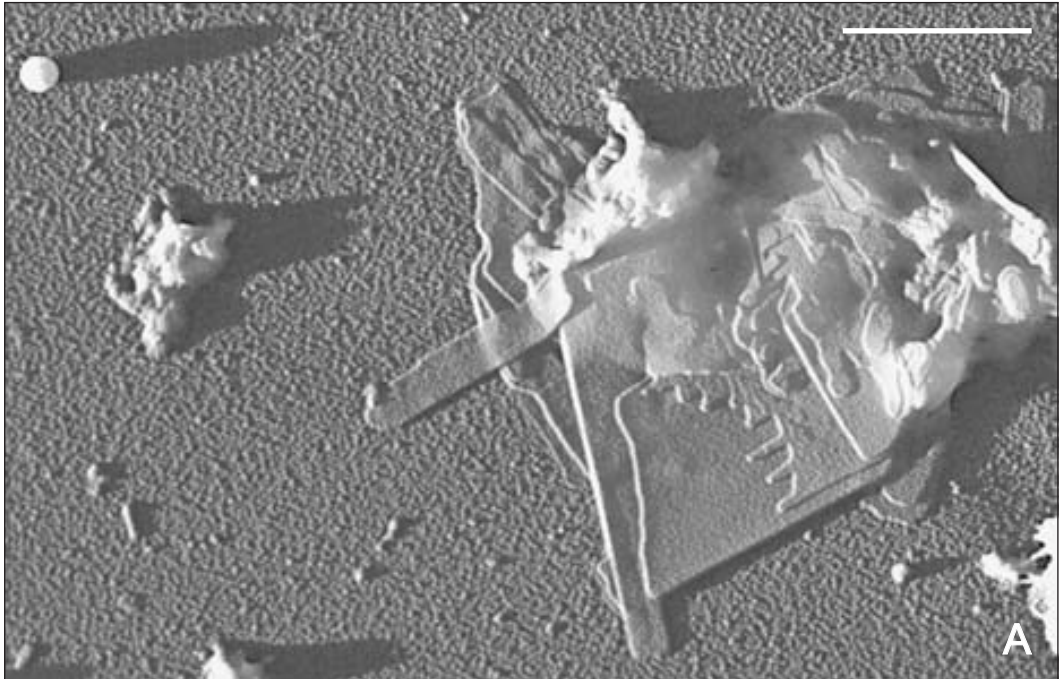
## 15.7. Placas platinadas unidireccionalmente

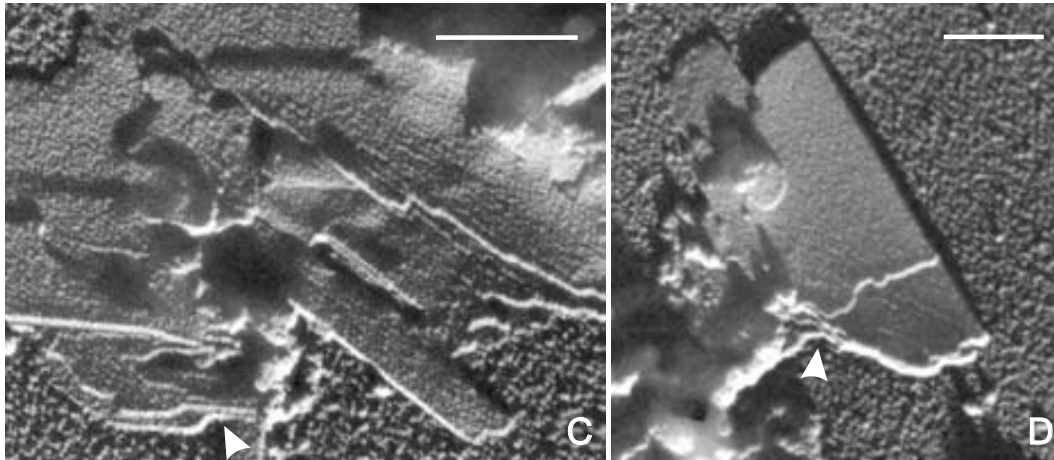
Para poder determinar la altura de las placas de cromatina mediante TEM era necesario realizar un platinado unidireccional. La altura de las placas se obtiene a partir de la proyección de su sombra, con lo que es necesario utilizar un control interno de tamaño conocido. Para ello se colocaron esferas de látex después de la extensión de la muestra, a partir de las cuales se podía determinar la altura de las placas (ver sección 14.1.1). En la Figura 15.13 se pueden observar placas de gran extensión platinadas unidireccionalmente y visualizadas mediante TEM. En las micrografías obtenidas con platinado unidireccional se podía observar el fenómeno de apilamiento típico de las placas de cromatina, a partir del cual se pudo determinar la altura de una placa cuando estaba dispuesta sobre otra (ver Figura 15.13C y D como ejemplo). Las medidas de altura obtenidas se presentan en la sección 18.1.

## 15.8. Placas después de realizar una curación

La cromatina es un sistema supramacromolecular dinámico y morfológicamente flexible debido a sus propiedades autoasociativas (mirar introducción). Teniendo en cuenta estas propiedades se realizaron curaciones (ver sección de métodos 10.5.2) para observar el comportamiento de las placas de cromatina en medio acuoso a lo largo del tiempo. El material analizado procedía de un tratamiento mecánico con jeringuilla, que tal como se explicó en la sección 15.4.2 provocaba un mayor rendimiento de producción de placas. En algunos experimentos, previamente a la curación, se centrifugaron las muestras sobre rejilla y posteriormente fueron curadas.

En las curaciones realizadas durante 2 h (Figura 15.14A y B, con o sin lavado posterior a la centrifugación respectivamente) no se observó una mayor cantidad de material en comparación con las muestras sin curación (ver por ejemplo Figura 15.9, pág. 138). Si se realizaban curaciones durante 24 h (C y D) ó 48 h (E y F) se incrementaba la cantidad de placas encontradas sobre las rejillas. Por otra parte, si se centrifugaba el material sobre la rejilla antes de la curación también incrementaba la proporción de placas, debido seguramente a una mayor concentración local de material. En la Figura 15.14D y F se muestran placas curadas durante 24 y 48 h respectivamente, después de haber realizado una centrifugación previa sobre las rejillas.





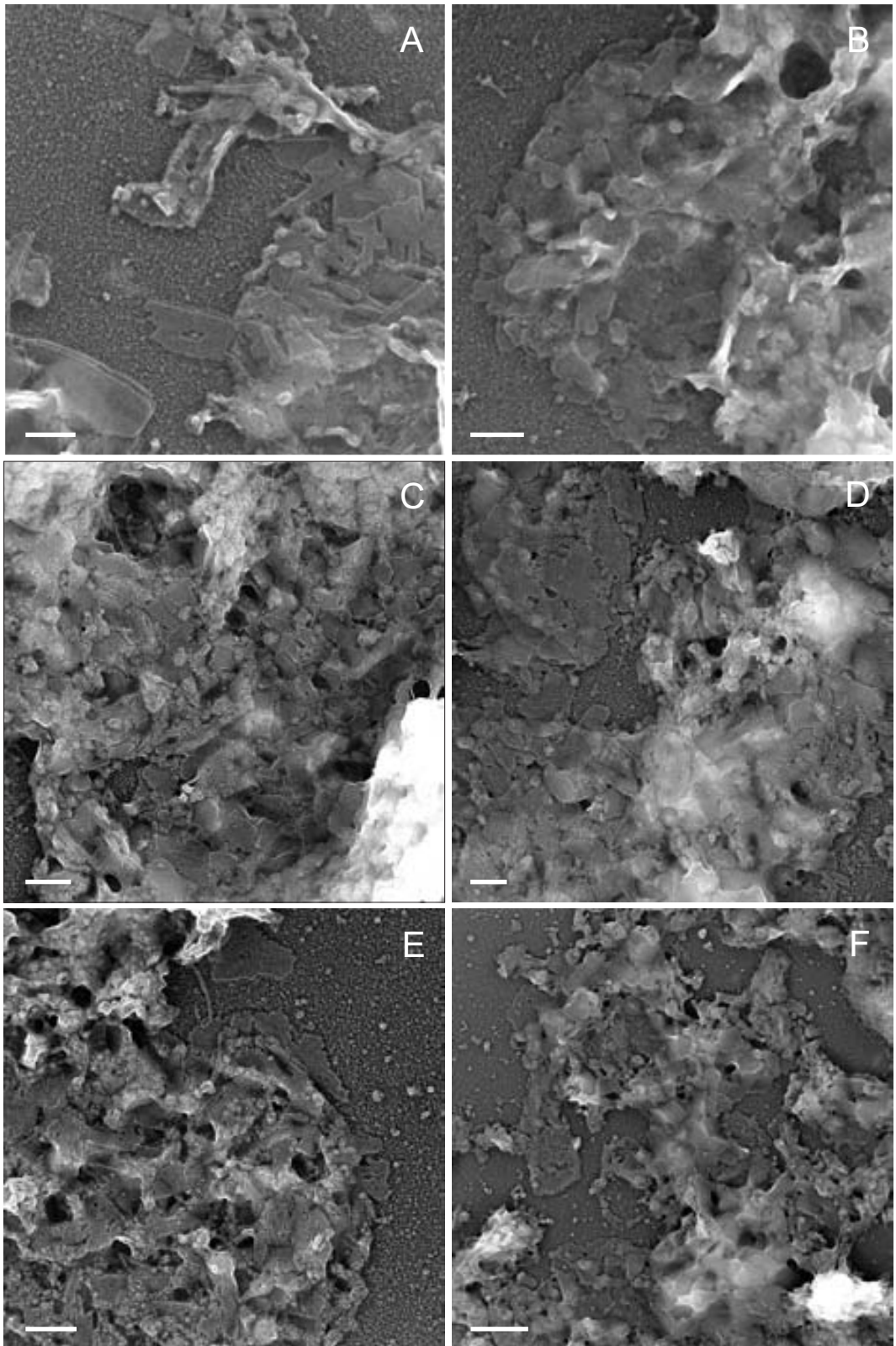
**Figura 15.13 (empieza en la página anterior): Placas platinadas unidireccionalmente.** Los cromosomas metafásicos se purificaron en un gradiente de glicerol (sección 9.4.2), se dializaron en solución frente a PME a 4 °C durante 20 h (sección 9.5.2) y se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6). Finalmente se platinaron unidireccionalmente (ver sección 10.9.1). En **A** y **B** se pueden observar las esferas de látex utilizada para determinar la altura de las placas (sección 14.1.1). La flecha en **B** muestra la sombra creada por una placa dispuesta sobre otra placa. En **C** y **D** se puede observar imágenes típicas de apilamiento de las placas de cromatina (zonas indicadas con flechas). Barras: **A–C** 500 nm; **D** 125 nm.

Si se curaba cromatina sobre la rejilla durante 3 días, todos los campos estaban llenos de material agregado en tanta cantidad que no era posible observar con detalle la morfología. Esto era debido a una platinación deficiente de las zonas con poca altura<sup>1</sup>. Únicamente en ciertos campos en los que no había un exceso tan grande de material se podía observar una gran cantidad de placas imbricadas con material de mayor altura, como se puede observar en la Figura 15.15A y B (pág. 150).

También se curaron muestras en suspensión antes de realizar la extensión sobre rejilla (ver Figura 15.15C y D). Los resultados muestran que la curación en suspensión durante 24 y 48 h también produce un mayor número de placas, del mismo

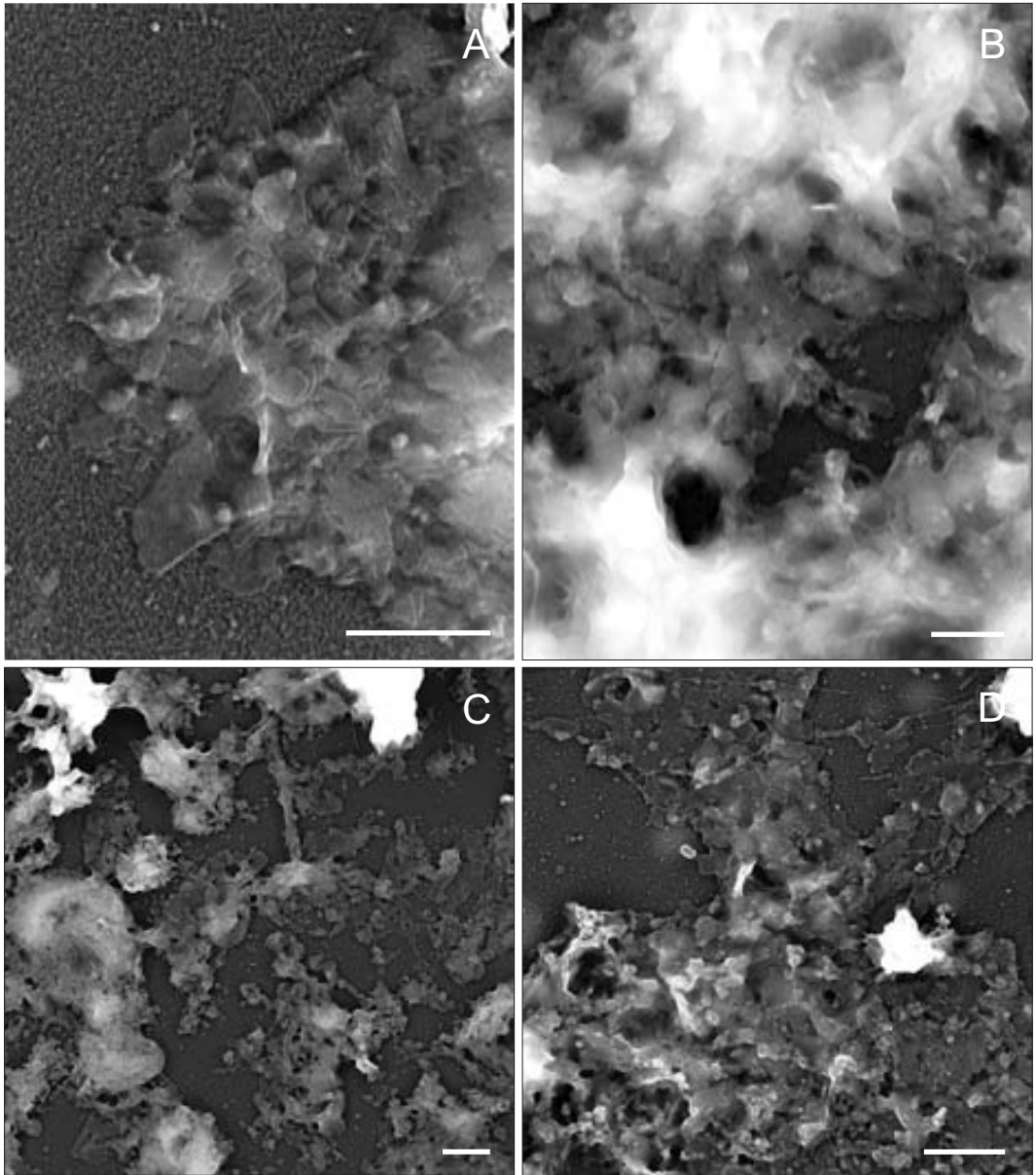
<sup>1</sup>El hecho de utilizar un ángulo de platinación pequeño (ver Tabla 10.2, pág. 81) provoca que haya zonas de la rejilla que se dispongan en la sombra generada por el material agregado de gran altura.

**Figura 15.14 (en la página siguiente): Placas curadas en rejilla.** El material utilizado fue purificado en un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), dializado en solución frente a PME (sección 9.5.2), tratado mecánicamente y finalmente curado sobre rejilla (sección 10.5.2.1). (**A**, **B**, **D** y **F**) Placas centrifugadas previamente a la curación. (**C** y **E**) Placas curadas directamente sobre rejilla sin una centrifugación previa. Las placas en **A** y **B** se curaron durante 2 h; a **B** se le realizó un lavado previo a la curación. Placas curadas durante 24 h (**C** y **D**) y 48 h (**E** y **F**). Barras: **F** 500 nm; **A–E** 200 nm.



modo que los resultados obtenidos en las curaciones sobre rejilla durante el mismo tiempo (Figura 15.14C–F). Esto indica que tanto sobre rejilla como en suspensión tiene lugar un fenómeno de nucleación y agregación (Anderson y Lekkerkerker, 2002) de la cromatina, que favorece la formación y el crecimiento de las placas.

Los datos de curación en suspensión, junto con los datos observados por entrecruzamiento en solución (sección 15.3.3), corroboran que la formación de placas no está condicionada por el uso de superficies planas para su visualización. La Tabla 15.1 (pág. 151) recopila todas las condiciones en las que se han visualizado las placas; parte de la información contenida en esta tabla corresponde a resultados que se presentaran en las próximas secciones.



**Figura 15.15: Cromatina curada sobre rejilla y en solución.** El material utilizado fue purificado en un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), dializado en solución frente a PME (sección 9.5.2) y tratado mecánicamente (sección 9.6). (A y B) Material centrifugado e incubado durante 3 días; la muestra en B adicionalmente fue lavada después de la centrifugación. (C y D) Ejemplos de placas curadas en suspensión durante 24 h (C) y durante 48 h (D). Barras: 500 nm



Tabla 15.1: Condiciones de existencia ensayadas

Procedimientos	Condiciones que produjeron la observación de placas
Preparación de cromosomas	Preparación en presencia de poliaminas sin realizar una posterior purificación Purificación mediante gradientes de sacarosa o glicerol Diálisis para eliminar la sacarosa y el glicerol después de la purificación
Tratamientos que favorecen la extrusión de placas	Incubación a 37 °C durante 30 min sobre la rejilla de microscopía electrónica Tratamientos mecánicos: paso a través de jeringuilla, sonicación y homogeneización
Cationes	Mg <sup>2+</sup> 5–20 mM (con Ca <sup>2+</sup> 1 mM en las digestiones)
Extensión	Centrifugación a 1500g durante 10 min (en TEM y en algún experimento de AFM) Adsorción (en AFM y en algún experimento de TEM); curación (AFM y TEM)
Substratos	Film de carbono activado o sin activar con Alcian blue (TEM) Mica recién exfoliada (AFM)
Fijación	Entrecruzamiento con glutaraldehído sobre film de carbono o en solución (TEM) Entrecruzamiento con glutaraldehído sobre mica (AFM) Sin fijación (AFM)
Agentes de contraste	Sombreado uni- y multidireccional (TEM) Sin agentes de contraste (AFM)
Estado de hidratación	Muestra deshidratada (TEM) En medio acuoso a RT en AFM (AM-AFM y <i>contact mode</i> ); en AFS



## Capítulo 16

# Visualización de placas de cromatina en solución: Estudios con AFM

*Hasta el momento todos los estudios sobre las placas de cromatina se han realizado mediante microscopía electrónica (Caravaca, 2004; Caño, 2007; Castro-Hartmann, 2009). En las preparaciones para ME convencional, se han de deshidratar, fijar y teñir las muestras debido al alto vacío y al poco contraste que presenta la materia orgánica al ser atravesada por un haz de electrones. En el caso de la criomicroscopía electrónica es necesario vitrificar la muestra para preservar su estructura. Por estos motivos, y por su amplio potencial en Biología Molecular, se decidió utilizar la microscopía de fuerza atómica. Esta técnica, tal como se indicó en la introducción (capítulo 6) y en el apartado de materiales y métodos (capítulo 11) nos permite trabajar en líquido (a RT) y por lo tanto en condiciones fisiológicas (Radmacher, 2002; Murphy et al., 2006).*

### 16.1. Visualización de placas de cromatina estables en solución

El análisis topográfico de las placas de cromatina en solución mediante AFM, generalmente, se realizó en AM-AFM *mode* como se explicó en la sección 11.11. El AM-AFM *mode* es el método que perturba menos la muestra debido a que el contacto se establece intermitentemente (Magonov y Yerina, 2005; ver sección 6.2.2.2). Se analizó material procedente de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), al que posteriormente se le realizaba una diálisis en solución (sección 9.5.2), un tratamiento mecánico con jeringuilla (sección 9.6) y finalmente se extendía la muestra sobre mica (3×3 mm; sección 11.8.2).

### 16.1.1. Imágenes obtenidas con el microscopio *Multimode*

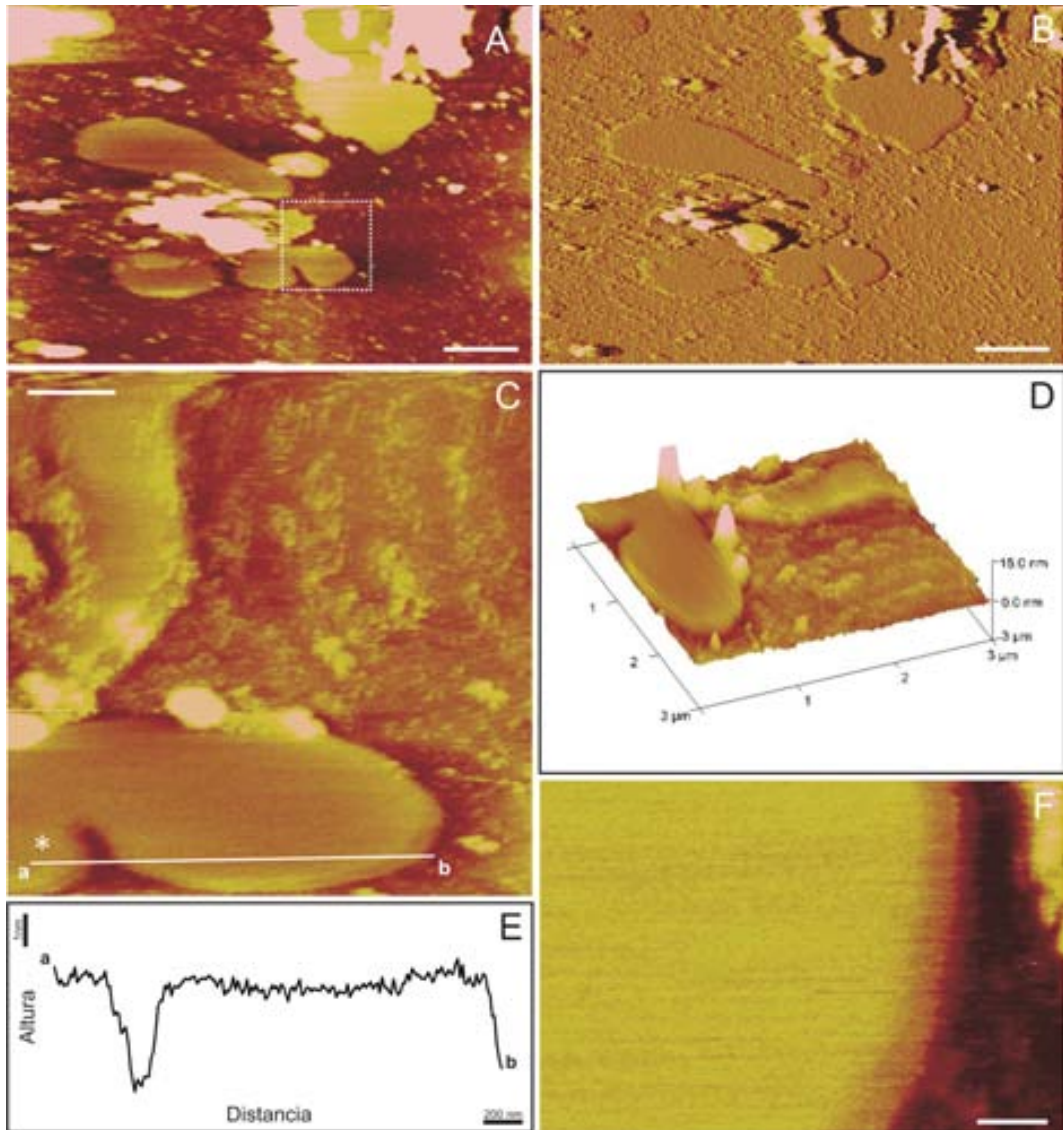
El microscopio *Multimode* tiene una elevada resolución para la obtención de imágenes topográficas en solución. Por esta razón, inicialmente se utilizó este microscopio en el estudio de las placas de cromatina en solución. Desde el primer momento se pudieron visualizar, sin ningún tipo de problema, placas en presencia de PME (conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM) a las que no se les realizó ningún proceso de entrecruzamiento. Para localizar las placas se escaneaban áreas de  $10 \times 10$ – $20 \times 20$   $\mu m$  hasta visualizar zonas con placas. Las placas que se visualizaban fácilmente eran aquellas dispuestas sobre mica que no tenían material cromatínico amorfo en exceso. Una vez localizada una placa se magnificaba la imagen para observarla con detalle. En la Figura 16.1 se puede observar una serie de imágenes de una misma placa a diferentes magnificaciones. En **A** observamos una imagen topográfica típica de una placa de cromatina en solución y en **B** observamos su imagen de amplitud.

En la Figura 16.2 (pág. 157) se muestra otra serie de placas en solución en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM. Las placas de cromatina son estructuras muy lisas; la superficie de las placas en la imagen de amplitud muestra que en la zona interna (indicado con flechas en **B** y **D**) no hay ninguna variación en la imagen. Esta continuidad indica que no hay cambios topográficos a lo largo de la superficie y que, por lo tanto, son estructuras muy lisas (ver sección 6.2.2.2). Estos datos son consistentes con las imágenes obtenidas mediante TEM en las cuales también se aprecia que las placas tienen una superficie muy lisa (ver Figuras 15.1F, 15.2B ó 15.6C; págs. 127, 128 ó 132).

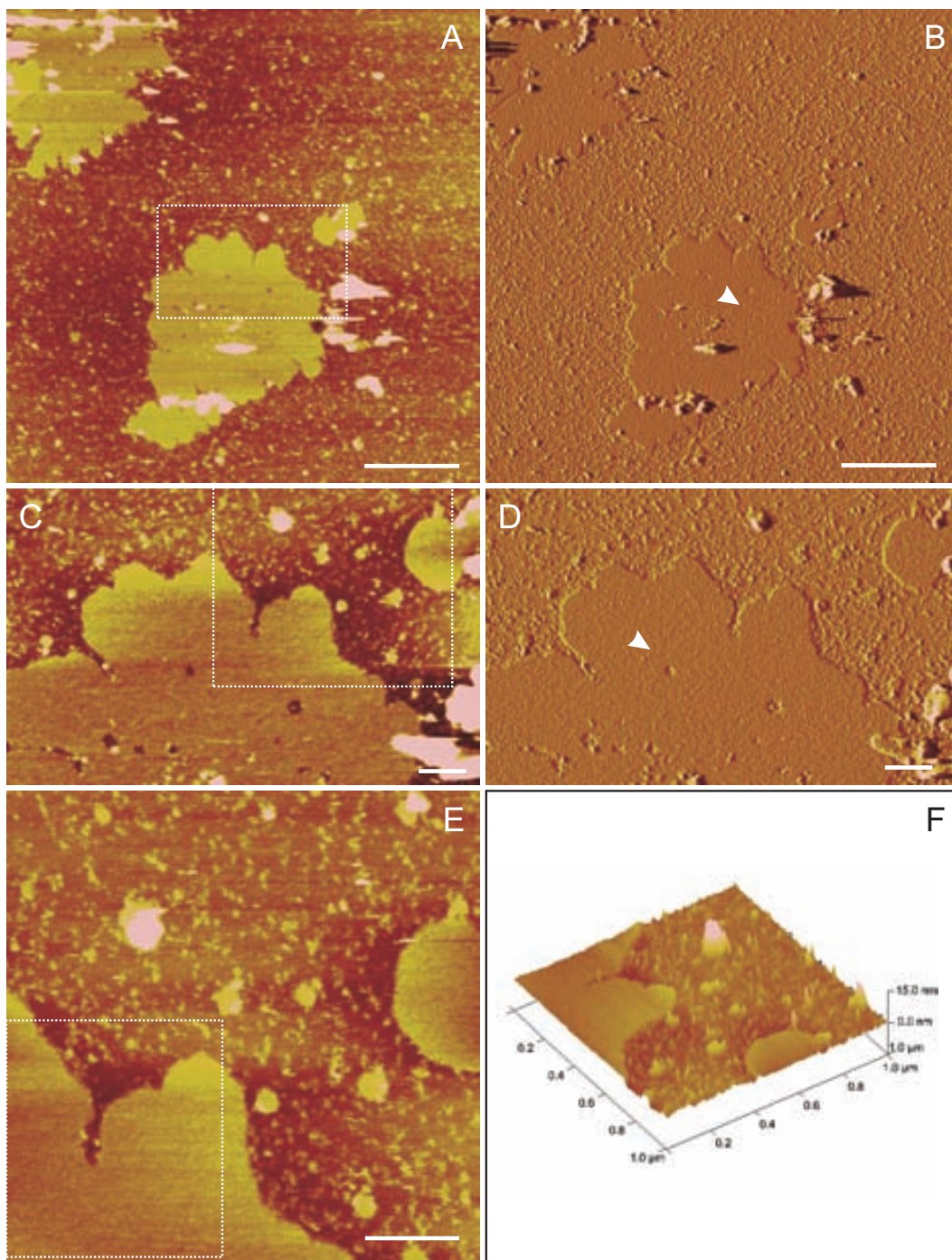
Incluso cuando se trabaja con cationes divalentes, los cromosomas metafásicos en medio acuoso son estructuras blandas, como si se tratara de un gel consistente pero deformable o una sustancia mucilaginosa. Este fenómeno, junto con el hecho de que son estructuras muy grandes, dificultó mucho la visualización de cromosomas mediante AFM. En la Figura 16.2I se puede observar un ejemplo de cromosomas visualizados (a baja resolución) con AM-AFM *mode* en solución. Se trató de visualizar con detalle la superficie, pero al obtener imágenes con una elevada magnificación no se pudo determinar ningún patrón mediante AM-AFM *mode*, tal como se puede observar en la Figura 16.3C o F (pág. 158). Este fenómeno puede estar influenciado por la perturbación que ejerce la punta sobre la muestra<sup>1</sup>. En la Figura 16.4 (pág. 159) se pueden observar más ejemplos de placas visualizadas con el microscopio *Multimode*, constatando que la placa de cromatina es una estructura estable en solución.

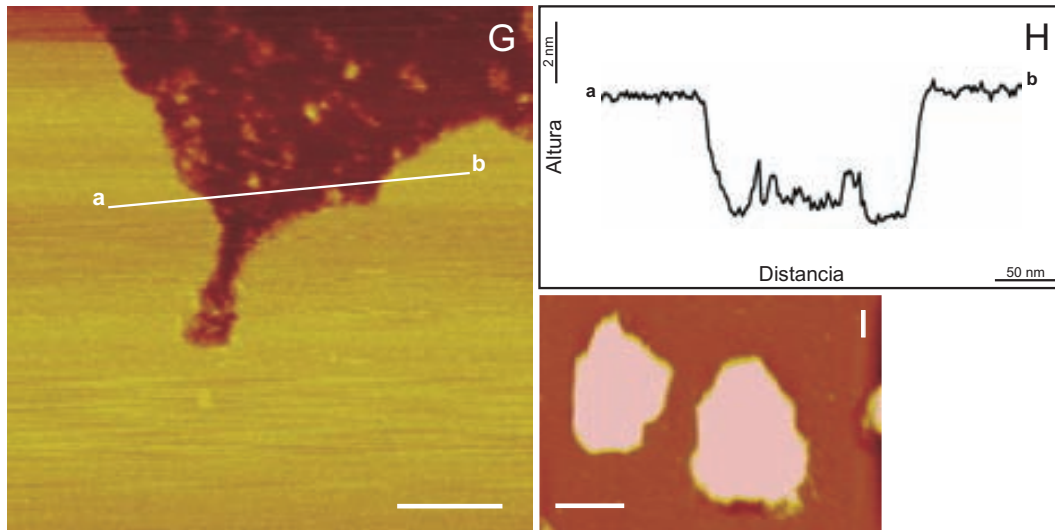
---

<sup>1</sup>El AM-AFM *mode* es el modo topográfico que menos perturba la muestra. No obstante, se produce un fenómeno de compresión de las placas de cromatina debido a su comportamiento elástico. Este comportamiento se demostró mediante el estudio de nanoindentación (ver capítulo 17) y está relacionado con los resultados de alturas obtenidos mediante AFM (sección 18.2).



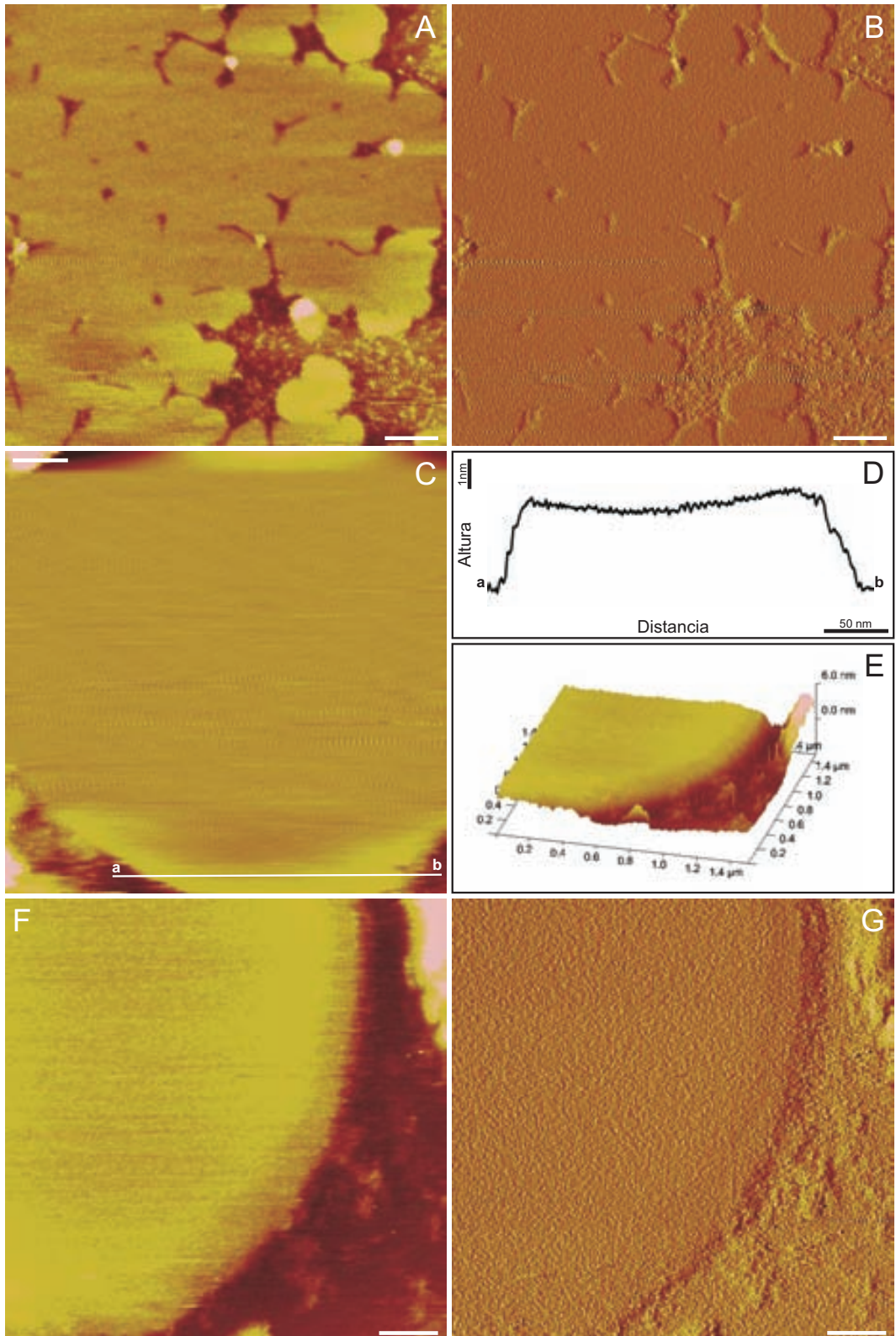
**Figura 16.1:** Imágenes de placas visualizadas mediante AFM en solución acuosa con el microscopio *Mutimode* (Serie 1). Todas estas imágenes corresponden a una misma placa visualizada en presencia de PME. (A, C y F) Imágenes topográficas. (B) Imagen de amplitud correspondiente a la imagen tomada en A. (C) Corresponde a una ampliación de la zona delimitada por el cuadro en A. (D) Representación 3D de la placa mostrada en C. El perfil de alturas mostrado en E, corresponde a la sección delimitada por  $\overline{ab}$  en C. (F) Ampliación de la zona marcada por (\*) en C. Barras: A y B 1  $\mu\text{m}$ ; C 500 nm; F 200 nm.



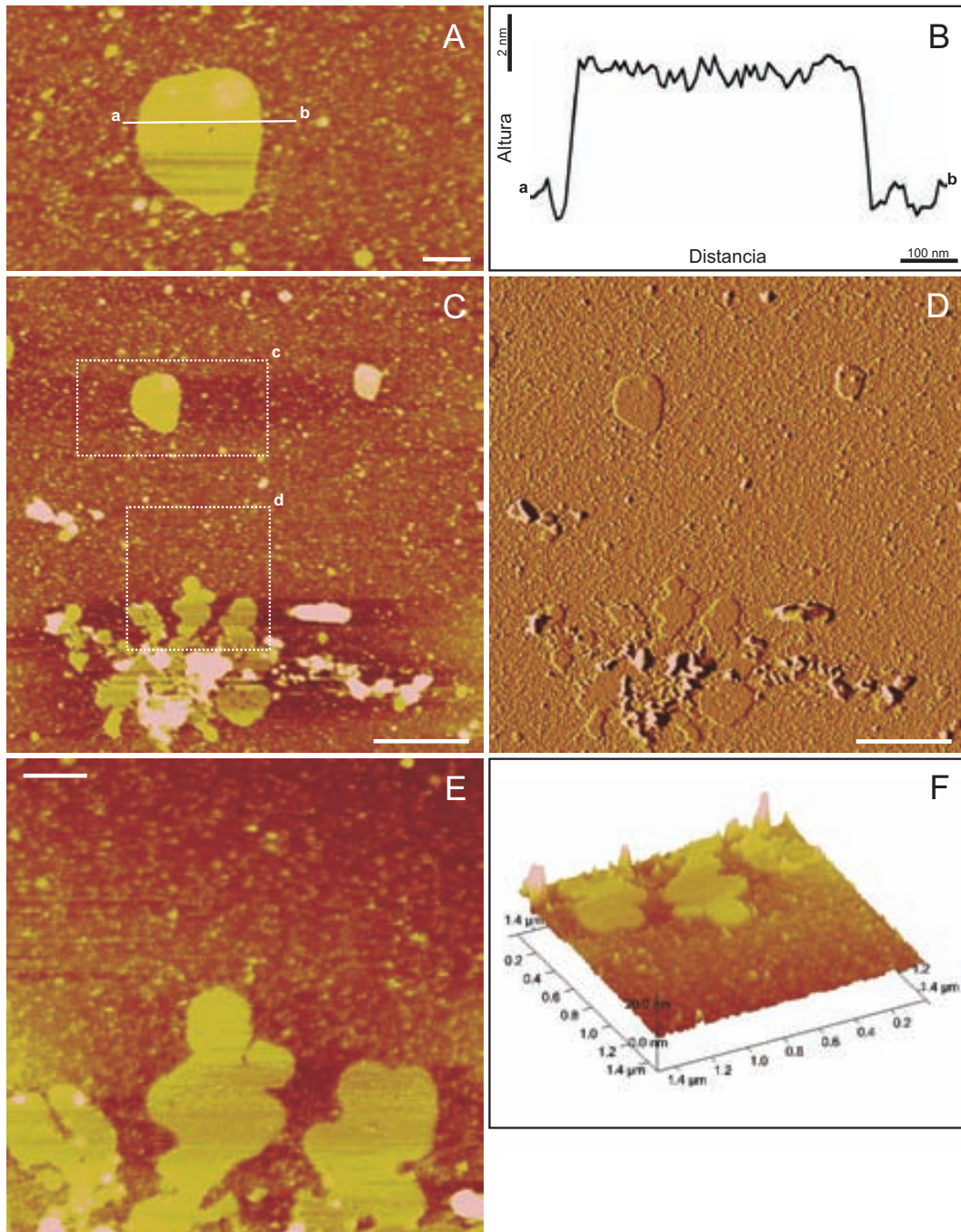


**Figura 16.2** (empieza en la página anterior): **Placas visualizadas mediante AFM en solución acuosa con el microscopio *Multimode* (Serie 2).** En esta figura se muestra un serie de ampliaciones de una placa visualizada en presencia de PME (conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM). (**A**, **C**, **E** y **G**) Imágenes topográficas. (**B** y **D**) Imágenes de amplitud de **A** y **C** respectivamente. (**C**) Corresponde a una ampliación de la zona delimitada por el cuadro en **A**; (**E**) Ampliación del cuadro de **C**; (**G**) Ampliación del cuadro en **E**. (**F**) Representación 3D de la placa mostrada en **E**. (**H**) Perfil de alturas correspondiente a la sección delimitada por  $\overline{ab}$  en **G**. Los cromosomas en **I** se extendieron por centrifugación sobre mica (sección 11.8.1), se entrecruzaron con glutaraldehído (sección 11.9) y finalmente fueron lavados en PME. Barras: **I** 2  $\mu$ m; **A** y **B** 1  $\mu$ m; **E** 500 nm; **C** y **D** 200 nm; **G** 100 nm.

**Figura 16.3** (en la página siguiente): **Placas visualizadas con el microscopio *Multimode* a elevada magnificación.** En la figura se pueden observar placas en solución en presencia de PME conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM (**A**, **B**, **E–G**) o 20 mM (**C** y **D**). (**A**, **C** y **F**) Imágenes topográficas. (**B** y **G**) Imágenes de amplitud. (**D**) Perfil de alturas correspondiente a la sección delimitada por  $\overline{ab}$  en **C**. (**E**) representación 3D de la placa mostrada en **F**. Incluso a un elevado aumento (**G**), las placas muestran una superficie lisa carente de un patrón repetitivo. Barras: **A** y **B** 200 nm; **C** 50 nm; **F** y **G** 20 nm.







**Figura 16.4: Placas visualizadas mediante AFM en solución acuosa con el microscopio *Multimode* (Serie 3).** En esta figura se muestra una serie de ampliaciones de una placa visualizada en presencia de PME (conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM). (A, C y E) Imágenes topográficas. (D) Imagen de amplitud de C. (A) Ampliación del cuadro c en C; (E) Ampliación del cuadro d en C. (B) Perfil de alturas correspondiente a la sección delimitada por  $\overline{ab}$  en A. (F) representación 3D de la placa mostrada en E. Barras: C y D 1  $\mu\text{m}$ ; A y E 200 nm.

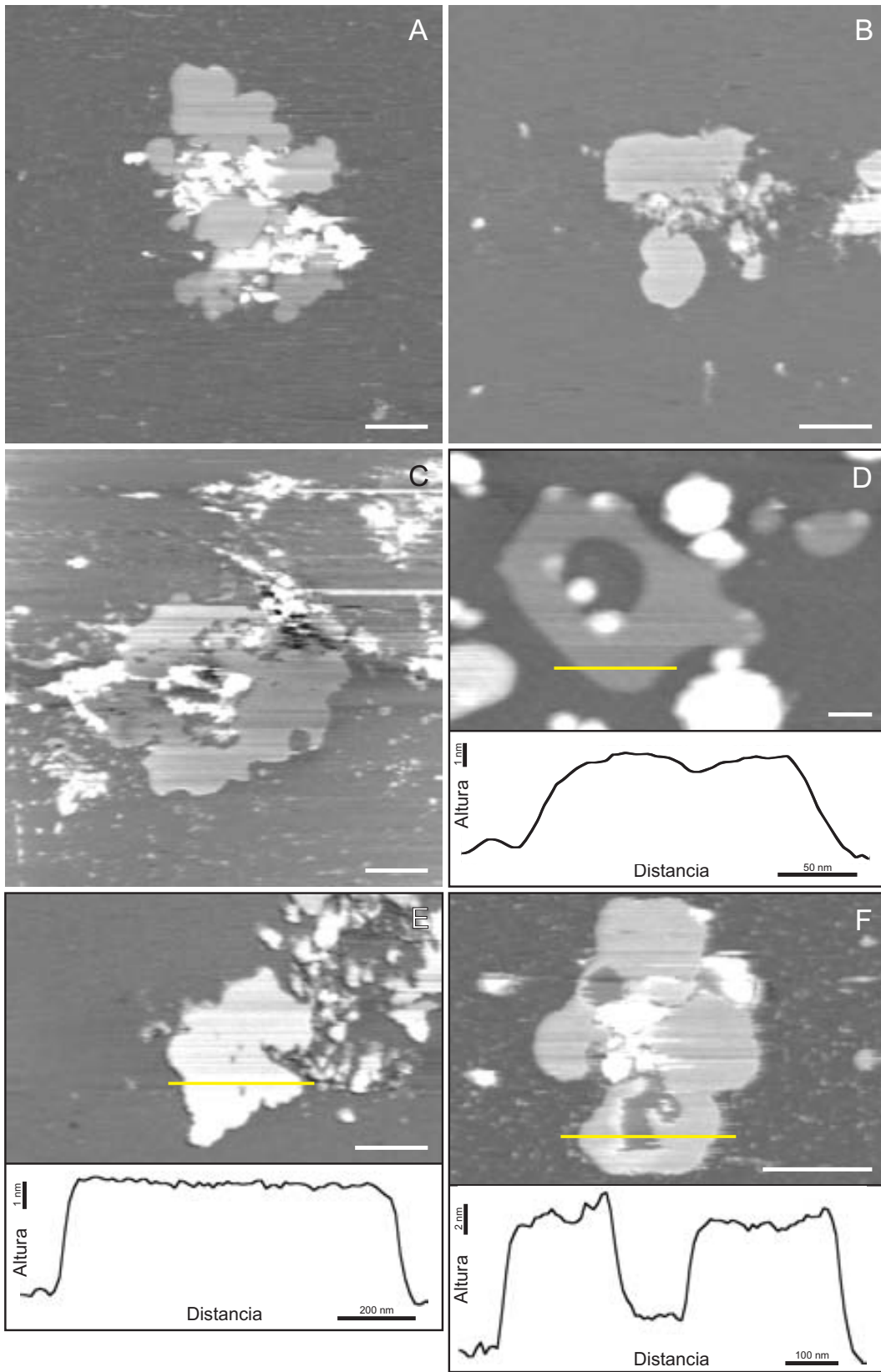
### 16.1.2. Imágenes obtenidas con el microscopio MFP 3D-BIO

En los experimentos de desnaturalización en tiempo real (ver capítulo 19) se utilizó el microscopio MFP 3D-BIO. Durante esta fase experimental se obtuvieron multitud de imágenes de placas de cromatina en condiciones nativas después de extender la muestra sobre mica recién exfoliada. En este caso la frecuencia de vibración utilizada para visualizar las placas fue de  $\sim 13$  kHz a diferencia de la que se utilizó con el multimode ( $\sim 8$  kHz, próxima a la frecuencia nominal facilitada por el fabricante; ver sección 11.4). Del mismo modo que en el microscopio *Multimode*, se observaron gran cantidad de placas (ver ejemplos en en la Figura 16.5). Con este microscopio, en algún caso, también se pudo observar placas multicapa **F**.

La facilidad de visualizar placas mediante AFM en solución, junto con los resultados obtenidos mediante TEM (ver capítulo 15), indican que las placas de cromatina son estructuras frecuentemente observadas y estables en condiciones fisiológicas.

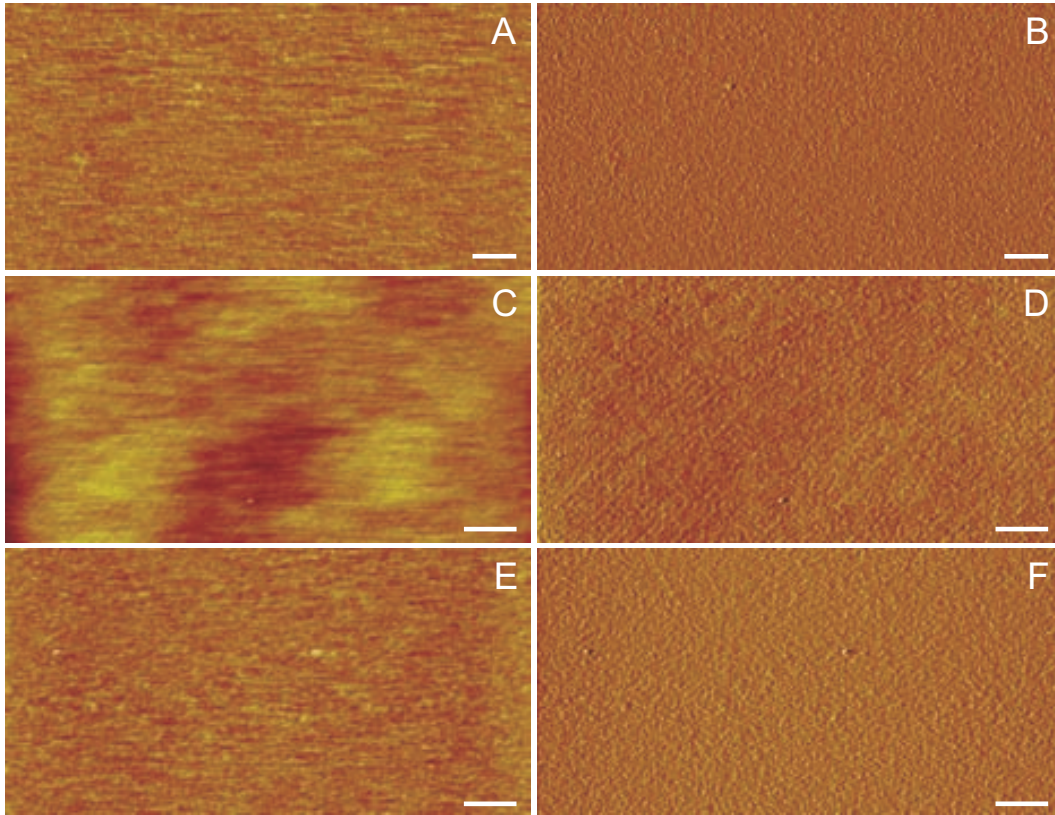
---

**Figura 16.5 (en la página siguiente): Placas visualizadas con el microscopio MFP 3D-BIO.** En la figura se pueden observar placas en solución en presencia de PME (**A**, **B**, **D-F**) o PME conteniendo  $\text{Mg}^{2+}$  14.5 mM (**C**). Las imágenes topográficas se obtuvieron con una punta triangular de 100  $\mu\text{m}$  de longitud (**A**, **B** y **D**) o de 200  $\mu\text{m}$  (**C** y **E**). El perfil de altura de cada figura corresponde a la sección delimitada por la línea de color amarillo. En **F** se pueden observar una placa que, tal como muestra el perfil de alturas, probablemente tien más de una capa. Barras: **C** 1  $\mu\text{m}$ ; **A**, **B**, **E** y **F** 500 nm; **D** 100 nm.



## 16.2. Controles en solución de AFM

Del mismo modo que en ME (sección 15.3), en AFM también se realizaron controles para descartar la posibilidad de que las placas de cromatina en solución estuvieran producidas por algún elemento presente en el tampón. En la Figura 16.6 se pueden observar ejemplos de imágenes obtenidas mediante AM-AFM *mode* en presencia de diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Ninguno de los blancos visualizados presentaba estructuras similares a las placas adsorbidas sobre mica recién exfoliada. Este resultado, muestra claramente que las placas no son debidas a la formación de cristales producidos por las sales utilizadas en los tampones. Este resultado era totalmente predecible, ya que, la solubilidad de las sales utilizadas es superior a 1 M, que es aproximadamente  $10^3$  veces superior a las concentraciones salinas que contenían los tampones usados en la visualización de placas en solución (ver Tabla 21.1, pág. 222).



**Figura 16.6: Controles de AFM visualizados con el microscopio *Multimode*.** En esta figura se muestran imágenes obtenidas en presencia de PME conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM (**A** y **B**) 10 mM (**C** y **D**), y 20 mM (**E** y **F**). (**B**, **D** y **F**) Imágenes de amplitud mostradas, respectivamente, en **A**, **C** y **E** como imágenes topográficas (AM-AFM *mode*). Barras: **C–F** 1  $\mu$ m; **A** y **B** 200 nm.

### 16.3. Placas visualizadas en diferentes concentraciones de $Mg^{2+}$

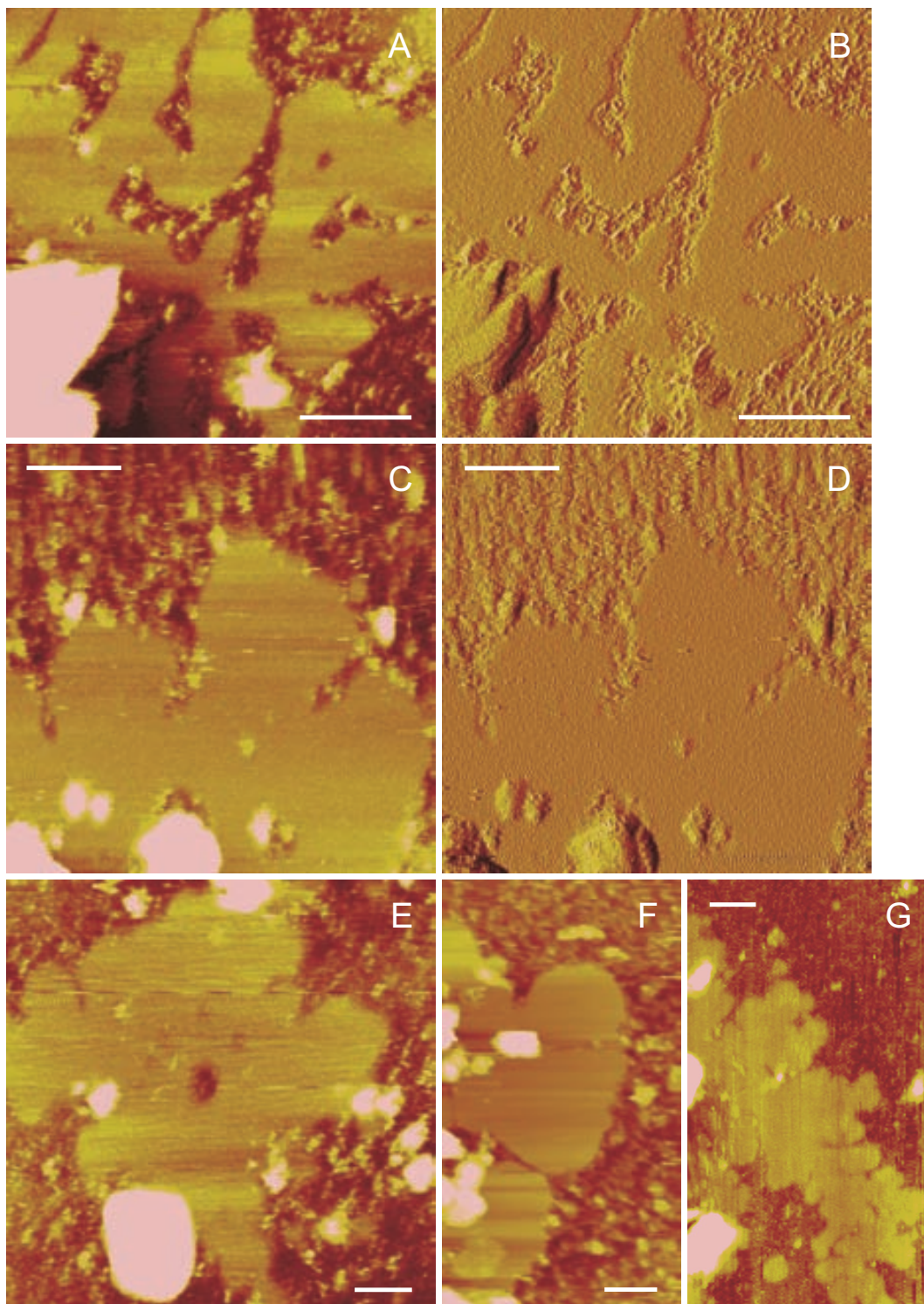
Durante el ciclo celular las condiciones iónicas en el interior de la célula varían (ver sección 5.1). Strick et al. (2001) determinaron mediante SIMS que la concentración de  $Mg^{2+}$  en el interior del cromosoma metafásico era 12–22 mM. Teniendo en cuenta estos datos se analizaron placas de cromatina en presencia de diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  (10–30 mM). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.7. Los resultados obtenidos mediante preparación típica en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM se han presentado en las Figuras 16.1–16.4.

En todas las condiciones se obtuvieron imágenes de placas muy bien formadas. Sin embargo, en comparación con la condición típica ( $Mg^{2+}$  5mM), a medida que se incrementaba la concentración de  $Mg^{2+}$  las imágenes no eran tan nítidas (ver **C**,

**E** y **G** en comparación con las figuras de la sección 16.1.1). Probablemente, esto es debido a una mayor agregación causada por el efecto estructurante del  $\text{Mg}^{2+}$ , que provocaba que la punta de AFM se enganchara y arrastrara parcialmente el material.

---

**Figura 16.7 (en la página siguiente): Placas visualizadas en diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$ .** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1) conteniendo tampón PME, se dializaron en solución durante 4 h (sección 9.5.2), se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y finalmente se adsorbieron sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Después de la adsorción se realizó un lavado e incubación a RT ( $\geq 5$  min) en PME conteniendo  $\text{Mg}^{2+}$  a las concentraciones: 10 mM (**A**, **B**), 15 mM (**C**, **D**), 20 mM (**E**, **F**) y 30 mM (**G**). (**A**, **C**, **E** y **G**) Son imágenes topográficas; (**B** y **D**) son imágenes de amplitud de **A** y **C**. (**F**) Imagen en *contact mode*. Barras: 200 nm.



## 16.4. Placas visualizadas con puntas derivadas

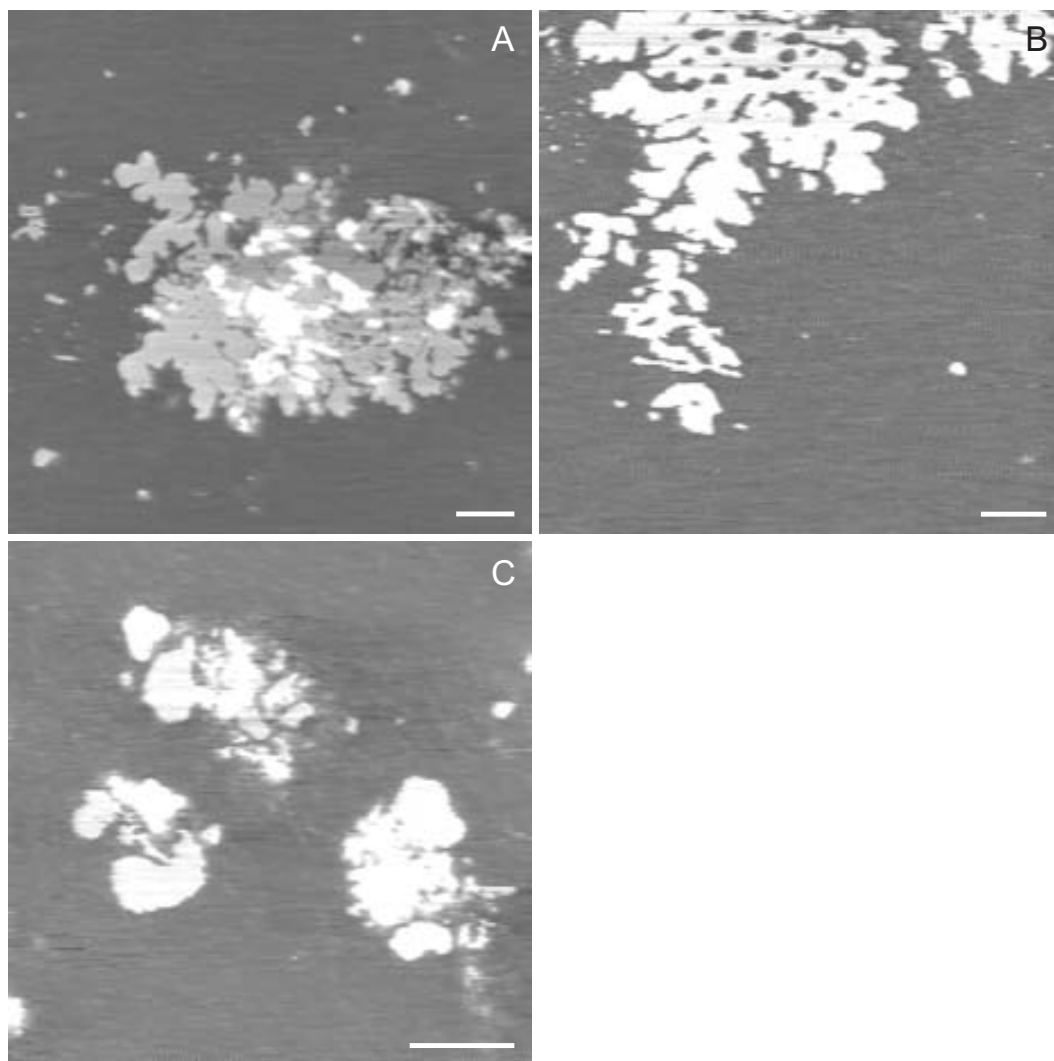
La derivación de puntas (sección 11.6) se llevó a cabo en un intento de realizar un tipo de experimento de AFS llamado *force-clamp* (Wiita et al., 2007). En este tipo de experimento, se derivó las puntas de tal manera que en el extremo tuviéramos moléculas de psoralen<sup>®</sup>. Esta es una molécula fotosensible capaz de unirse covalentemente al DNA (ver sección 11.6.2). La idea era unir a la punta el DNA presente en las placas y utilizar el método del *force-clamp* para ir estirando la cromatina de su interior. Este tipo de experimento fracasó debido a la complejidad de trabajar con cromatina agregada de elevado peso molecular. En el intento de realizar este tipo de experimento se realizaron imágenes topográficas con puntas derivadas con psoralen<sup>®</sup> (Figura 16.8A y B) y con silanos (ver sección 11.6.1; Figura 16.8C). Los resultados obtenidos, indican que es posible obtener imágenes de las placas utilizando puntas modificadas químicamente.

## 16.5. Placas multicapa

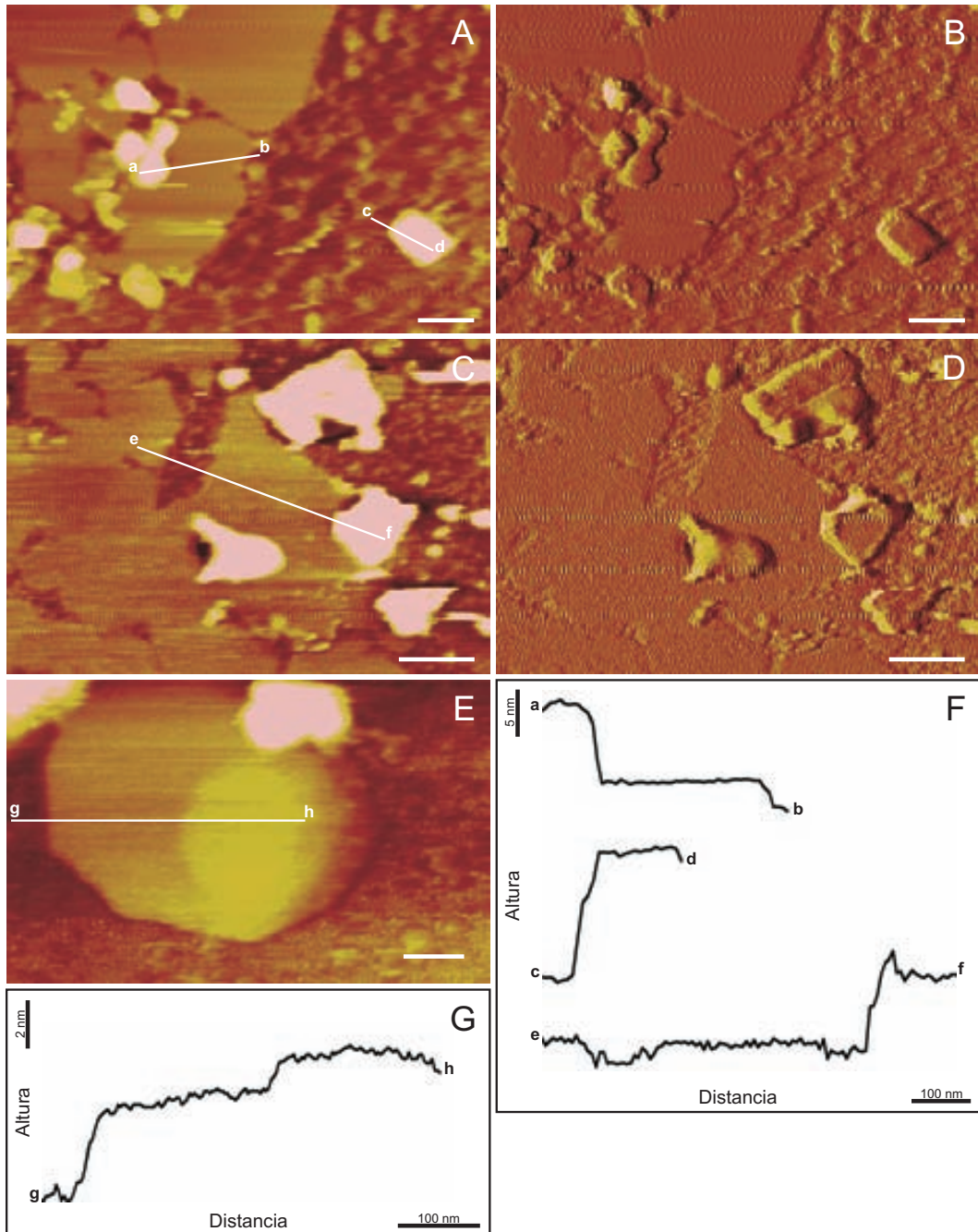
Las placas de cromatina tienen la propiedad de contactar por las caras formando estructuras multilaminares. Este fenómeno es recurrente en las observaciones mediante TEM (ver Figuras 15.1, pág. 127 ó 15.2, pág. 128), pero en AFM era un fenómeno aparentemente menos usual. En la Figura 16.9 (pág. 168) se pueden observar ejemplos de placas que presentan esta propiedad. En E se muestra un ejemplo de multicapa en solución; si nos fijamos en el perfil delimitado por  $\overline{gh}$  veremos claramente un trazado escaleriforme debido a la superposición de las placas de cromatina. En AFM se realizaron curaciones (ver sección 11.8.1) para determinar si las placas en solución presentaban esta propiedad en mayor proporción. En general las muestras estudiadas a las que se les realizó una curación no presentaban una mayor proporción de multicapas, pero en algún caso (C y E) se pudo observar este fenómeno de apilamiento.

El hecho de que en las muestras de AFM se observen multicapas ocasionalmente, puede ser debido a que en AFM la sonda perturba parcialmente las placas, provocando la reorganización interna de la cromatina. Hay que recordar que en AFM las placas están en solución sin ningún tipo de fijación. Esta alteración de la muestra puede estar relacionada con el hecho de que en la visualización de placas a elevada magnificación no se observe un patrón evidente en la superficie (sección 16.1.1). También puede estar relacionado con la obtención de alturas aparentemente más bajas a partir de perfiles topográficos de AFM (ver sección 18.2).





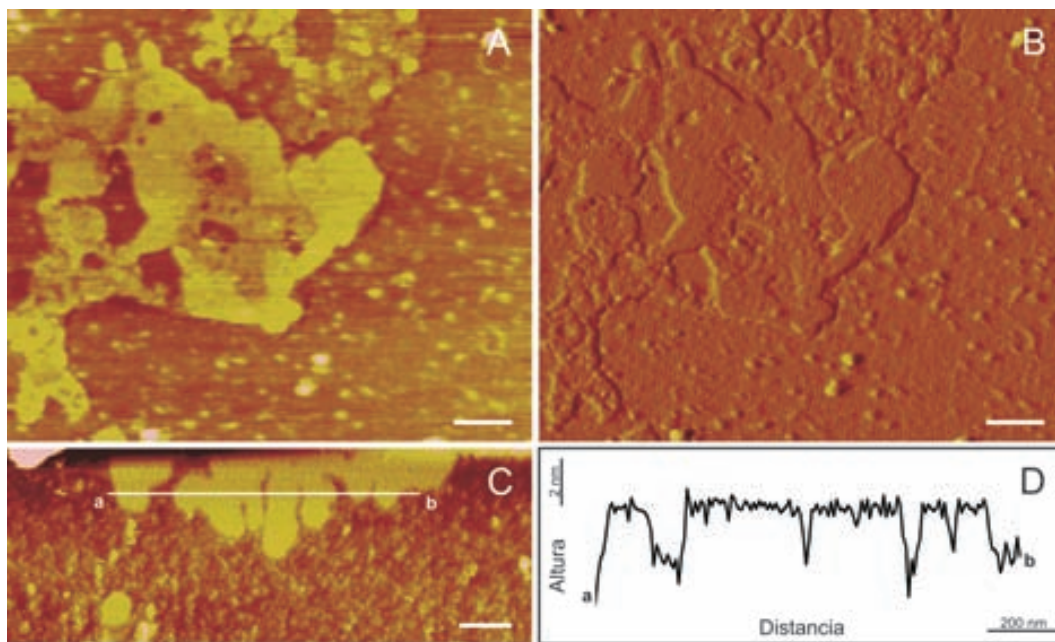
**Figura 16.8: Placas visualizadas con puntas derivadas.** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1) conteniendo tampón PME, se dializaron en solución durante 4 h (sección 9.5.2), se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y finalmente se adsorbieron sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Después de la adsorción se realizó un lavado e incubación a RT ( $\geq 5$  min.) en PME. (A–C) Imágenes topográficas. (A y B) Imágenes obtenidas con puntas derivadas con psoralen<sup>®</sup>. (C) Imagen obtenida con una punta silanada. Barras: 500 nm.



**Figura 16.9: Placas que presentan formaciones multicapa.** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializaron en solución durante 4 h (sección 9.5.2) y se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6). Después de la adsorción se realizó un lavado e incubación a RT ( $\geq 5$  min) en PME conteniendo  $Mg^{2+}$  a las concentraciones: 5 mM (E) y 20 mM (A, B). (C y D) Placas extendidas mediante centrifugación y posteriormente curadas *overnight* a 4 °C en tampón PME. (A, C y E) Imágenes topográficas; (B y D) Imágenes de amplitud. (F y G) Perfiles de altura correspondientes a las secciones delimitadas por las líneas en A, C y E. Barras: A–D 200 nm; E 100 nm.

## 16.6. Visualización de placas en *contact mode*

Debido a que las imágenes obtenidas mediante AM-AFM *mode* a gran magnificación no revelaban ningún patrón estructural interno, se realizaron imágenes topográficas en *contact mode* (sección 6.2.2.1), en presencia de diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ , para intentar visualizar las placas de cromatina con una mayor resolución. En la Figura 16.10 se pueden observar algunos ejemplos de placas visualizadas en seco (**A** y **B**) o en solución (**C**) mediante *contact mode*. La imagen **F** de la Figura 16.7 (pág. 165) también fue obtenida en *contact mode* en medio líquido. Los resultados con esta aproximación tampoco aportaron datos indicativos de un patrón definido en la superficie de las placas. Sin embargo, la visualización de placas de cromatina mediante *contact mode* en medio acuoso, confirma que las placas son estructuras estables y resistentes.



**Figura 16.10: Placas visualizadas mediante *contact mode*.** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializaron en solución durante 4 h (sección 9.5.2) y se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6). Después de la adsorción se realizó un lavado e incubación a RT ( $\geq 5$  min) en PME conteniendo  $Mg^{2+}$  a las concentraciones: 20 mM (**A** y **B**) y 25 mM (**C**). (**A** y **B**) Placas a las que adicionalmente se les realizó un proceso de entrecruzamiento (en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM) y una posterior deshidratación (secciones 11.9 y 11.10 respectivamente). (**A** y **C**) Imágenes topográficas; (**B**) Imagen de deflexión. En **A** se puede apreciar como la placa presenta una estructura multilaminar. (**D**) representación del perfil de altura correspondiente a la sección delimitada por la línea  $\overline{ab}$  en **C**. Barras: **A–C** 200 nm.

## 16.7. Alteración estructural de la placa mediante raspados

Las placas de cromatina son estructuras estables, como lo demuestran los experimentos visualizados mediante TEM, AM-AFM *mode*, e incluso mediante *contact mode* (en solución). En un intento de caracterizar mejor las propiedades estructurales y la cohesión de las placas de cromatina, se realizaron raspados sobre diferentes puntos de la placa<sup>2</sup>. En las Figuras 16.11 y 16.12 (pág. 172) se pueden observar ejemplos de este procedimiento experimental.

El comportamiento de la placa variaba en función de la zona de raspado. Cuando el raspado se realizaba en una zona interna (Figura 16.11C→E y 16.12C→D) la estructura de la placa permanecía esencialmente inalterada; sólo en algún caso se podía observar la reorganización y/o desaparición de algún agujero interno. Sin embargo, cuando la zona de raspado incluía los bordes de la placa, el comportamiento era totalmente diferente. En estos casos la placa se rompía exactamente por la zona en la que se realizaba el raspado (ver ejemplo en Figura 16.11A→C; y resultados más claros en la Figura 16.12A→C y D→E).

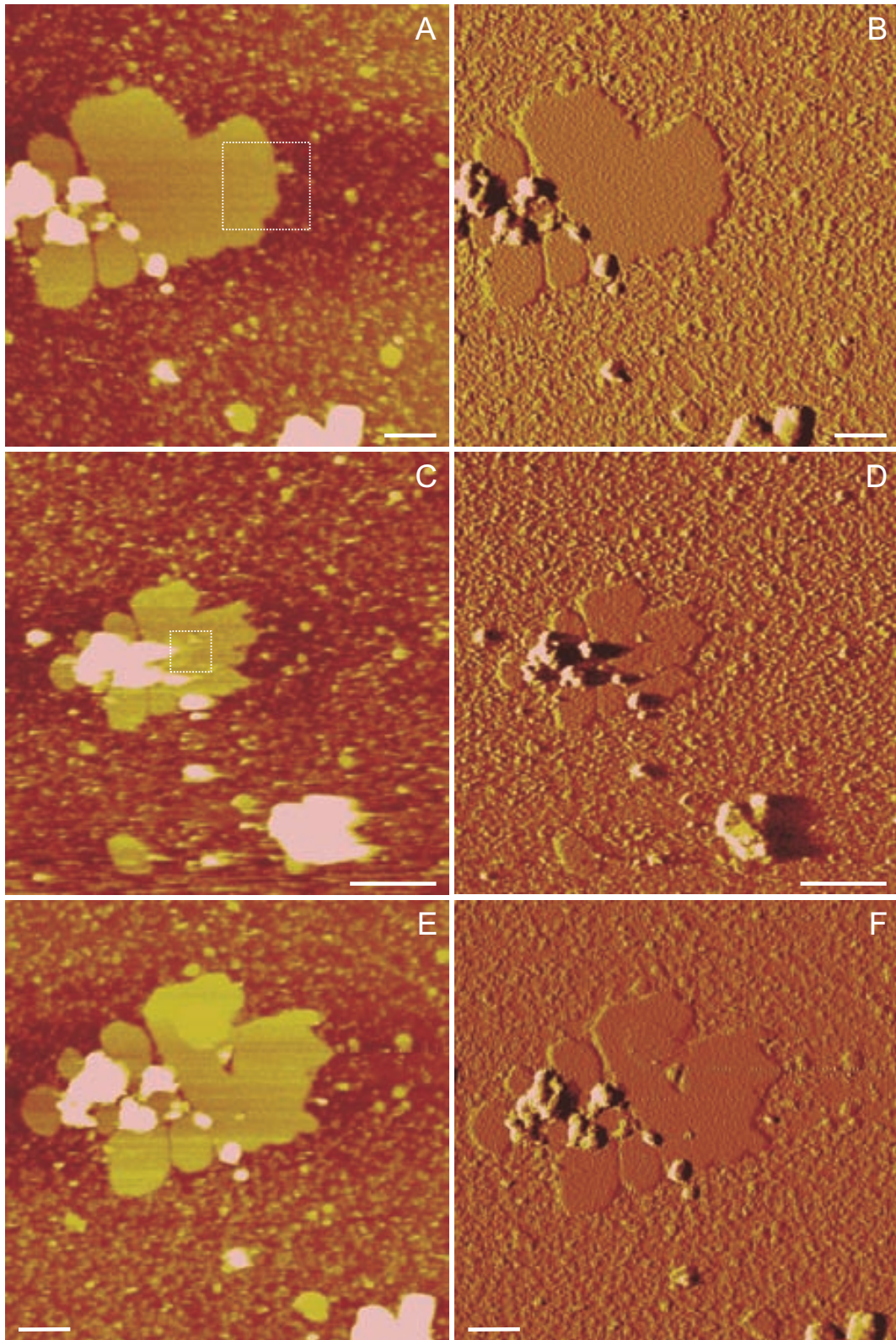
Estos resultados sugieren que el filamento de cromatina forma un tejido que está fuertemente cohesionado en las regiones internas de la placa, pero que es más fácilmente desestructurable en las zonas periféricas.

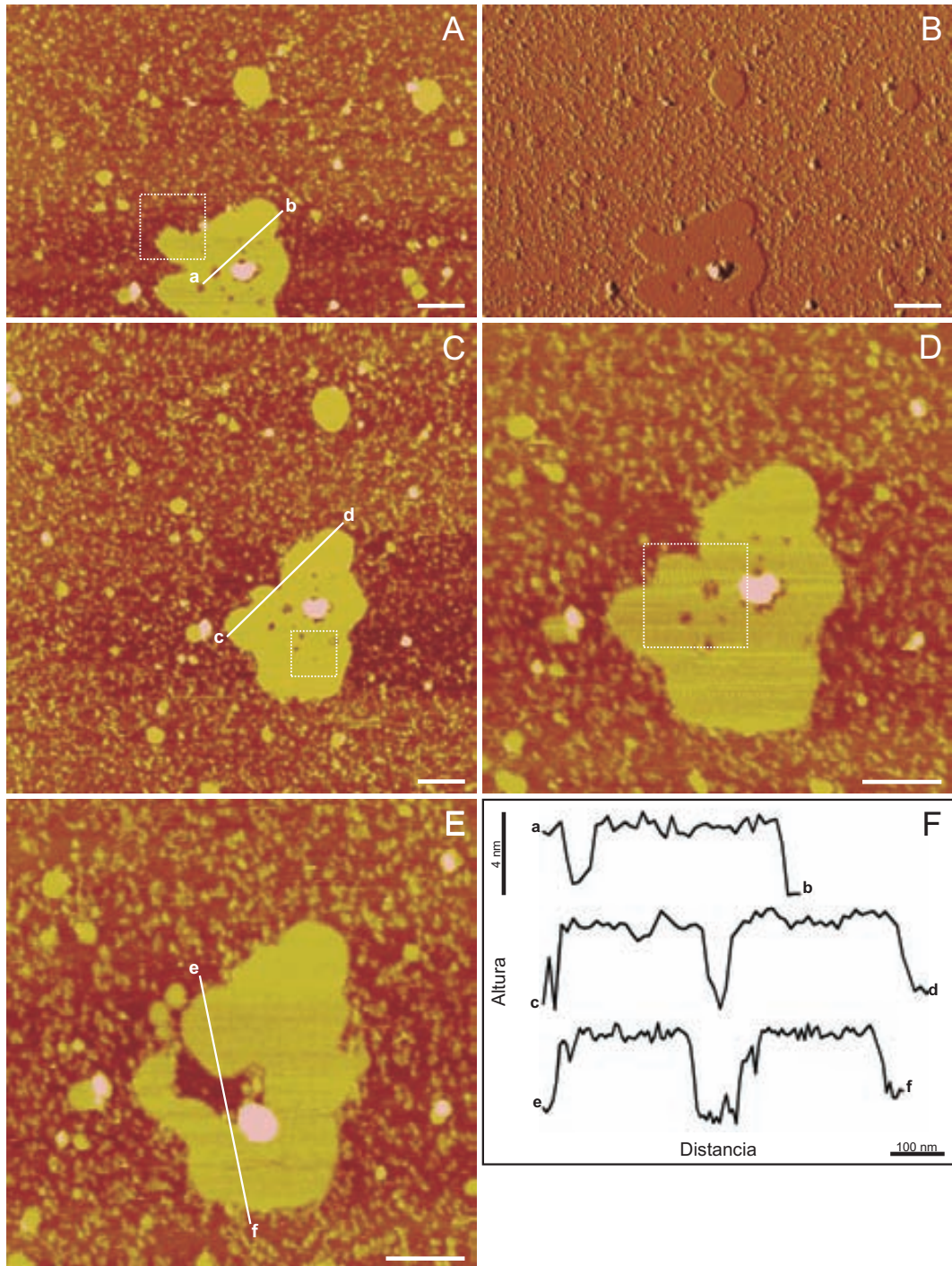
---

<sup>2</sup>El raspado consistía en realizar una imagen en *contact mode*, aplicando mucha fuerza, en una zona concreta de la placa.

---

**Figura 16.11 (en la página siguiente): Placas a las que se les ha realizado un raspado (serie 1).** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializaron en solución durante 4 h (sección 9.5.2), se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y finalmente se extendieron sobre mica por adsorción en PME (sección 11.8.2). (A, C y E) Imágenes topográficas; (B, D y F) Imágenes de amplitud. En C se observa la placa después de realizar un raspado en la zona delimitada por el cuadro indicado en A. (E) Placa después de realizar un raspado en la zona delimitada por el cuadro indicado en C. Barras: C y D 500 nm; A, B, E y F 200 nm;





**Figura 16.12: Placas a las que se les ha realizado un raspado (serie 2).** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializaron en solución durante 4 h (sección 9.5.2), se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y finalmente se extendieron sobre mica por adsorción en PME (sección 11.8.2). (A, C–E) Imágenes topográficas. (B) Imagen de amplitud. (C) Placa después de realizar un raspado en la zona delimitada por el cuadro indicado en A. (D) Placa después de realizar un raspado en la zona delimitada por el cuadro indicado en C. (E) Placa después de realizar un raspado en la zona delimitada por el cuadro indicado en D. (F) Representación de los perfiles de altura correspondientes a las secciones delimitadas por las líneas en A, C y E. Barras: A–E 200 nm.

## Capítulo 17

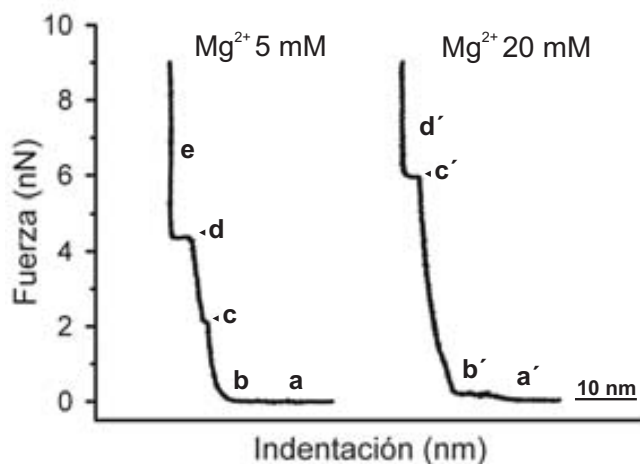
# AFS: Nanoindentación de la placa de cromatina

*La placa de cromatina tiene una consistencia mecánica que se ha ido constatando a lo largo de los diferentes experimentos realizados en esta tesis y en particular en la alteración estructural producida por los raspados (ver sección 16.7). Mediante los estudios de nanoindentación se puede realizar un análisis más detallado y cuantitativo del comportamiento mecánico (Ebner et al., 2007) de las placas de cromatina, que nos permitió evaluar la resistencia mecánica y el módulo de Young de la estructura.*

### 17.1. Propiedades mecánicas de la placa de cromatina

Para obtener información de las propiedades mecánicas de las placas se realizaron curvas de fuerza o experimentos de nanoindentación (ver sección 14.3.1). En un experimento de fuerzas la punta se va aproximando a la placa hasta contactar con ella, momento en el cual hay una compresión/deformación (ver introducción, sección 6.3.1). En la Figura 17.1 podemos observar dos ejemplos de curvas de fuerza corregidas ( $F_v$  vs.  $\delta$ ; ver sección 14.3.2). En presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM, la curva nos muestra que a parte de una deformación progresiva de la placa hay una transición (o deformación plástica) a 2 nN (**c**, salto de 0.9 nm), seguido de una transición mayor (**d**, salto de 2.9 nm) a 4.4 nN que consigue penetrar totalmente la placa hasta llegar al soporte de mica. Las curvas de fuerza de las placas en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM tienen una forma similar pero, en este caso, muestran una única transición (**c'**, salto de 2.5 nm) a una fuerza más elevada (6.2 nN). El estrés requerido para provocar las deformaciones plásticas principales en  $Mg^{2+}$  5 y 20 mM es 24 y 37 MPa, respectivamente (ver sección 14.3.4). Cuando la punta está muy cerca de la muestra se establecen fuerzas repulsivas o atractivas que provocan una deflexión del *cantilever* como se observa (regiones **b** y **b'**) en la primera parte de las curvas de fuerza (Heinz y Hoh, 1999; Zlatanova et al., 2000). Si nos fijamos en la curva de

$Mg^{2+}$  5 mM, después de la fase de aproximación de la punta (región **a**) podemos observar un incremento en la fuerza de forma exponencial. Este comportamiento es debido a una repulsión punta-muestra. En las condiciones de trabajo (pH 7.2) la punta de  $Si_3N_4$  tiene una densidad de carga negativa ( $\sigma^-$ ; Butt, 1991; Oncins et al., 2005), en consecuencia, este resultado indica que las placas de cromatina tienen una superficie con una  $\sigma^-$ . En cambio, las curvas realizadas en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM presentan un comportamiento diferente; se observa que la punta no se deflexiona tan claramente debido a la repulsión, lo cual indica que hay una reducción de la repulsión electrostática (región **b'**) entre la punta y la muestra. Este cambio en  $\sigma$  de las placas puede ser debido a que el DNA contenido en su interior esté más apantallado debido a que hay una mayor concentración de  $Mg^{2+}$ .



**Figura 17.1:** Curvas de  $F_v$  vs.  $\delta$ . Los experimentos de nanoindentación se realizaron en medio acuoso en presencia de PME conteniendo las concentraciones de  $Mg^{2+}$  indicadas. En  $Mg^{2+}$  5 mM, la primera transición (**c**) corresponde a la penetración de  $0.9 \pm 0.4$  nm que se obtuvo a  $2.0 \pm 0.6$  nN ( $n=30$ ); en la transición principal (**d**) la penetración es de  $2.9 \pm 0.6$  nm y ocurre a  $4.4 \pm 0.4$  nN ( $n=30$ ). En  $Mg^{2+}$  20 mM sólo hay una transición (**c'**) correspondiente a una penetración de  $2.5 \pm 0.3$  nm que ocurre a  $6.2 \pm 0.7$  nN ( $n=32$ ). La deflexión del *cantilever* es zero en las regiones **a** y **a'**; las regiones **b** y **b'** corresponden a una deflexión del *cantilever* producida por fuerzas repulsivas entre la punta y la muestra; en las regiones **e** y **d'** la punta está en contacto con la superficie de mica y la deflexión es muy elevada. Adicionalmente se realizó una aproximación, con el programa SPIP™, de las fuerzas a las que se establecían las transiciones en presencia de  $Mg^{2+}$  15 mM:  $6.8 \pm 1.7$  nN ( $n=78$ ); 25 mM:  $5.1 \pm 0.7$  nN ( $n=24$ ) y 30 mM:  $4.9 \pm 1.0$  nN ( $n=150$ ).



## 17.2. Determinación del módulo de Young de la placa de cromatina

La placa de cromatina es una estructura mecánicamente resistente, como lo demuestran los datos de indentación mostrados en la sección anterior y los raspados realizados en zonas internas (ver sección 16.7). No obstante, las curvas de fuerza (ver Figura 17.1) indican que las placas son flexibles y presentan un régimen elástico que nos permite determinar el módulo de Young (sección 14.3.4). Para ello se utilizó la región que va desde el inicio aparente del comportamiento elástico de la placa<sup>1</sup> hasta el punto en que se observa un comportamiento plástico. A partir de esta región se pudo calcular el módulo de Young en diferentes condiciones utilizando la ecuación de Hertz (ver sección 14.3.4). Los valores obtenidos fueron  $0.16 \pm 0.06$  GPa (n=24) y  $0.23 \pm 0.06$  GPa (n=29) en  $\text{Mg}^{2+}$  5 y 20 mM, respectivamente. En la condición de  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM, el módulo de Young correspondiente a la región que hay entre la primera transición (**c**) y la transición principal (**d**) es de  $0.16 \pm 0.06$  GPa (n=24).

---

<sup>1</sup>Esta región es muy difícil de determinar exactamente debido a que hay varios factores que intervienen. Este punto también es muy importante en la determinación de la altura de las placas a partir de las curvas de  $F_v$  vs.  $\delta$  (ver sección 18.3).



## Capítulo 18

# Determinación de la altura de las placas de cromatina

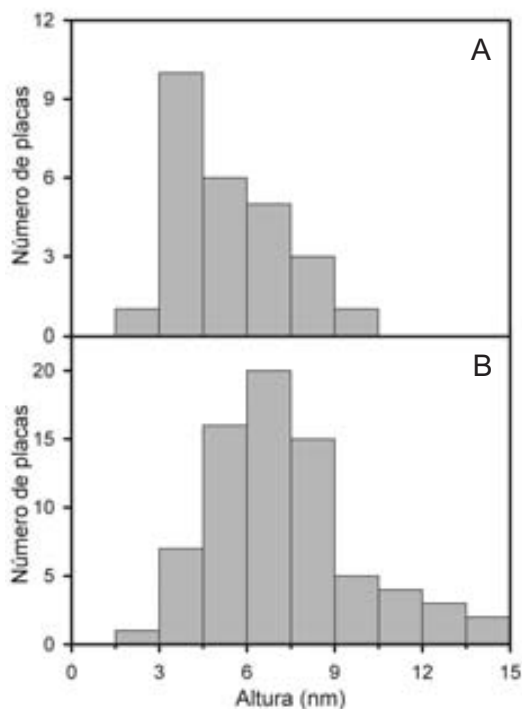
*Uno de los aspectos más importantes en la caracterización de la placa de cromatina es la determinación de su altura. Este dato nos aporta más información acerca de la disposición de la cromatina en su interior. La determinación de la altura de las placas se llevó a cabo mediante tres métodos diferentes.*

### 18.1. Distribución de alturas obtenidas con TEM

A partir de muestras platinadas unidireccionalmente se pudo determinar la altura aparente de las placas (ver sección 15.7). El cálculo de la altura se pudo realizar gracias al uso de esferas de látex de aproximadamente 90 nm de diámetro que se utilizaron como referencia interna para calcular el ángulo de platinación ( $\alpha_{ap}$ ). Una vez obtenido  $\alpha_{ap}$  se podía calcular la altura de las placas a partir de la longitud de las sombras proyectadas (ver sección 14.1.1). En la Figura 18.1 se pueden observar los histogramas obtenidos a partir los datos de altura de placas sombreadas unidireccionalmente. Utilizando esta técnica, los resultados presentaban una distribución gaussiana indicando que la altura de una placa monocapa dispuesta sobre el film de carbono era de 7.4 nm (Figura 18.1B). En las micrografías observadas (Figura 15.13, pág. 147) parecía haber diferencias de altura entre las placas dispuestas sobre otra placa y las placas monocapa dispuestas sobre el film de carbono. En la Figura 18.1A podemos ver como la altura de una placa dispuesta sobre otra placa es de 5.3 nm. Estos resultados obtenidos a partir de un elevado número de placas en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM, son similares a los obtenidos con anterioridad en nuestro grupo (Caravaca, 2004); realizados con un número pequeño de placas en diversas condiciones.

Por otra parte, en la Figura 18.1A podemos resaltar como en la zona de valores de altura más bajos, la frecuencia de placas aumenta bruscamente en el intervalo

3-4.5 nm. Probablemente, este aumento brusco es debido a que la altura mínima de las placas es de aproximadamente 4 nm. Se ha podido visualizar estas estructuras tan bajas mediante TEM, gracias al método de contarste utilizado. El uso de una platinación con un ángulo tan bajo nos ha permitido resaltar los bordes de estas estructuras, y por lo tanto observar las placas de una forma evidente.

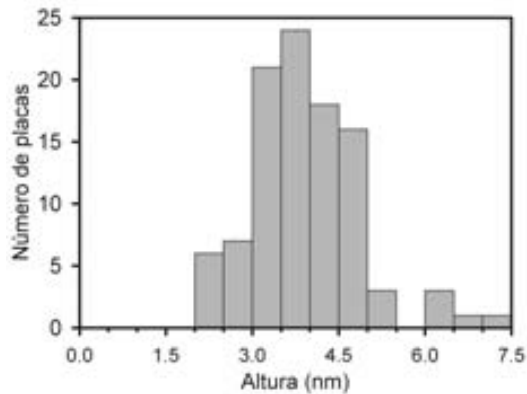


**Figura 18.1: Histogramas de la distribución de alturas obtenidas mediante TEM de las placas sombreadas unidireccionalmente. A** Altura de placas encima de otra placa con estructura multicapa ( $5.3 \pm 1.8$  nm,  $n=26$ ); **B** Altura de placas monocapa ( $7.4 \pm 2.5$  nm,  $n=77$ ). Todas estas medidas se realizaron en presencia de PME conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM.

## 18.2. Distribución de alturas obtenidas con AFM

A partir de las imágenes topográficas de AFM, obtenidas con el microscopio *Multimode*, también se pudieron obtener datos de altura de las placas en las diferentes condiciones estudiadas. Los datos se obtuvieron a partir de perfiles de altura (ver sección 14.2.1) de las placas (ver capítulo 16).

La condición más analizada en el estudio de las alturas fue el tampón PME en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM. En la Figura 18.2 se puede observar el histograma de los datos obtenidos a partir de placas monocapa, el cual presenta una distribución gaussiana indicando que la altura de las placas en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM es de  $\sim 4.0$  nm. Si comparamos los datos de altura de AFM con los obtenidos mediante TEM en las mismas condiciones iónicas (ver Figura 18.1), observaremos una reducción en la altura de las placas. Esta disminución de altura, en parte, puede ser debida a la



**Figura 18.2:** Histograma de altura obtenido mediante AFM de placas en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM. Los datos indican que las placas monocapa estudiadas tienen una altura de  $4.0 \pm 0.9$  nm ( $n=100$ ).

gran cantidad de cromatina desorganizada que se observa frecuentemente rodeando las placas (ver Figuras 16.1 y 16.2, págs. 155 y 157). Debido a la presencia de este *background* de cromatina, la punta no puede contactar totalmente con la superficie en algunas medidas y por lo tanto hay una reducción de la altura aparente.

Sin embargo, seguramente, la disminución de altura observada principalmente es debida a la compresión de las placas producida por la punta durante el escaneo (Jiao y Schäffer, 2004). Es muy importante tener en cuenta este comportamiento, ya que provoca un descenso sistemático de los datos de altura obtenidos mediante AFM. Esta compresión se ha evaluado mediante los estudios de altura a partir de curvas de fuerza (ver sección 18.3).

La Tabla 18.1 presenta los datos de altura de placas analizadas con los modos AM-AFM *mode* y *contact mode* en diferentes condiciones. Los datos indican que, en las muestras analizadas mediante AM-AFM *mode*, a medida que se incrementa la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  se puede apreciar una reducción en la altura de las placas debido a una mayor compactación de la cromatina.

Tabla 18.1: Alturas aparentes obtenidas mediante AFM

Condición <sup>a</sup>	Modo AFM	Muestra	h (nm) <sup>b</sup>	n	
EDTA <sup>c</sup> 10 mM	AM-AFM	Desnaturalización	4.3±1.0	5	
<sup>d</sup> Mg <sup>2+</sup> 5 mM	AM-AFM	Típica	4.0±0.9	100	
		Curación <sup>e</sup>	6.0±1.1	14	
		Curación-centrifugación <sup>f</sup>	3.1±0.7	17	
	<i>Contact</i>	Solución	3.4±0.4	5	
	10 mM	AM-AFM	Típica	3.9±0.8	22
			15 mM	3.0±0.4	6
			20 mM	3.2±0.6	23
	<i>Contact</i>	En seco <sup>g</sup>	2.3±0.9	3	
	25 mM		Solución	3.1±0.6	3
	30 mM	AM-AFM	Típica	2.5±0.3	7

<sup>a</sup> El material analizado en esta tabla procedía de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), al que se realizó una incubación en solución durante 4 h frente a PME (sección 9.5.2), un tratamiento mecánico (sección 9.6) y finalmente se adsorbió sobre mica.

<sup>b</sup> Los valores listados corresponden a la media  $\pm$  desviación estandar obtenida a partir de las (n) medidas. <sup>c</sup> En este caso, después de extender la muestra se realizó una desnaturalización en presencia de EDTA 10 mM, NaCl 5 mM y posteriormente se realizó un entrecruzamiento típico (sección 11.9) para su posterior análisis.

<sup>d</sup> Placas en presencia del tampón PME con la concentración indicada de Mg<sup>2+</sup>.

<sup>e</sup> Placas adsorbidas sobre mica y después curadas (ver sección 11.8.2). <sup>f</sup> Placas extendidas sobre mica mediante centrifugación y curadas (ver sección 11.8.1). <sup>g</sup> Las placas se entrecruzaron en presencia de las condiciones iónicas indicadas previamente al proceso de deshidratación (ver sección 11.10).

### 18.3. Distribución de alturas obtenida a partir de curvas

#### $F_v$ vs. $\delta$

A partir de las curvas  $F_v$  vs.  $\delta$  se puede determinar la altura de las placas de cromatina. En las curvas de fuerza de la Figura 17.1 (pág. 174) observamos que, desde el instante en que hay una interacción entre la placa y la punta, punto en el que empieza a haber una compresión de la placa (mirar región **b** o **b'**), hasta el momento en el que la punta contacta con el soporte de mica (regiones **e** y **d'**), existe un desplazamiento a partir del cual podemos extraer la altura de las placas. Para determinar rigurosamente la altura hay que tener en cuenta que existe una incertidumbre; en la región **b** se produce una repulsión entre la punta y la placa que provoca la compresión progresiva de ésta antes de que se establezca un contacto real punta-placa. Este fenómeno dificulta la determinación exacta del punto a partir del cual empieza la compresión de la placa. Actualmente no existe ningún método que permita delimitar objetivamente los dos procesos. Sin embargo, observando detalla-

damente toda la serie de curvas realizadas se puede estimar el punto a partir del cual se establece mayoritariamente el fenómeno de compresión de las placas. Este punto también es crítico en la determinación de la zona de comportamiento elástico para realizar el cálculo del módulo de Young (sección 17.2). El análisis a partir de las curvas de fuerza indica que las placas en el tampón PME presentan una altura de  $6.8 \pm 0.9$  nm ( $n=30$ ) y de  $6.1 \pm 1.3$  ( $n=32$ ) en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM y 20 mM, respectivamente. Esta estimación de altura es compatible con los resultados obtenidos mediante TEM (sección 18.1).





## Capítulo 19

# Desnaturalización en tiempo real de las placas de cromatina

*Las observaciones mediante TEM de placas desnaturalizadas en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (sección 15.6) y el comportamiento mecánico en diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> (capítulo 17), es coherente con una estructura formada por cromatina. Para realizar un análisis más detallado de las propiedades de las placas, indirectamente de su composición, se realizaron una serie de experimentos de desnaturalización monitorizando en tiempo real, mediante AFM, el comportamiento de las placas en solución.*

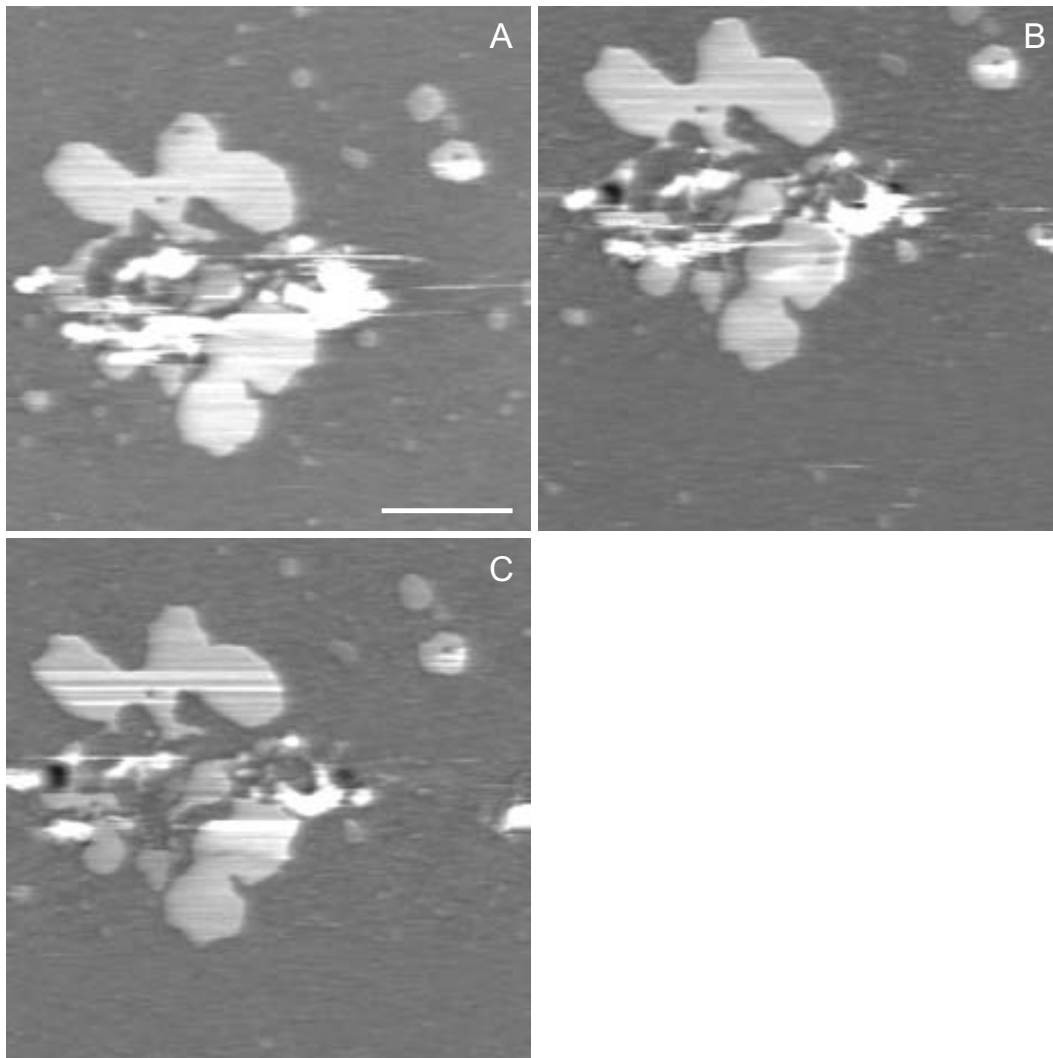
### 19.1. Control de adición en tiempo real del tampón

Para poder realizar esta aproximación experimental se obtenían imágenes antes y después de introducir un volumen determinado del agente desnaturalizante a medida que se iba escaneando la muestra (ver sección 13.3). Para evaluar si la introducción del volumen provocaba *per se* un efecto sobre la integridad estructural de las placas, se realizó un blanco que consistía en realizar el procedimiento de introducción del tampón en el cual estaban las placas. En la Figura 19.1 se puede observar que después de la introducción de tampón (después de **A**) las placas no sufren ninguna alteración (**B** y **C**). Esto demuestra que el método utilizado en la adición de los agentes desnaturalizantes no altera el proceso de adquisición de las imágenes ni la estructura de las placas.

### 19.2. Placas desnaturalizadas por adición de EDTA

El Mg<sup>2+</sup> es un ion muy estructurante que ha sido ampliamente utilizado en el campo de la cromatina (ver sección 4.3). En principio, si se elimina el Mg<sup>2+</sup> presente en la solución, debería producirse la desestructuración de las placas de cromatina

a medida que se van obteniendo las imágenes. En estos experimentos se utilizó el



**Figura 19.1: Blanco de desnaturalización en tiempo real** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se lavó la muestra con PMC. (A–C) Imágenes topográficas. Después de **A** se eliminó cuidadosamente un volumen de 70  $\mu\text{l}$  de tampón y se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de PMC fresco (ambos procesos sin que la punta dejase de escanear la superficie). (**B**) Imagen tomada justo después de añadir el tampón; (**C**) Imagen obtenida inmediatamente después de **B** (5 min después de haber introducido el tampón PMC). Barra: 500 nm.

EDTA<sup>1</sup> para provocar la eliminación del Mg<sup>2+</sup>.

En la Figura 19.2 (pág. 186) se observan algunas de las imágenes de una serie en la que se añadió EDTA a diferentes tiempos (ver sección 13.3). En este tipo de experimento siempre se realizaba un control (**A** y **B**). Esto permitía comprobar la estabilidad de las placas antes de la introducción del agente desnaturalizante. Después de añadir EDTA 40 mM la placa se desestructuró parcialmente, como se puede observar en **C**. Al añadir reiteradamente EDTA, la placa se desestructuró totalmente como se observa en **D** y **E**. Estos datos demuestran que el EDTA afecta la integridad estructural de las placas.

### 19.3. Placas desnaturalizadas por adición de NaCl

El NaCl a concentraciones elevadas (por encima de 0.6 M) provoca la desnaturalización de la cromatina, como ya se indicó en la sección 15.6. Mediante AFM podemos monitorizar en medio acuoso y en tiempo real el comportamiento de las placas en presencia de concentraciones elevadas de NaCl.

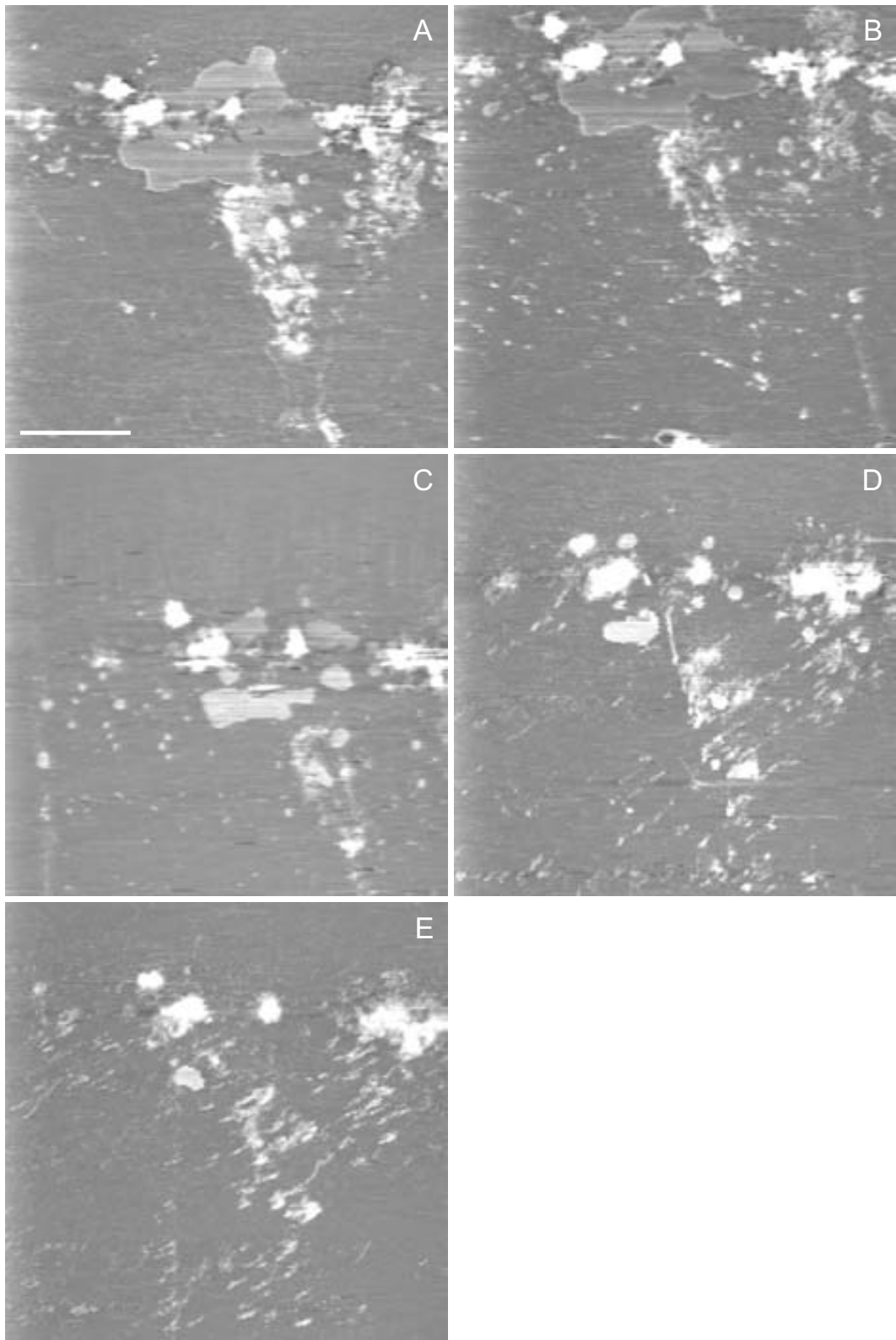
En la Figura 19.3C (pág. 187) se puede observar cómo después de añadir una solución concentrada de NaCl las placas se desnaturalizan totalmente. En la Figura 19.4 (pág. 188) observamos otro ejemplo del mismo comportamiento. En este caso, después de realizar las imágenes de estabilidad (**A** y **B**), se adicionó una solución concentrada de NaCl que provocó una clara desnaturalización de las placas (**C**), y nuevamente se reañadió el mismo volumen de NaCl que provocó una desnaturalización prácticamente total de las placas (**D**). En la Figura 19.5 (pág. 189), se puede observar otro ejemplo más del efecto de una elevada concentración de NaCl sobre las placas. Estos resultados muestran que las placas en solución tienen el comportamiento esperado para la cromatina en presencia de elevadas concentraciones de NaCl.

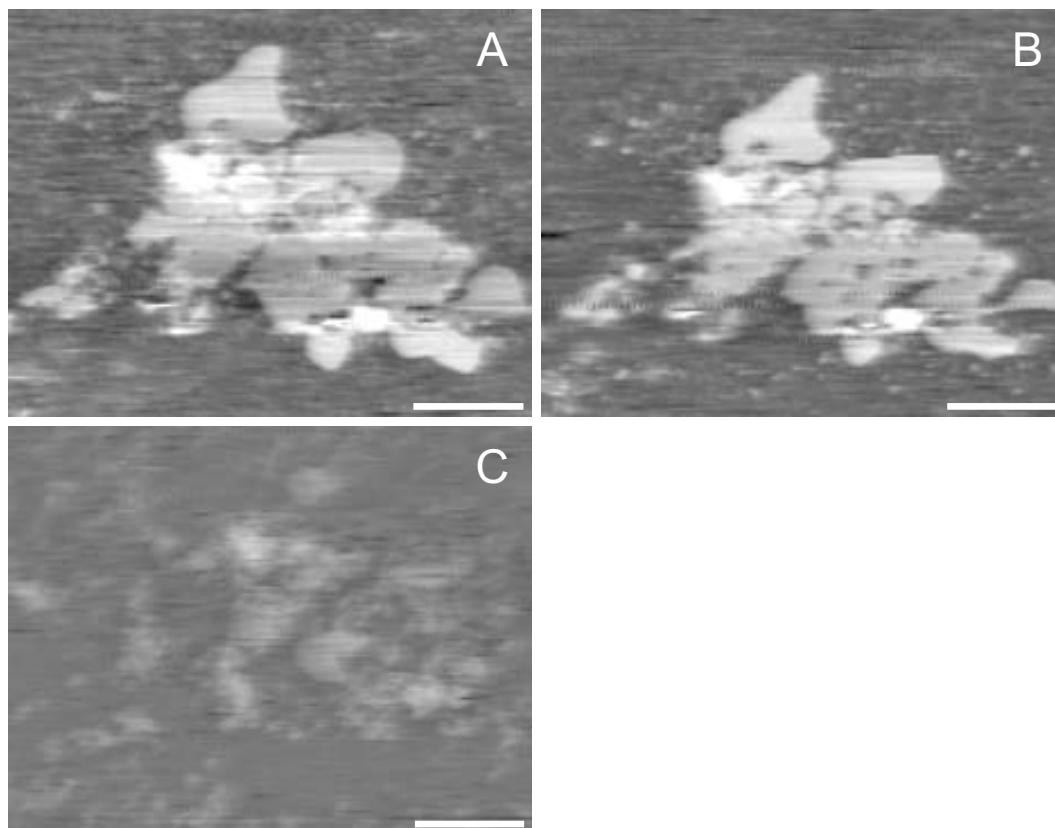
---

<sup>1</sup>El EDTA es una molécula quelante que tiene una elevada afinidad por iones divalentes.

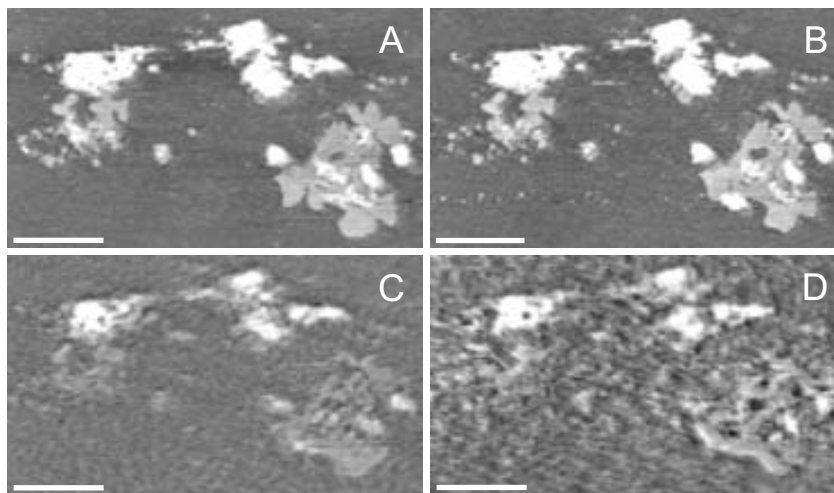
---

**Figura 19.2 (en la página siguiente): Monitorización en tiempo real de la desnaturalización de placas en presencia de EDTA.** Los cromosomas se purificaron mediante un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializaron en solución durante 4 h a RT (sección 9.5.2), se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y finalmente se extendieron por adsorción (sección 11.8.2). (**A–E**) Imágenes topográficas. (**A** y **B**) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa. El registro del tiempo se inició al añadir la primera dosis de agente desnaturalizante. (**C**) Placa parcialmente desnaturalizada (t=13 min) después de añadir 10  $\mu$ l de tampón desnaturalizante (EDTA 40 mM, Pipes 5mM pH 7.2). (**D**) Restos de una placa (t=50 min) después de reañadir 10  $\mu$ l (t=28 min) de la misma solución desnaturalizante. (**E**) Imagen adquirida en el min 180 después de reañadir 20  $\mu$ l (t=54 min) y 40  $\mu$ l (t=60 min) de solución desnaturalizante. Barra: 1  $\mu$ m.

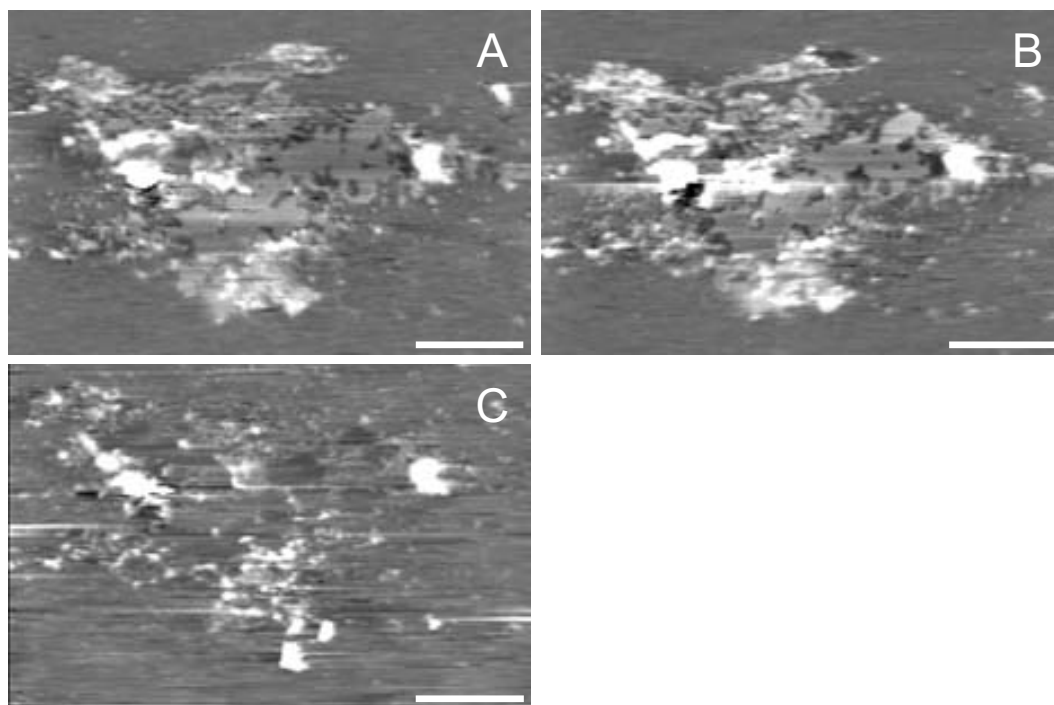




**Figura 19.3: Monitorización en tiempo real de la desnaturalización de placas en presencia de NaCl (serie 1).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). (A y B) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa antes de añadir el agente desnaturalizante. (C) Imagen obtenida 43 min después de añadir 40  $\mu$ l de NaCl 4 M, Pipes 5 mM pH 7.2. Barras: 500 nm.



**Figura 19.4: Monitorización en tiempo real de la desnaturalización de placas en presencia de NaCl (serie 2).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). (**A y B**) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa. (**C**) Imagen obtenida ( $t=8$  min) después de añadir  $10 \mu\text{l}$  de NaCl 4 M, Pipes 5 mM pH 7.2. (**D**) Imagen obtenida ( $t=13$  min) después de realizar una readición de  $10 \mu\text{l}$  de la misma solución desnaturalizante. Barras:  $1 \mu\text{m}$ .



**Figura 19.5: Monitorización en tiempo real de la desnaturalización de placas en presencia de NaCl (serie 3).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). (A y B) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa. (C) Imagen obtenida ( $t=19$  min) después de añadir  $80 \mu\text{l}$  ( $t=5$  min) de NaCl 4 M, Pipes 5 mM pH 7.2. Barras:  $2 \mu\text{m}$ .

## 19.4. Digestión de las placas con proteasas

En las secciones anteriores (19.2 y 19.3) se han ensayado dos agentes desnaturalizantes que alteran la concentración iónica, y que han sido ampliamente utilizados en el estudio de la cromatina. Los resultados obtenidos se pueden interpretar como que las placas están constituidas por cromatina. Sin embargo, existen diversas biomoléculas que pueden ver alteradas sus propiedades autoasociativas por cambios en la fuerza iónica del medio. Estudios anteriores realizados sobre cromosomas, han demostrado que la proteólisis afecta la estructura (Tamayo, 2003a) y la biomecánica (Pope et al., 2006) de los cromosomas. Si asumimos que las placas son un elemento estructural del cromosoma y que por lo tanto están formadas por cromatina, estas deberían ser susceptibles a la digestión con proteasas ya que las proteínas histonas son, junto al DNA, uno de los componentes principales del cromosoma metafásico (Uchiyama et al., 2005).

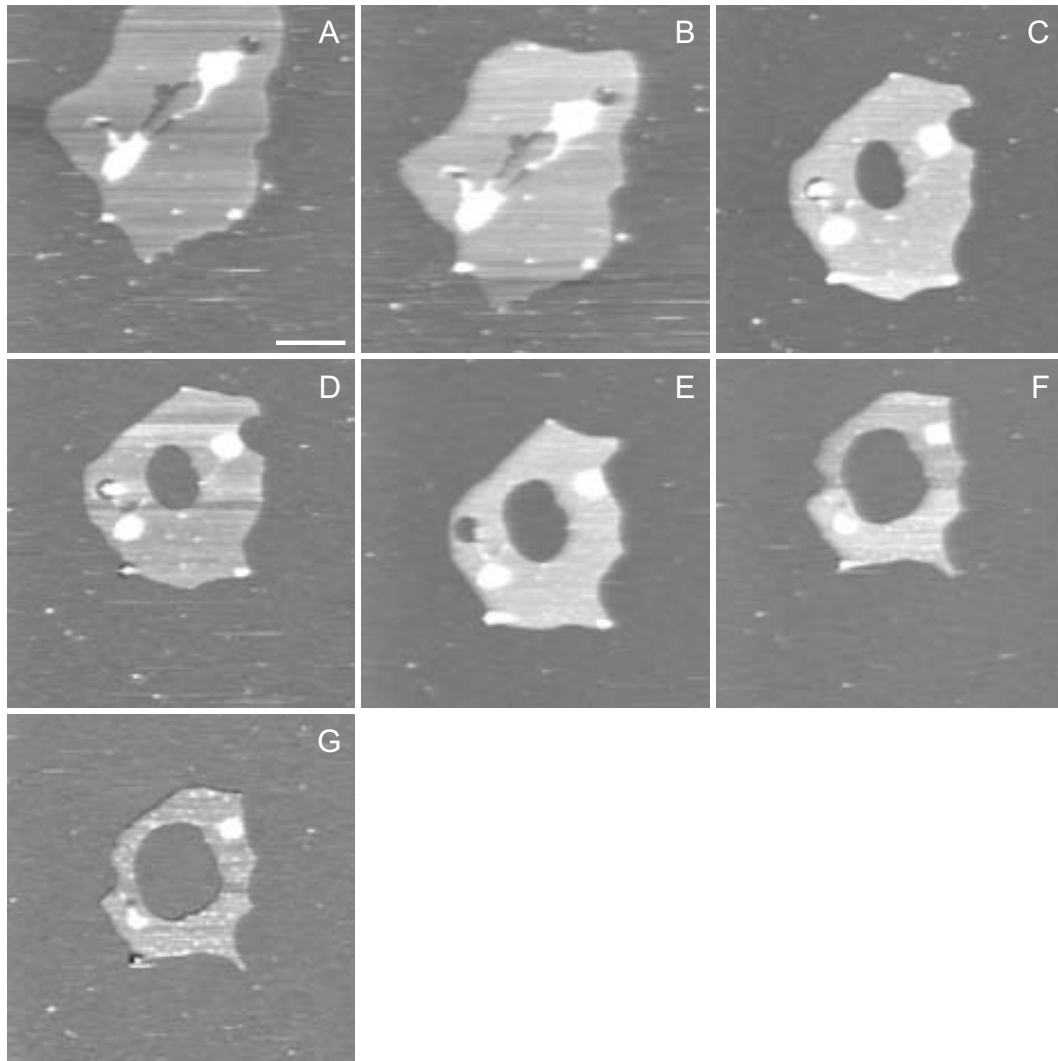
El material, después de ser adsorbido sobre mica, se lavó con tampón PMC y se realizaron dos proteólisis diferentes; en presencia de pronasa o tripsina disueltas en PMC (ver sección 13.1)

La digestión con pronasa mostró tener un efecto de desnaturalización progresiva sobre las placas. Después de obtener las imágenes de estabilidad (Figura 19.6A y B) se añadió diversas veces pronasa a diferentes concentraciones a lo largo del experimento (C–G; mirar pie de Figura). En este caso la placa presentó el agrandamiento de un agujero interno y la progresiva reducción de la periferia de la placa (ver C o G). La tripsina tuvo un comportamiento mucho más agresivo sobre la estructura de las placas. Después de realizar la adición de tripsina (1 mg/ml; Figura 19.7, pág. 192) las placas se desestructuraron totalmente en un tiempo relativamente corto. En algunos casos (y para diferentes agentes desnaturalizantes) en la fase inicial de la desnaturalización se podía visualizar la silueta de la placa de forma difusa como se indica (\*) en la Figura 19.7C. Esto pudo ser debido a que la placa se vuelve “esponjosa”, de manera que la punta al pasar por encima la comprime, obteniendo una imagen poco contrastada respecto el fondo, hasta llegar al punto de desestructurarla totalmente (D). De hecho, aunque hay una pérdida de la cohesión estructural, siempre queda material en la zona de la placa. Este fenómeno tiene sentido ya que, en este caso<sup>2</sup>, sigue habiendo una continuidad en el filamento de DNA de las placas y por lo tanto la punta va perturbando el material digerido por las proteasas, que todavía mantiene una cierta cohesión estructural.

---

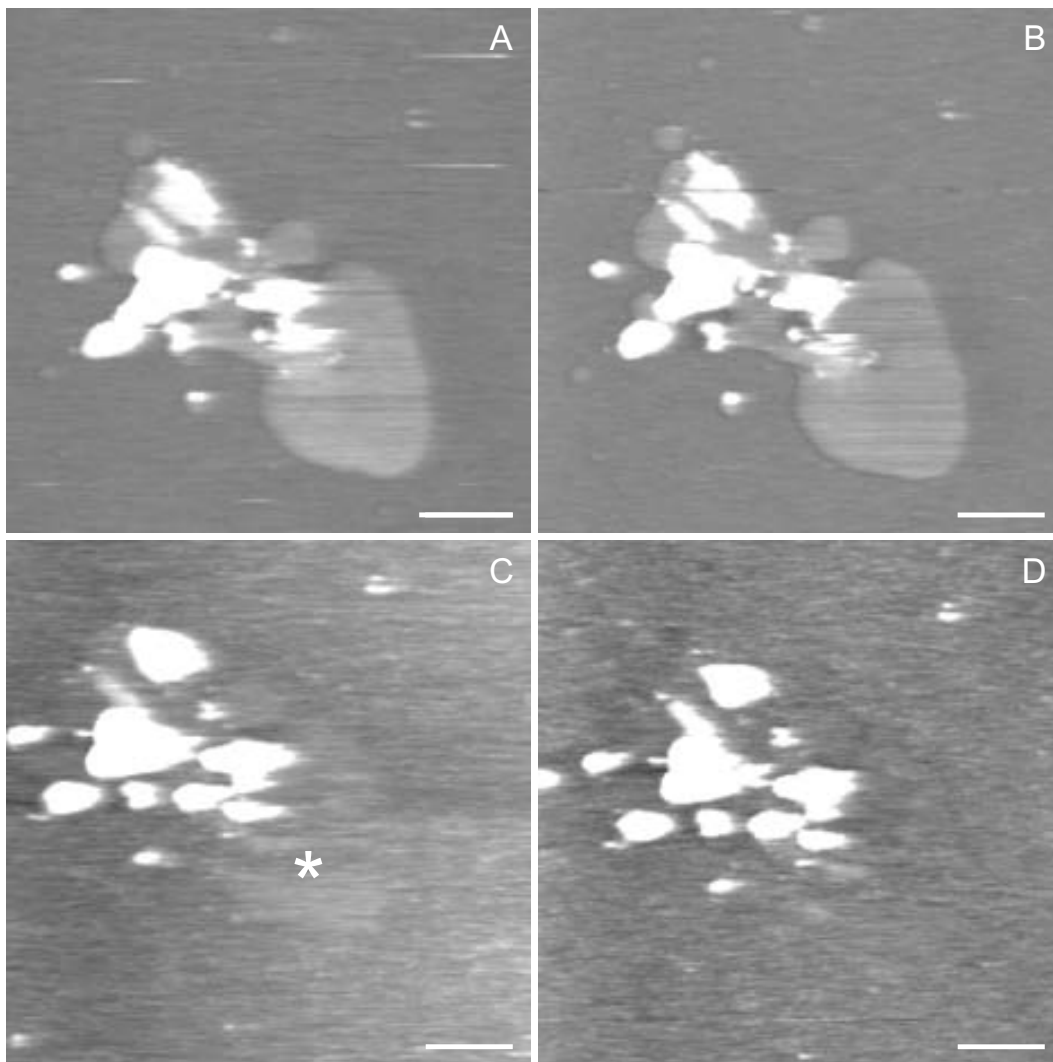
<sup>2</sup>La desnaturalización en tiempo real en presencia de EDTA y NaCl también presenta este efecto pero en menor grado.





**Figura 19.6: Monitorización en tiempo real de la digestión de las placas con pronasa.**

El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado en PMC. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 24^\circ\text{C}$ ). (A y B) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa. (C) Imagen obtenida ( $t=72$  min) después de eliminar  $80\ \mu\text{l}$  y añadir  $80\ \mu\text{l}$  de una solución de pronasa ( $0.2\ \text{mg/ml}$ ). (D) Imagen obtenida ( $t=79$  min) después de eliminar  $60\ \mu\text{l}$  y añadir  $80\ \mu\text{l}$  de una solución de pronasa ( $0.2\ \text{mg/ml}$ ). (E) Imagen obtenida ( $t=113$  min) después de volver a eliminar  $60\ \mu\text{l}$  y añadir  $80\ \mu\text{l}$  ( $t=84$  min) de una solución de pronasa ( $0.5\ \text{mg/ml}$ ). (F) imagen obtenida ( $t=4$  h) después añadir ( $t=2$  h)  $100\ \mu\text{l}$  de una solución de pronasa ( $0.5\ \text{mg/ml}$ ). (G) imagen obtenida ( $t=4.5$  h) después de eliminar  $80\ \mu\text{l}$  y añadir  $10\ \mu\text{l}$  de una solución de pronasa ( $1\ \text{mg/ml}$ ). Barra:  $500\ \text{nm}$ .



**Figura 19.7: Monitorización en tiempo real de la digestión de las placas con tripsina.** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado en PMC. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 24^{\circ}\text{C}$ ). (A y B) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa. (C) Imagen obtenida ( $t=45$  min) después de eliminar  $120\ \mu\text{l}$  y añadir  $80\ \mu\text{l}$  de una solución de tripsina ( $1\ \text{mg/ml}$ ). (D) imagen obtenida en el min 53. (\*) en C indica la zona en la que hay una placa difusa (ver texto). Barras: 250 nm.

## 19.5. Digestión de las placas con MNasa

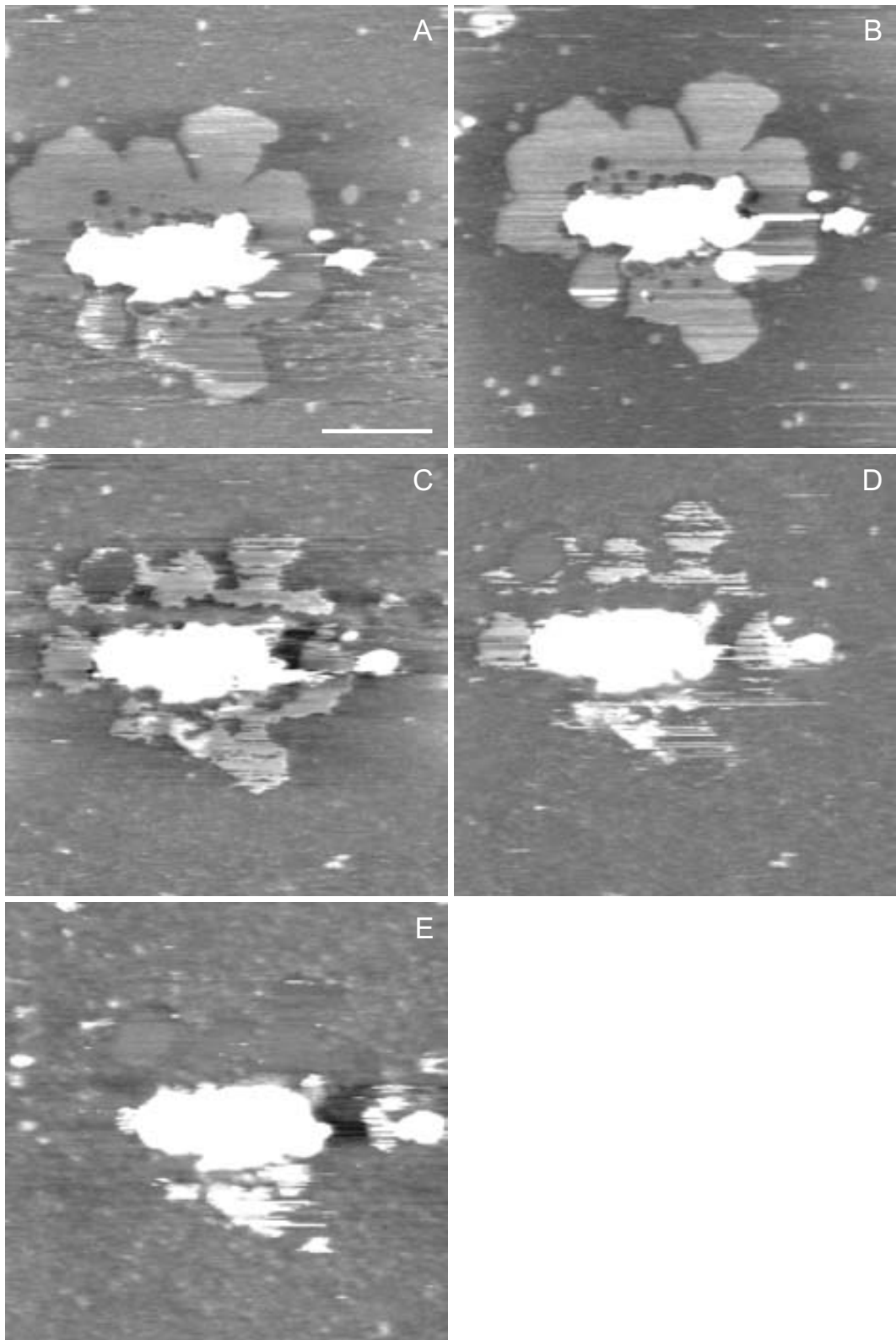
Los resultados de la sección anterior demuestran que las placas contienen proteínas en su interior. No obstante, esto no demuestra inequívocamente que las placas están formadas por cromatina. Se podría argumentar que las placas pueden estar constituidas por un agregado proteico producido por el método de preparación de las muestras. En la bibliografía, hay multitud de trabajos que describen proteínas que forman agregados y fibras amiloides (Walsh y Selkoe, 2007; Luheshi y Dobson, 2009). Para poder afirmar que las placas están formadas por cromatina, falta demostrar que en su interior está presente la parte fundamental, el DNA.

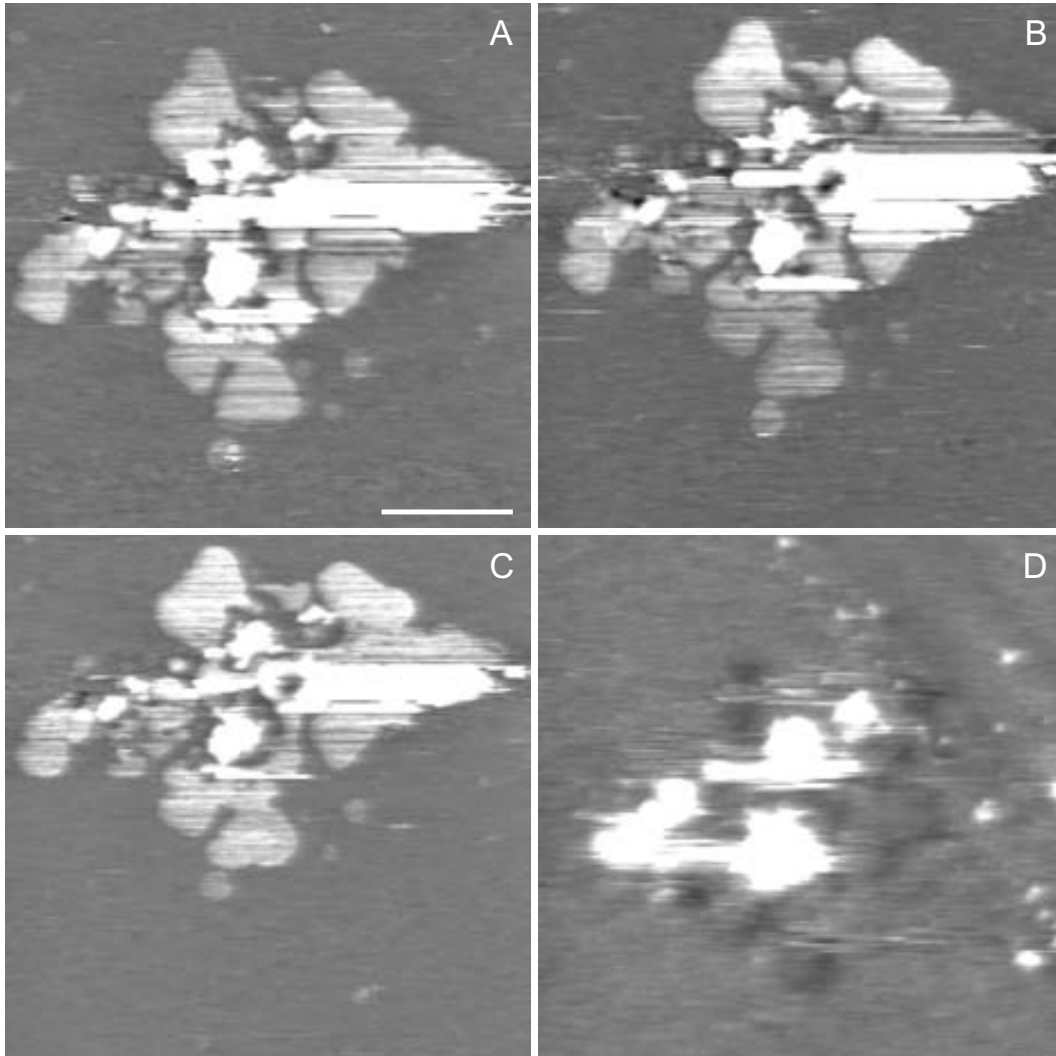
Con el objetivo de demostrar la presencia de DNA, se monitorizó el comportamiento en tiempo real de la cromatina en presencia de MNasa. El efecto de desnaturalización en este caso era muy rápido, 8 min después de añadir un volumen de MNasa ( $0.9 \times 10^{-1}$  U/ $\mu$ l; Figura 19.8C) ya se observó un efecto sobre la estructura. A medida que pasaba el tiempo y se iban realizando imágenes, la placa se desestructuraba hasta quedar totalmente desnaturalizada (E). En la Figura 19.9 (pág. 195) se muestra otro ejemplo en el que se utilizó un volumen de MNasa con la misma actividad que en la figura anterior. En este caso nuevamente después de añadir la MNasa la placa se desnaturalizó totalmente quedando tan solo material disperso resultante de la digestión (Figura 19.9D). Se realizaron más experimentos para confirmar el comportamiento de las placas en presencia de MNasa. En las Figuras 19.10 (pág. 196) se presenta otro ejemplo de una placa digerida con MNasa.

Al aumentar la actividad de MNasa, el tiempo necesario para desnaturalizar las placas era menor. En la Figura 19.11 (pág. 197) se puede observar un experimento en el que se introdujo un volumen de MNasa ( $2.1 \times 10^{-1}$  U/ $\mu$ l) que produjo una desnaturalización inmediata de la placa en 5 min de digestión (el tiempo aproximado que se tarda en realizar una imagen completa de AFM en las condiciones de trabajo utilizadas).

---

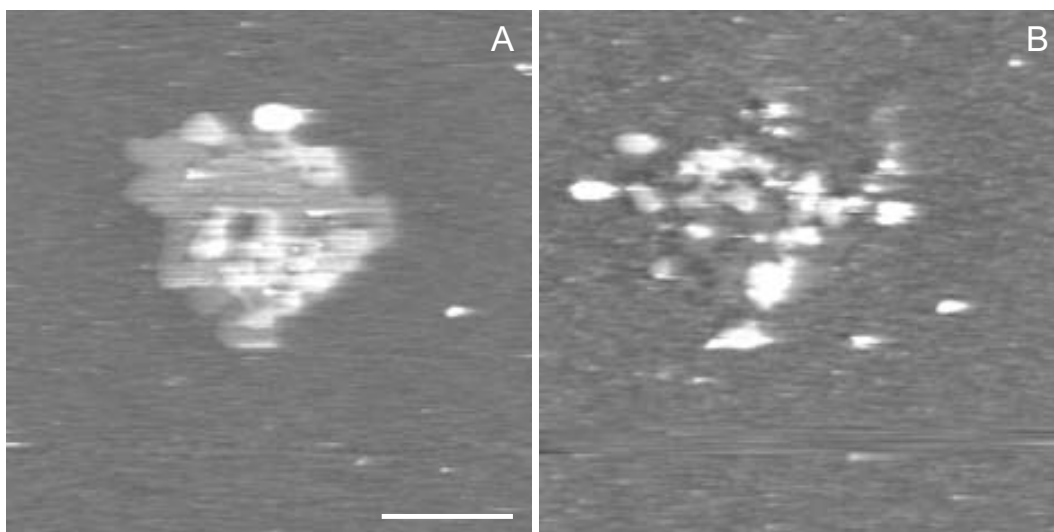
**Figura 19.8 (en la página siguiente): Monitorización en tiempo real de la digestión de las placas con MNasa (serie 1).** Los cromosomas se purificaron mediante gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializaron en solución durante 4 h a RT (sección 9.5.2), se trataron mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se extendieron por adsorción (sección 11.8.2). Finalmente, se realizó un lavado en PMC. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 26$  °C). (A y B) Imágenes consecutivas que demuestran al estabilidad de la placa. (C) Imagen obtenida (t=8 min) después de eliminar 80  $\mu$ l y añadir 80  $\mu$ l de una solución de MNasa ( $0.9 \times 10^{-1}$  U/ $\mu$ l); se puede apreciar como la placa empieza a desestructurarse. (D) Imagen de la placa después de 22 min de digestión. (E) imagen (t=41 min) en la que la placa está totalmente desnaturalizada. Barra: 500 nm.



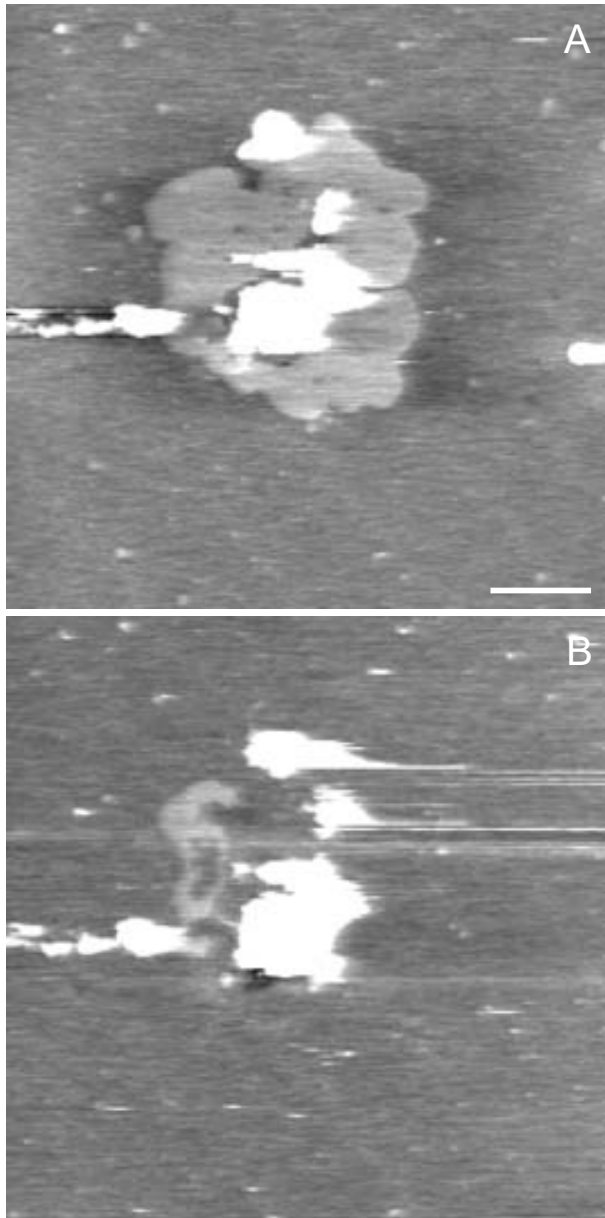


**Figura 19.9: Monitorización en tiempo real de la digestión de las placas con MNasa (serie 2).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado en PMC. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ). (A–C) Imágenes consecutivas que muestran la estabilidad de la placa. (D) Imagen obtenida ( $t=35$  min) después de eliminar  $60\ \mu\text{l}$  y añadir  $80\ \mu\text{l}$  de una solución de MNasa ( $0.9 \times 10^{-1}\ \text{U}/\mu\text{l}$ ). Barra: 500 nm.

La MNasa es una enzima totalmente específica del DNA. Por lo tanto, la completa desestructuración de las placas producida por esta enzima es una prueba inequívoca de que las placas contienen DNA en su interior.



**Figura 19.10: Monitorización en tiempo real de la digestión de las placas con MNasa (serie 3).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado en PMC. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 27^{\circ}\text{C}$ ). **(A)** Placa antes de realizar la digestión. **(B)** Imagen obtenida ( $t=23$  min) después de eliminar  $20\ \mu\text{l}$  y añadir  $100\ \mu\text{l}$  de una solución de MNasa ( $1.5 \times 10^{-1}\ \text{U}/\mu\text{l}$ ). Barra:  $1\ \mu\text{m}$ .



**Figura 19.11: Monitorización en tiempo real de la digestión de las placas con MNasa (serie 4).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PME (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado en PMC. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 27^\circ\text{C}$ ). (A) Placa antes de la digestión. (B) Imagen obtenida ( $t=5$  min) después de eliminar  $60\ \mu\text{l}$  y añadir  $80\ \mu\text{l}$  de una solución de MNasa ( $2.1 \times 10^{-1}\ \text{U}/\mu\text{l}$ ). Barra: 500 nm.





## Capítulo 20

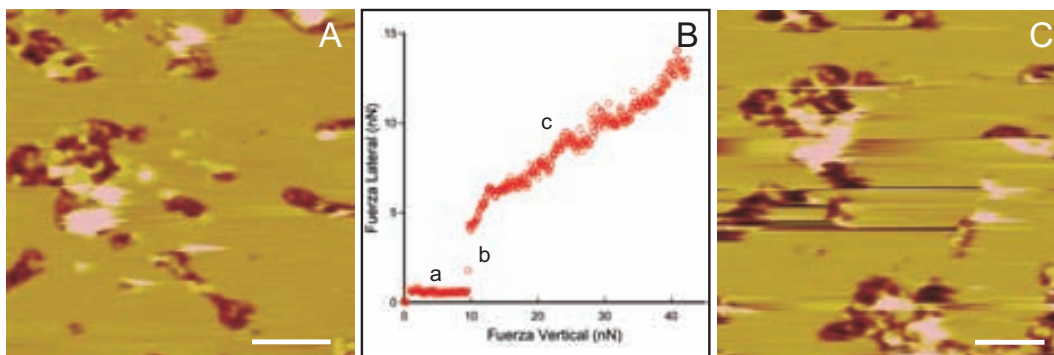
# Análisis nanotribológico de las placas de cromatina

“La necesidad es la madre de la invención”  
Platón

*El análisis de desnaturalización en tiempo real nos permitió analizar el comportamiento y determinar de forma indirecta la composición de las placas procedentes de los cromosomas metafásicos. Para realizar un análisis más detallado del efecto de los agentes desnaturalizantes, y corroborar que las placas están compuestas por cromatina, se usó una novedosa técnica utilizada en Ciencia de Materiales, la Microscopía de Fuerza Lateral (LFM) o Microscopía de Fuerza de Fricción (FFM). Esta técnica nos permitió determinar el coeficiente de fricción a partir de las curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$  (sección 14.4) de las placas de cromatina nativas y de las placas en presencia de los mismos agentes desnaturalizantes que fueron utilizados en los experimentos descritos en el capítulo anterior.*

### 20.1. Determinación de $\mu$ en presencia de $Mg^{2+}$

El análisis del coeficiente de fricción de las placas en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM y 20 mM permitió comparar el comportamiento de las placas en las mismas condiciones iónicas en las que se analizó las propiedades mecánicas mediante experimentos de indentación. Después de obtener una imagen en *contact mode* en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM (Figura 20.1A), se realizó un experimento de fricción sobre la placa y se obtuvieron curvas  $F_f$  vs.  $F_v$  (sección 12.2.2), como la que se muestra en la Figura 20.1B. En estas curvas podemos distinguir tres regiones: (a) Es una zona en la que hay interacciones electrostáticas punta-placa que provocan que  $F_f=0$ ; es decir,



**Figura 20.1: Experimento de fricción de placas en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM.** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado en PM conteniendo  $Mg^{2+}$  20 mM. (A) Imagen realizada en *contact mode* y en líquido antes de realizar una fricción sobre la placa. (C) Imagen después de realizar una fricción sobre la placa. (B) Curva típica de  $F_f$  vs.  $F_v$  obtenida al friccionar la punta sobre la placa mostrada (sección 12.2.2). En la región **a** se establecen fenómenos de repulsión electrostática, por lo que  $F_f \sim 0$  debido a que no hay una deflexión lateral ( $d_l$ ). (b) Transición abrupta debido a que existe un contacto real entre la placa y la punta provocando un incremento repentino de la fricción. (c) Zona en la que la  $F_f \propto F_v$  y a partir de la cual se puede obtener el coeficiente de fricción de la placa ( $\mu=0.24$ ). Barras: 200 nm.

se produce un deslizamiento<sup>1</sup> por encima de la placa sin dar lugar a una deflexión lateral (Grant y Tiberg, 2002; Oncins et al., 2005). A medida que incrementa la  $F_v$  llega un momento en que hay una transición abrupta (b), punto a partir del cual se empieza a perturbar la estructura de la placa y la  $F_f$  es directamente proporcional a  $F_v$  (c). En el caso de las placas nativas, en presencia de iones estructurantes ( $Mg^{2+}$ ), la punta está penetrando parcialmente la estructura, pero esta perturbación no es lo suficientemente grande como para dañar irreversiblemente la placa nativa (Figura 20.1C); no se produce deformación plástica. A partir del cálculo de la pendiente en la región **c** se determinó el coeficiente de fricción de la placa en las condiciones ensayadas (ecuación 14.9 de la sección 14.4.2). Las placas en presencia de PM conteniendo  $Mg^{2+}$  20 mM presentaban un valor de  $\mu$  ( $0.26 \pm 0.04$ ,  $n=19$ ) similar al obtenido para placas nativas en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM (ver resultado en la Tabla 20.1, pág. 218).

El resultado de fricción sobre placas nativas en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM ( $\mu=0.28$ ) es significativamente diferente que el de la fricción sobre mica ( $\mu=0.18 \pm 0.03$ ,  $n=26$ ), lo que indica que la fricción observada después de la penetración parcial de la punta es debida al material de la placa. Este comportamiento es diferente al que se puede

<sup>1</sup>Este comportamiento es el mismo que ejercen los lubricantes. Un lubricante provoca una reducción en el coeficiente de fricción de manera que se reduce el desgaste de las superficies que están en contacto.

observar en las bicapas lipídicas (Oncins et al., 2005). En este caso sí que se observa una rotura real de la placa y la fricción es debida al contacto entre la punta y el sustrato utilizado. Teniendo en cuenta que las placas nativas observadas no se dañan en un experimento de fricción realizado en una zona interna (ver Figuras 20.3C y 20.4C como ejemplo), los resultados indican que la placa es una estructura flexible capaz de absorber mecánicamente la energía cinética de la punta durante la fricción y después liberarla retornando a su estado inicial.

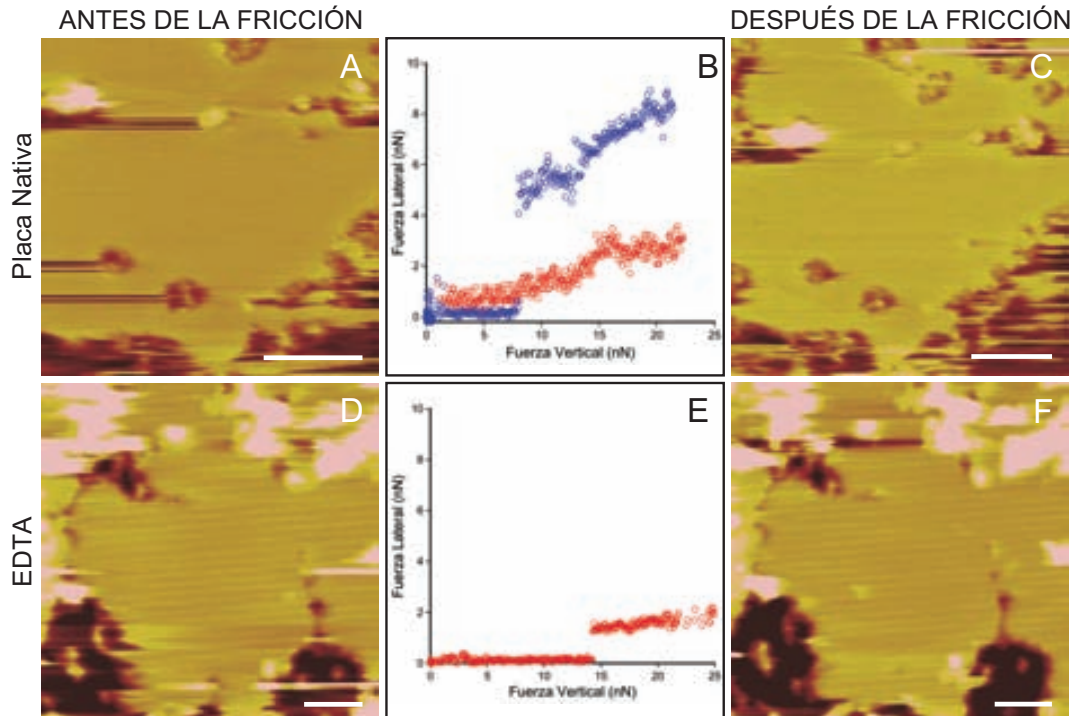
De forma general, la transición abrupta de las curvas de fricción no presentaban un comportamiento constante con respecto a los ejes  $F_f$  y  $F_v$  dentro de una misma condición. En contraste con este comportamiento, los valores del coeficiente de fricción sí que mostraban una tendencia (ver Tabla 20.1, pág. 218).

## 20.2. Determinación de $\mu$ en presencia de EDTA

El EDTA ya se ha utilizado en el transcurso de esta tesis para desnaturalizar las placas (ver sección 19.2). El análisis de fricción se realizó para obtener información del efecto del EDTA sobre la estructura interna de las placas. En la Figura 20.2A–C observamos los resultados de un análisis de fricción sobre una placa nativa en presencia de PMC que presenta un coeficiente de fricción ( $\mu=0.21$ ; curva azul de la Figura 20.2B), muy similar a la media encontrada para placas nativas en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM y 20 mM (ver sección anterior y la Tabla 20.1, pág. 218). Después de añadir EDTA (Figura 20.2D–F), aparentemente, no se observó ningún cambio estructural sobre las placas. Pero, al analizar las curvas de fricción se produjo un cambio drástico en el comportamiento mecánico, tal como puede verse en la morfología de las curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$  (ver curvas rojas en Figuras 20.2B, y 20.2E).

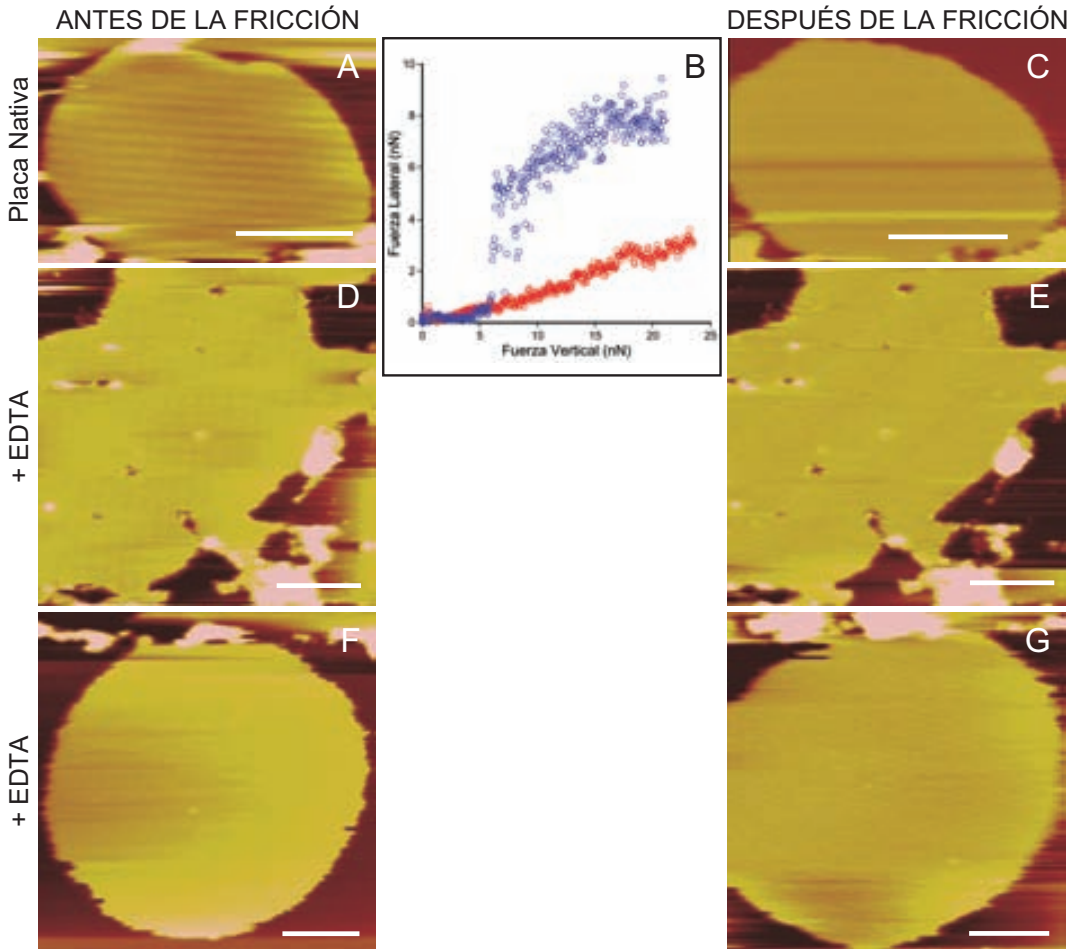
Las curvas de fricción en presencia de EDTA presentaban una reducción de la pendiente que corresponde a un coeficiente de fricción mucho menor que el observado en las placas nativas en presencia de  $Mg^{2+}$ . En la Figura 20.3 se pueden observar más ejemplos del efecto del EDTA sobre el comportamiento de fricción. El valor promedio de  $\mu$  en presencia de EDTA es de  $0.12\pm 0.04$  ( $n=37$ ; ver Tabla 20.1, pág. 218).

Aparentemente, el EDTA no afecta irreversiblemente la estructura de la placa después de realizar una fricción (ver Figura 20.2F y 20.3E y G). Sin embargo, resultaba más difícil obtener imágenes, seguramente debido a fenómenos electrostáticos entre la punta y la placa.



**Figura 20.2: Experimento de fricción de placas en presencia de EDTA.** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado ( $\geq 5$  min; sección 11.8.2) en PMC (A–C) o en PM (D–F). Imagen de una placa en condiciones nativas realizada en *contact mode* y en líquido antes (A) y después (C) de realizar una fricción. (B) Curvas de  $F_f$  vs.  $F_v$ ; la curva azul corresponde a la placa nativa ( $\mu=0.21$ ) mostrada en A y C; la curva roja ( $\mu=0.13$ ) corresponde a un experimento realizado en la misma sesión después de eliminar  $30 \mu\text{l}$  de solución y añadir  $60 \mu\text{l}$  de EDTA 400 mM, Pipes 5 mM pH 7.2. (D–F) Después de realizar el lavado en PM se realizó un cambio de medio que contenía EDTA 400 mM, Pipes 5 mM pH 7.2. Imagen de *contact mode* antes (D) y después (F) de la fricción. (E) Curva de fricción ( $\mu=0.05$ ) realizada sobre la placa mostrada en D. Barras: 200 nm.

Estos resultados, teniendo en cuenta que el EDTA reduce la concentración efectiva de  $\text{Mg}^{2+}$ , lo cual afecta la estructura de la cromatina y aportan más evidencias de que el comportamiento de las placas es consistente con una estructura formada por cromatina.



**Figura 20.3: Experimento de fricción de placas en presencia de EDTA.** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado ( $\geq 5$  min; sección 11.8.2) en PM. Imagen de una placa en condiciones nativas realizada en *contact mode* y en líquido antes (**A**) y después (**C**) de realizar una fricción. La curva azul ( $\mu=0.26$ ) de **B** corresponde a la curva de fricción de la placa nativa mostrada en **A** y **C**. Después de eliminar 80  $\mu\text{l}$  de muestra y añadir 100  $\mu\text{l}$  de EDTA (400 mM, Pipes 5 mM pH 7.2) se obtuvieron las imágenes **D–F** antes y **E–G** después de la fricción. La curva roja ( $\mu=0.14$ ) corresponde a la fricción realizada sobre la placa mostrada en **F**. Barras: 250 nm.

### 20.3. Determinación de $\mu$ en presencia de NaCl

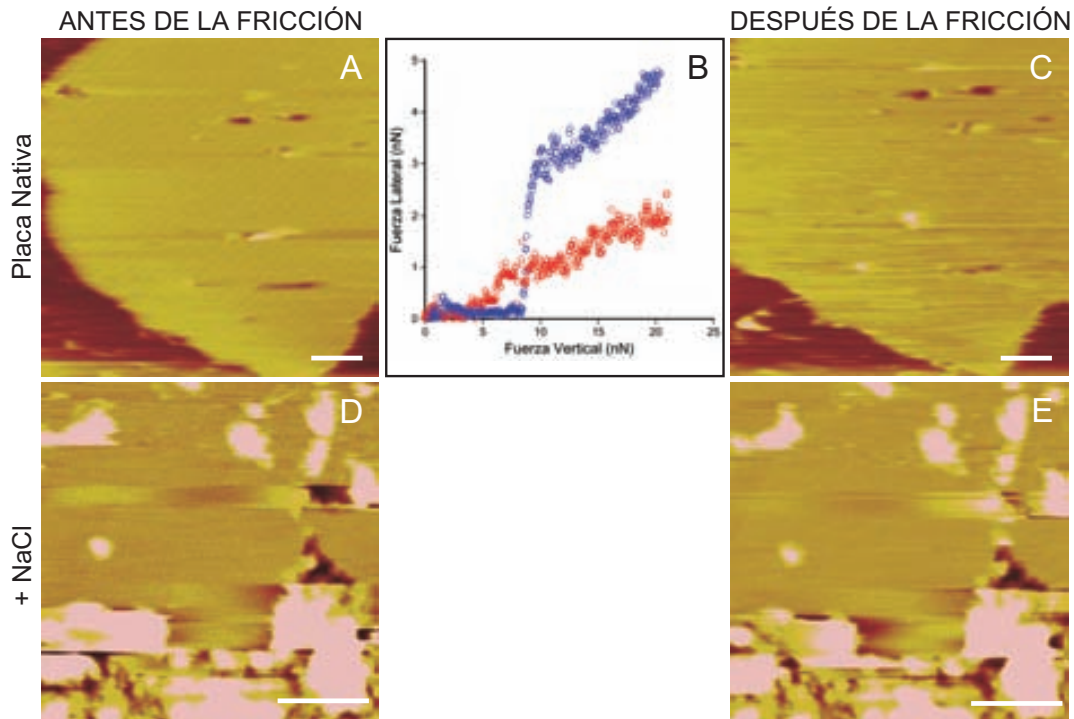
También se evaluó el efecto del NaCl en el comportamiento mecánico a nivel de fricción de la placa de cromatina. Tal como se indicó en las secciones de TEM (15.6)

y de AFM (19.3), el NaCl en elevadas concentraciones provoca la desestructuración de la cromatina.

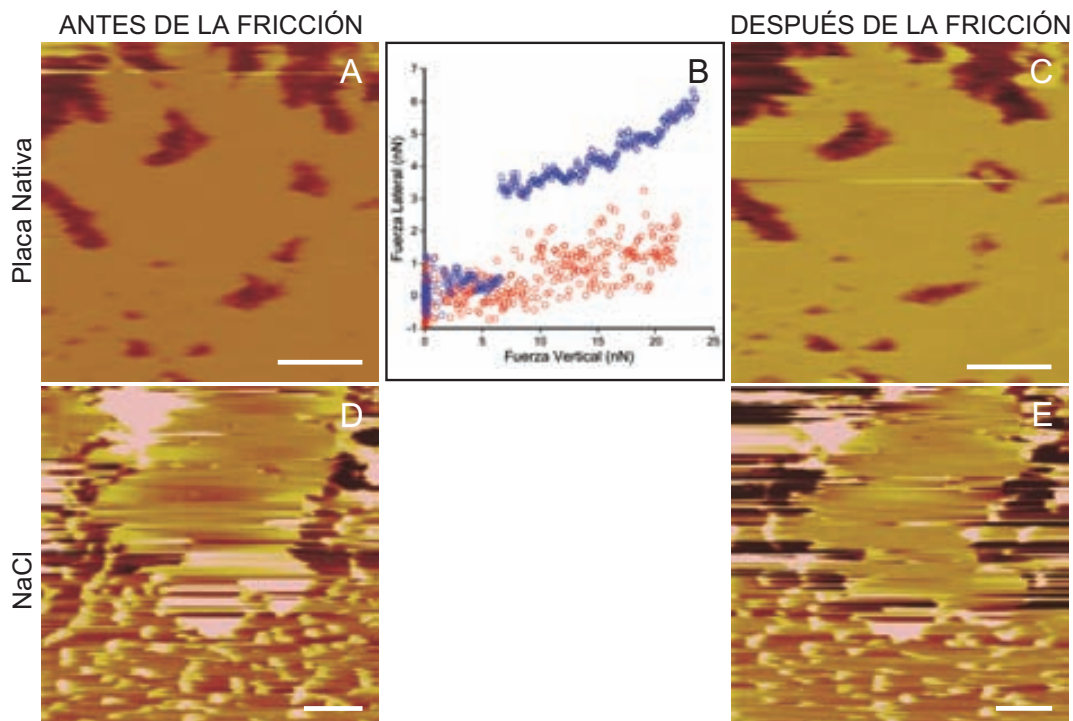
En este caso también se realizó el mismo tipo de ensayo que en los apartados anteriores (sección 13.4). Después de realizar un análisis de fricción sobre placas en condiciones nativas (Figura 20.4A–C), en la misma sesión y con la misma punta se realizaba un análisis de fricción después de añadir NaCl a la muestra (Figura 20.4D–E). Nuevamente, al añadir el agente desnaturizante se observaba un patrón de fricción totalmente diferente. Si comparamos la curva azul (placa nativa) y la roja (placa tratada con NaCl) mostradas en **B**, podremos observar que se reduce considerablemente la  $F_f$  máxima para un mismo valor de  $F_v$ , y por lo tanto  $\mu$  se ve claramente reducido. No obstante, como en el caso del tratamiento con EDTA, la estructura observada después de realizar el experimento de fricción no se veía alterada de forma irreversible (Figura 20.4E).

En la Figura 20.5 se presenta el resultado de un experimento de fricciones realizado en un día diferente al mostrado en la Figura 20.4. En este caso se realizó un cambio de medio (sección 13.4) conteniendo NaCl 2 M, Pipes 5 mM pH 7.2. Después del cambio de medio también se observó una disminución clara de  $\mu$  (curva roja; Figura 20.5B) en comparación con la cromatina nativa de referencia (curva azul). Aparentemente, tampoco se detectó un cambio de la morfología global de la placa después de realizar un experimento de fricción en presencia de NaCl (Figura 20.5E). En general era difícil obtener imágenes de placas tratadas con NaCl.

Estos resultados muestran que en presencia de NaCl se produce una reducción considerable de  $\mu$  de las placas. El valor promedio obtenido es  $0.05 \pm 0.02$  ( $n=22$ ; ver Tabla 20.1, pág. 218). Estos resultados también sugieren que la cromatina es el material que constituye las placas.



**Figura 20.4: Experimento de fricción de placas en presencia de NaCl (serie 1).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado ( $\geq 5$  min; sección 11.8.2) en PMC. Imagen de una placa en condiciones nativas realizada en *contact mode* y en líquido antes (A) y después (C) de realizar una fricción sobre la placa. La curva de fricción azul (B) corresponde a la placa nativa ( $\mu=0.18$ ) mostrada en A y C. (D y E) Corresponde a un experimento realizado en la misma sesión; las imágenes se obtuvieron después de eliminar 80  $\mu\text{l}$  de tampón y añadir 100  $\mu\text{l}$  de una solución NaCl 4 M, Pipes 5 mM pH 7.2. La curva roja ( $\mu=0.1$ ) corresponde al experimento de fricción realizado sobre la placa mostrada en D. Barras: 250 nm.



**Figura 20.5: Experimento de fricción de placas en presencia de NaCl (serie 2).** El material procede de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó en solución durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado ( $\geq 5$  min) en PMC (sección 11.8.2). Imagen de una placa en condiciones nativas realizada en *contact mode* y en líquido antes (**A**) y después (**C**) de realizar una fricción sobre la placa. La curva de fricción azul (**B**) corresponde a la placa nativa ( $\mu=0.16$ ) mostrada en **A**. (**D** y **E**) Corresponde a un experimento, realizado el mismo día que **A** y **C**, después de un cambio de medio con NaCl 2 M, Pipes 5 mM pH 7.2. La curva roja ( $\mu=0.05$ ) corresponde al experimento de fricción realizado sobre la placa en **D**. Barras: 250 nm.



## 20.4. Determinación de $\mu$ de placas digeridas con pronasa

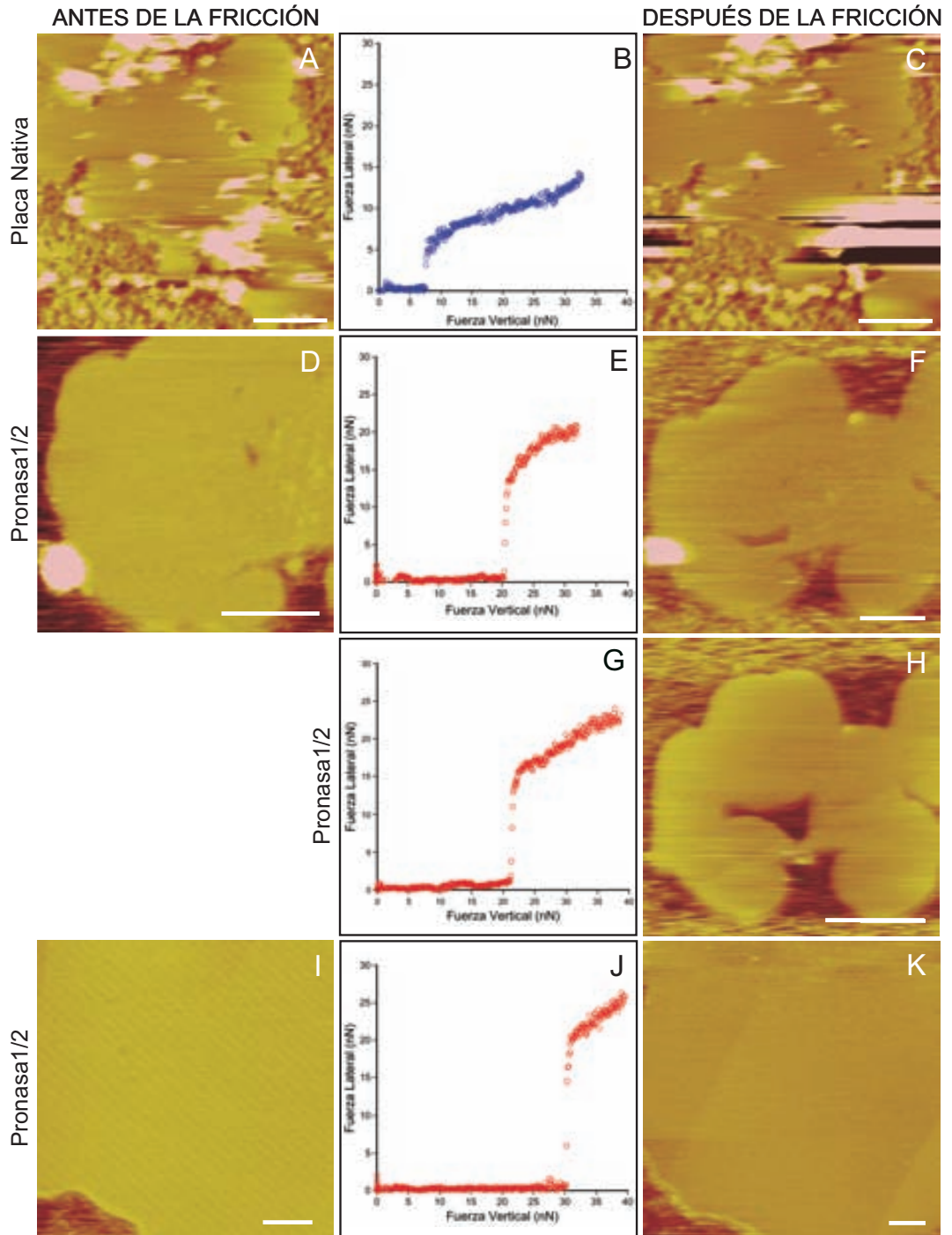
En los estudios de monitorización en tiempo real (sección 19.4) se demostró que en el interior de las placas había proteínas. Para reafirmar estas observaciones, se realizó un análisis de fricción de las placas después de realizar una digestión con pronasa. Este análisis nos permitió evaluar de forma más detallada y cuantitativa qual era la aportación mecánica del componente proteico en la estructura de las placas.

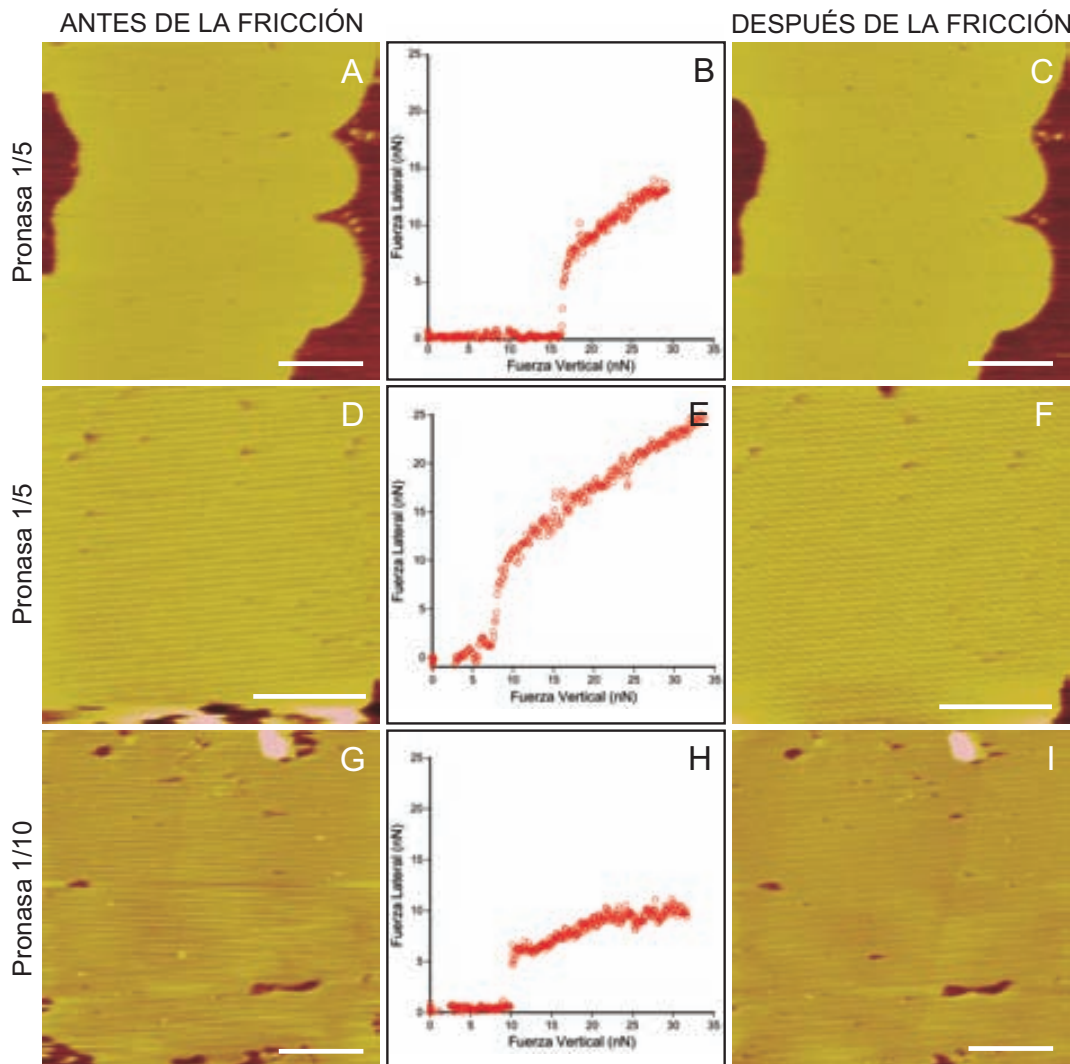
El material procedía de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), que se dilizó en solución durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado ( $\geq 5$  min en PMC (sección 11.8.2)). Después del lavado se realizó un cambio de medio (sección 13.4.2) con las diluciones indicadas de una solución madre de pronasa (1 mg/ml en PMC).

La pronasa mostró tener un gran efecto sobre el comportamiento de fricciones de las placas. Después de la digestión con una dilución 1/2 de pronasa (Figura 20.6) se observó claramente un cambio en el comportamiento del patrón de fricciones. En los ensayos anteriores en los que las placas se desnaturalizaron en presencia de EDTA (sección 20.2) y NaCl (sección 20.3) la morfología de tres regiones (ver Figura 20.1) se perdía total o parcialmente y había un reducción drástica de  $\mu$  en comparación con la placa de cromatina nativa. Por el contrario, al digerir las placas con pronasa se mantenía el patrón, pero se observó un incremento en el coeficiente de fricción indicando que la placa era capaz de absorber una mayor cantidad de energía cinética de la punta (comparar la curva azul con la batería de curvas rojas correspondientes a placas digeridas con pronasa de la Figura 20.6). Cuando la digestión se realizó en presencia de concentraciones elevadas de pronasa ( $\geq 0.5$  mg/ml) en algunos experimentos se producía un agujero en el área en la que se realizó la fricción. Éste fenómeno tan solo ocurría después de realizar varias fricciones consecutivas sobre la misma zona (Figura 20.6D–H). Estos resultados indican que la actividad de la pronasa afecta irreversiblemente la estructura interna de la placa a medida que se

---

**Figura 20.6 (en la página siguiente): Experimento de fricción de placas digeridas con pronasa 1/2.** La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 26^\circ\text{C}$ ), en cada caso se indica el tiempo transcurrido desde la adición de la pronasa hasta el momento en que se realizó la fricción. (A–C) Como referencia se muestra el análisis de fricción de una placa en condiciones nativas realizado un día diferente al de las placas en presencia de pronasa. La curva de fricción azul (B) corresponde a la placa nativa ( $\mu=0.26$ ) mostrada en A y C. (D–K) Experimentos de fricción realizados en presencia de pronasa 1/2. (D–H) Imágenes seleccionadas de una serie en la que se realizaron experimentos de fricción consecutivos sobre la misma placa. Los coeficientes de fricción extraídos de las diferentes curvas fueron E ( $\mu=0.36$ ,  $t=29$  min), G ( $\mu=0.48$ ,  $t=38$  min) y J ( $\mu=0.62$ ,  $t=68$  min). Barras: 250 nm.





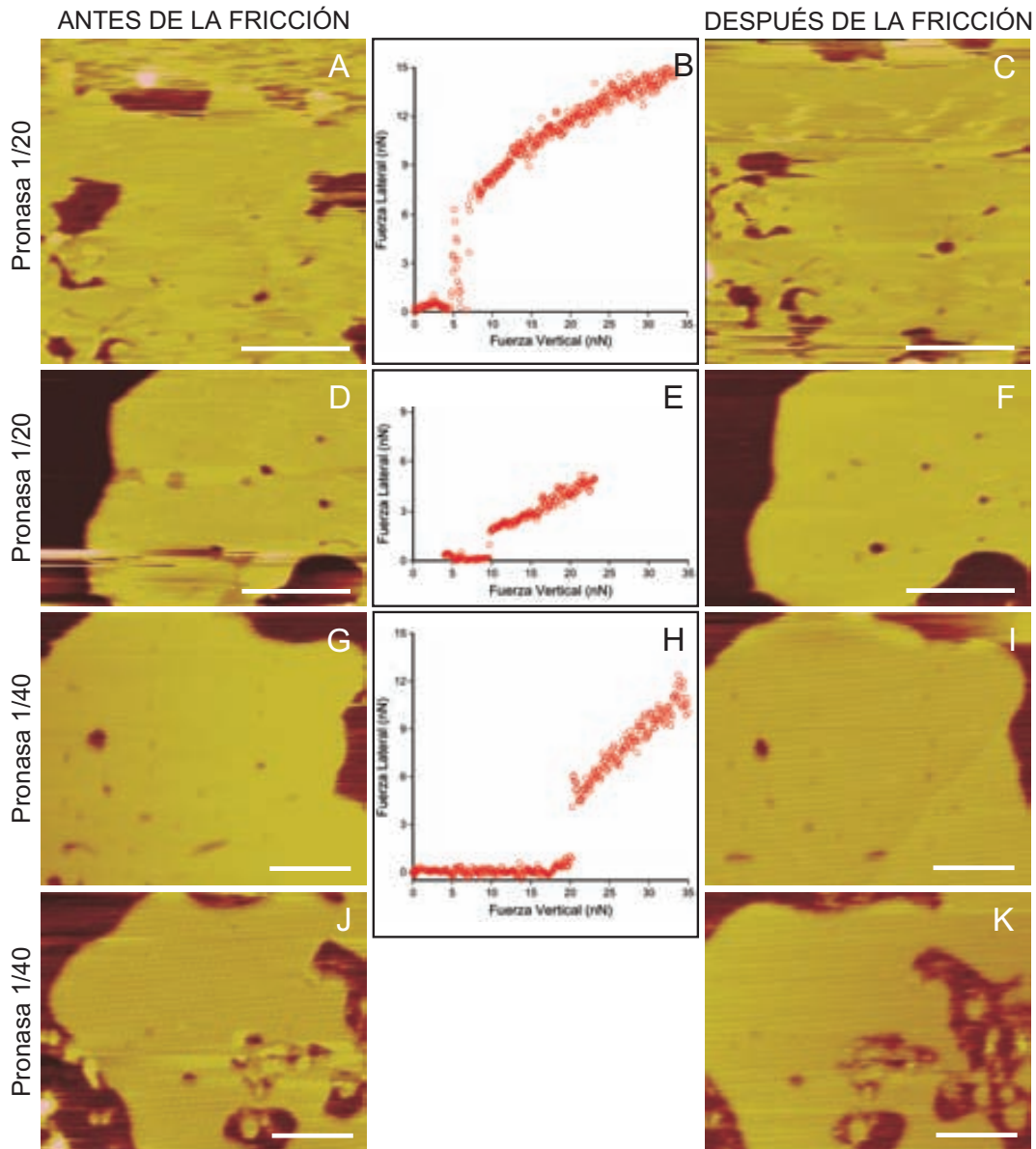
**Figura 20.7: Experimento de fricción de placas digeridas con pronasa 1/5 y 1/10.** La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 26^\circ\text{C}$ ), en cada caso se indica el tiempo transcurrido desde la adición de la pronasa hasta el momento en que se realizó la fricción. Todos los experimentos de fricción mostrados en esta figura se realizaron en sesiones diferentes. La fricción se realizó sobre placas digeridas con pronasa 1/5 (A–F) y 1/10 (G–I). Los coeficientes de fricción extraídos de las diferentes curvas fueron B ( $\mu=0.46$ ,  $t=45$  min), E ( $\mu=0.56$ ,  $t=70$  min) y H ( $\mu=0.34$ ,  $t=77$  min). Las líneas que se observan en D, F, G y I son debidas a ruido eléctrico. Barras: 500 nm.

realizan los sucesivos experimentos de fricción.

Al disminuir la cantidad de pronasa añadida en la digestión se observaba que la alteración mecánica se iba revirtiendo. Se pasaba de valores de  $\mu$  elevados, como

los determinados en la digestión con pronasa 1/2 (Figura 20.6), a valores más bajos cuando las digestiones se realizaban con pronasa 1/5 (Figura 20.7**B** y **E**, pág. 209). La digestión con pronasa diluida 1/10 (Figura 20.7**H**) produce valores menores de  $\mu$ . Las digestiones con concentraciones de pronasa por debajo de una dilución 1/2 no condujeron a la formación de agujeros después de realizar los experimentos de fricción (ver imágenes realizadas después de la fricción en la Figura 20.7**C**, **F** e **I**).

Al realizar la digestión con concentraciones aún más bajas de pronasa, el coeficiente de fricción resultante era igual al de las placas nativas. En la Figura 20.8 se muestran ejemplos del comportamiento de las placas después de ser digeridas con pronasa 1/20 y 1/40, en los que se pudo observar un patrón y coeficiente de fricción similar al observado con placas nativas. En la Tabla 20.1 (pág. 218) se presentan los valores promedio de los coeficientes de fricción de las diferentes diluciones pronasa.



**Figura 20.8:** Experimento de fricción de placas digeridas con pronasa 1/20 y 1/40. La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 26^\circ\text{C}$ ); en cada caso se indica el tiempo transcurrido desde la adición de la pronasa hasta el momento en que se realizó la fricción. La fricción se realizó sobre placas digeridas con pronasa 1/20 (A–F) y 1/40 (G–K). Excepto en E, las curvas se obtuvieron de la fricción realizada sobre la placa concreta mostrada en cada caso. Los experimentos (A–C) y (D–F) se realizaron en días diferentes. Los coeficientes de fricción determinados a partir de las curvas fueron: B ( $\mu=0.25$ ,  $t=113$  min); E ( $\mu=0.25$ ,  $t=2$  h 20 min); H ( $\mu=0.38$ ,  $t=18$  min). Barras: A–F 500 nm; G–K 250 nm.

## 20.5. Determinación de $\mu$ de placas digeridas con MNasa

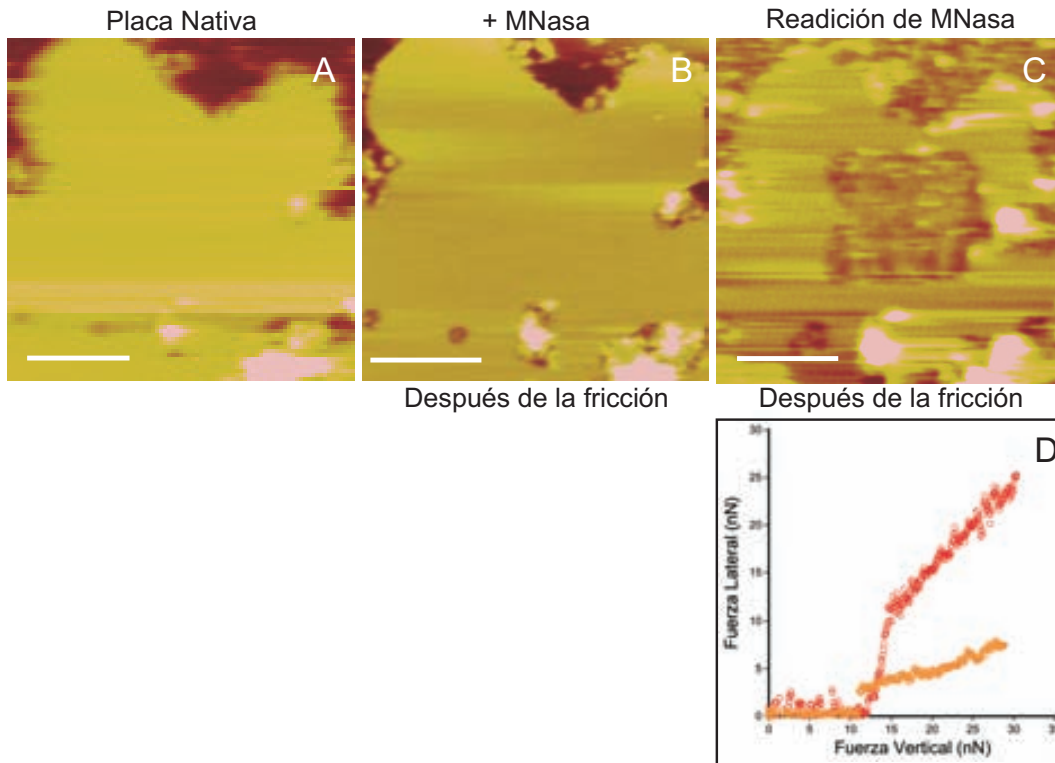
A partir de los resultados obtenidos mediante la monitorización en tiempo real de la desnaturalización de placas digeridas con MNasa (sección 19.5) se demostró la presencia de DNA en el interior de las placas. Se realizó un análisis de fricción después de la digestión con MNasa para obtener más información del papel del DNA en el contexto estructural de las placas.

Utilizando este material se realizaron una serie de experimentos mediante lavados con diferentes diluciones (en tampón PMC) de una solución madre de MNasa ( $\sim 226$  U/ml; ver sección 13.2). También se realizaron experimentos de adición directa de MNasa sobre la muestra, que permitieron estudiar el coeficiente de fricción de una misma placa antes y después de la digestión con MNasa (ver sección 13.4).

El material cromosómico procedente de un gradiente de sacarosa (sección 9.4.1), se dializó durante 4 h a RT frente a PM (sección 9.5.2), se trató mecánicamente con jeringuilla (sección 9.6) y se adsorbió sobre mica recién exfoliada (sección 11.8.2). Finalmente se realizó un lavado ( $\geq 5$  min; sección 11.8.2) en PMC. Una vez se llegaba a este punto, se realizaba el proceso de digestión indicado antes.

### 20.5.1. Digestión mediante adición de MNasa

De este modo, se realizó el análisis de fricción de la placa nativa mostrada en la Figura 20.9A. Después de añadir MNasa (**B**) se obtuvo la curva naranja (**D**). La morfología de la curva y el coeficiente de fricción ( $\mu=0.26$ ) no indicaban ninguna diferencia significativa respecto a una curva de fricción sobre cromatina nativa (por ejemplo ver Figura 20.6, pág. 208). La imagen obtenida después de la fricción (**B**), tampoco indicaba ninguna alteración. Los experimentos de adición directa no permiten una disolución inicial perfecta, lo cual puede provocar que la enzima no se disuelva homogéneamente. Este problema también podía ocurrir en los experimentos de monitorización en tiempo real de la desnaturalización de placas (ver capítulo 19). No obstante, al volver a añadir un volumen de MNasa más concentrada el cambio fue evidente. El análisis de fricción que dio lugar a la curva roja, corresponde a un valor de  $\mu$  (0.89) muy superior al observado después de la primera adición de MNasa. Además, la imagen de la placa después de la fricción presentaba un agujero (**C**). Este agujero tiene una morfología cuadrada ( $300 \times 300$  nm), que se corresponde con el tamaño del área escaneada en el experimento de fricción.



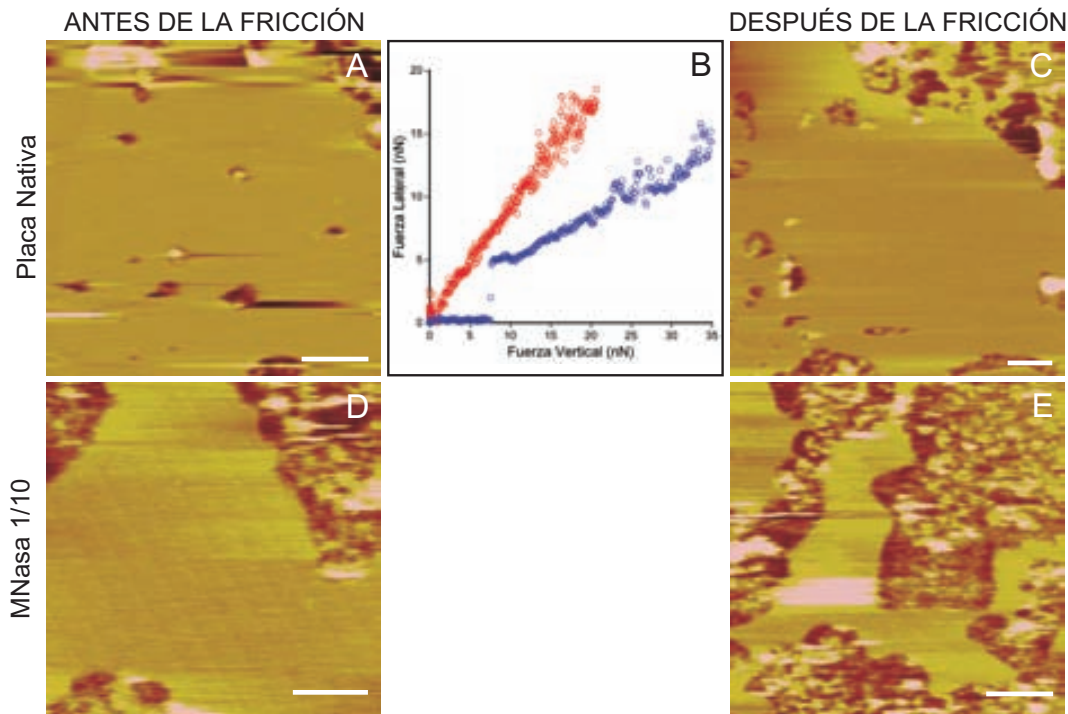
**Figura 20.9: Experimento de fricción de una placa digerida con MNasa por adición.** La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 24^\circ\text{C}$ ), en cada caso se indica el tiempo transcurrido desde la primera adición de MNasa hasta el momento en que se realizó la fricción. La placa nativa mostrada en **A** se digirió con MNasa (se eliminó  $40\ \mu\text{l}$  de solución y se añadió  $70\ \mu\text{l}$  de MNasa 1/10) y se obtuvo la imagen **B** después de realizar un análisis de fricción que dio lugar a la curva naranja ( $\mu=0.26$ ,  $t=8\ \text{min}$ ). La readición de MNasa (se eliminó  $40\ \mu\text{l}$  de solución y se añadió  $70\ \mu\text{l}$  de MNasa 1/5) produjo la curva roja ( $\mu=0.89$ ,  $t=25\ \text{min}$ ); la imagen obtenida después de la fricción se muestra en **C**. Barras: 250 nm.

### 20.5.2. Digestión con actividad controlada de MNasa

Para controlar perfectamente la concentración de MNasa, se realizaron experimentos en los que las extensiones de placas eran lavadas con diversas diluciones de MNasa.

Al realizar una digestión con una dilución 1/10 de MNasa se observó un efecto drástico sobre la placa, como lo muestra la imagen tomada después de realizar el análisis de fricciones (Figura 20.10E). Se observa muy claramente un agujero en la zona en la que se realizó la fricción. Este resultado y el presentado en la Figura 20.9C demuestra que la actividad de MNasa es capaz de eliminar la cohesión estructural interna de la placa. El coeficiente de fricción de las placas en presencia de MNasa

1/10 presenta un valor muy elevado ( $\mu=0.89$ ) en comparación con las placas nativas ( $\mu=0.28$ ), lo que nuevamente nos indica que hay una gran alteración mecánica de la estructura. La curva de fricción en presencia de MNasa 1/10 (curva roja de la Figura 20.10B), no presenta la transición típica. La gran variabilidad observada para este parámetro podría ser debida a la gran alteración mecánica/estructural de la placa digerida.

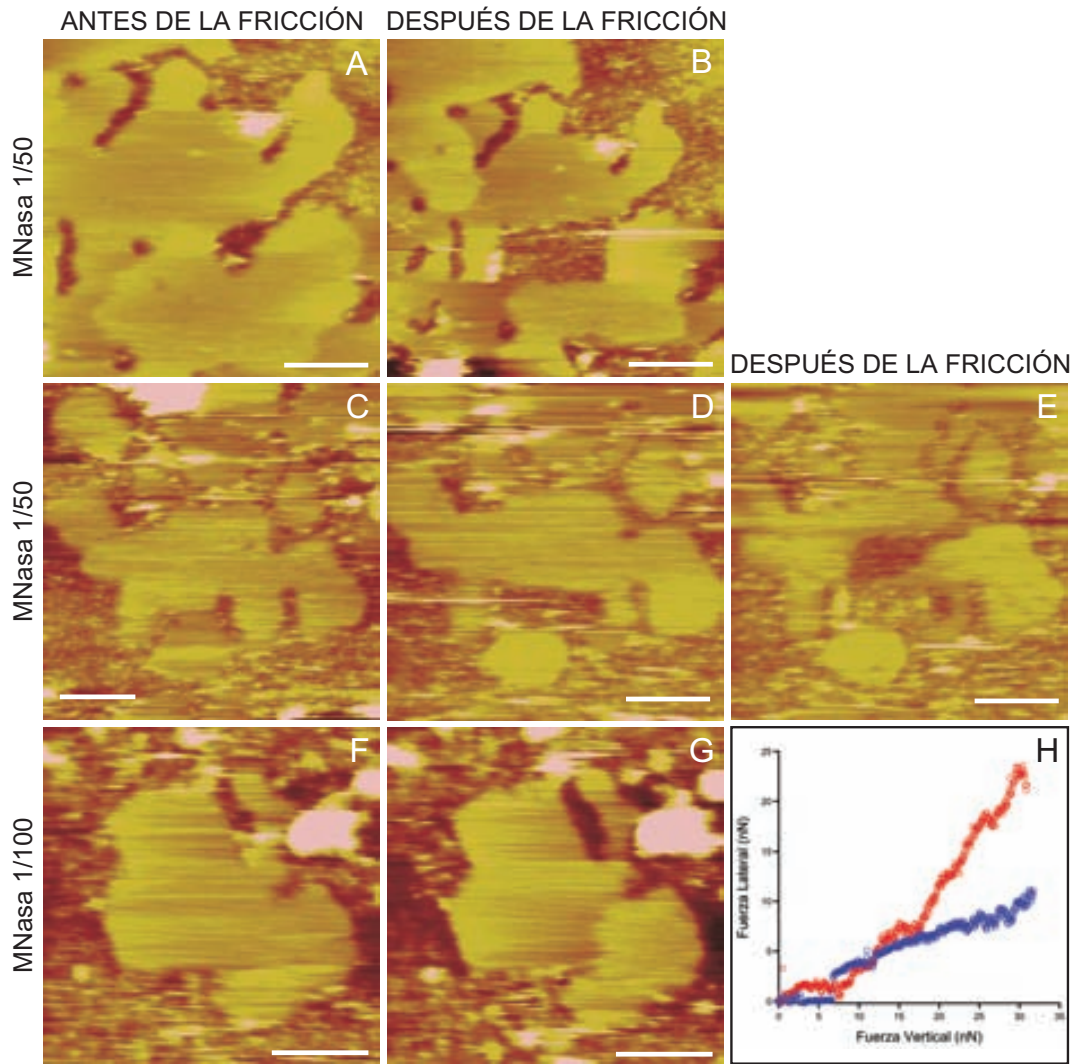


**Figura 20.10: Experimento de fricción de una placa digerida con MNasa 1/10.** La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ), en cada caso se indica el tiempo transcurrido desde la primera adición de la MNasa hasta el momento en que es realizó la fricción. (**A** y **C**) Placa nativa antes y después del análisis de fricción que dio lugar a la curva azul ( $\mu=0.32$ ). (**D** y **E**) Placa antes y después de la fricción en presencia de MNasa 1/10 que dio lugar a la curva roja ( $\mu=0.89$ ). El agujero de la placa mostrada en **D** tiene una morfología cuadrada con un ancho de 300 nm, que corresponde con el área escaneada en el experimento de fricción. Barras: **A**, **C** y **E** 250 nm; **D** 100 nm.

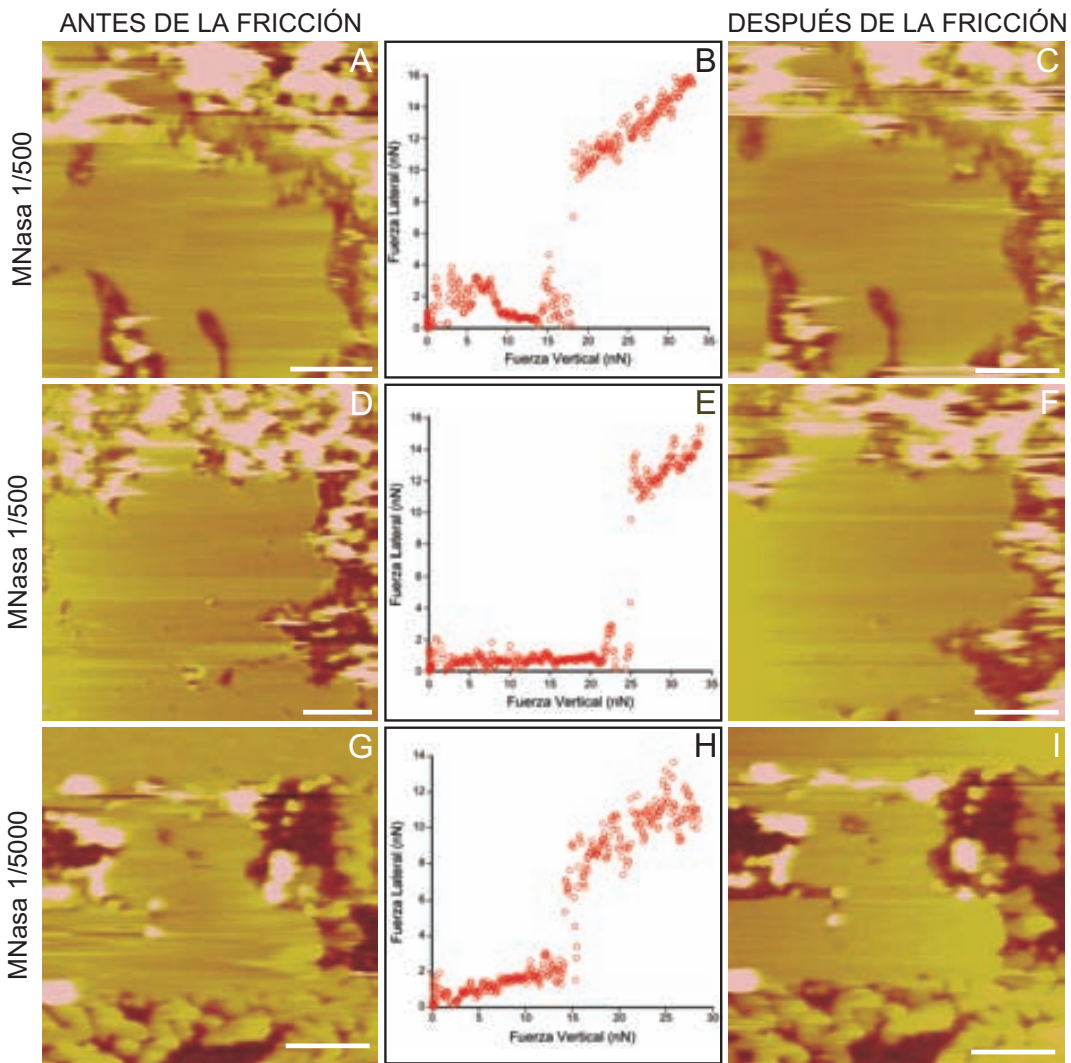
Después de realizar una fricción sobre placas digeridas con MNasa 1/50, éstas también presentaban un agujero en la zona de fricción (Figura 20.11B, pág. 216). En este caso, tal como se muestra en la serie de fricciones en **C–E**, la aparición del agujero era progresiva, lo cual indicaba que la afectación de la estructura era menor, en comparación con la digestión realizada con una concentración mayor (dilución 1/10; Figura 20.10D y E) o por una adición directa de MNasa más concentrada



(Figura 20.9, pág. 213). La dilución de MNasa a partir de la cual no se observó la formación de agujeros después de realizar un experimento de fricción, fue 1/100 (Figura 20.11**G**). Sin embargo, sorprendentemente, los valores del coeficiente de fricción correspondientes a la dilución 1/100 ( $\mu=1.2$ ; Tabla 20.1, pág. 218), son más elevados que los obtenidos en concentraciones superiores de MNasa. Hasta que no se realizaron diluciones mayores de MNasa ( $\geq 1/500$ , ver curvas mostradas en Figura 20.12**B** y **E**; pág. 217) no se comenzó a detectar un descenso en el coeficiente de fricción ( $\mu=0.56$ ; Tabla 20.1, pág. 218), tampoco en este caso se observaron daños a nivel de imagen sobre la placa después de realizar una fricción (**C** y **F**). A partir de diluciones de MNasa 1/5000 (Figura 20.12**G–I**) se restableció el coeficiente de fricción de las placas nativas (ver Tabla 20.1, pág. 218). El conjunto de estos datos indicaba que la MNasa, incluso cuando está muy diluida, afecta en elevado grado la estructura interna de las placas. Se trata de una acción enzimática que afecta al DNA, que tal como se discutirá en el capítulo 23, es el elemento estructural fundamental de las placas.



**Figura 20.11: Experimento de fricción de una placa digerida en presencia de MNasa 1/50 y 1/100.** La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 25,5^\circ\text{C}$ ). Se indica el tiempo transcurrido desde la primera adición de MNasa hasta el momento en que es realizó la fricción. Placa antes (A) y después (B,  $t=29$  min) de la fricción en presencia de MNasa 1/50. (D,  $t=35$  min) y (E,  $t=42$  min) Fricciones consecutivas, en presencia de MNasa 1/50, de una placa inicialmente no digerida que se presenta en C. (F y G) Placa antes y después de la fricción en presencia de MNasa 1/100 que dio lugar a la curva roja ( $\mu=1.30$ ,  $t=21$  min); la curva azul pertenece a una placa nativa ( $\mu=0.36$ ). Barras: B, C–E 250 nm; A, F y G 200 nm.



**Figura 20.12: Experimentos de fricción de una placa digerida en presencia de MNasa 1/500 y 1/5000.** La digestión se llevó a cabo a RT ( $\sim 26^\circ\text{C}$ ). Se indica el tiempo transcurrido desde la primera adición de la MNasa hasta el momento en que es realizó la fricción. Resultados obtenidos en experimentos de fricción en presencia de MNasa 1/500 (A–F) y 1/5000 (G–I). El coeficiente de fricción determinado a partir de las curvas de fricción fue de  $\mu=0.39$  (B,  $t=35$  min),  $\mu=0.36$  (E,  $t=65$  min) y  $\mu=0.30$  (H,  $t=84$  min). Barras: 250 nm.

**Tabla 20.1:** Coeficiente de fricción de las placas de cromatina en presencia de diversos agentes desnaturizantes

Tratamiento <sup>a</sup>	$\mu^b$
Condiciones nativas	0.28±0.09 (n=106)
NaCl <sup>c</sup>	0.05±0.02 (n=22)
EDTA <sup>d</sup>	0.12±0.04 (n=37)
Pronasa <sup>e</sup> 1/2	0.55±0.06 (n=7)
1/5	0.49±0.09 (n=14)
1/10	0.29±0.12 (n=12)
1/20	0.26±0.09 (n=33)
1/40	0.30±0.11 (n=26)
MNasa <sup>f</sup> 1/10	0.75±0.09 (n=6)
1/40	0.91±0.08 (n=4)
1/100	1.19±0.24 (n=6)
1/500	0.56±0.20 (n=10)
1/850	0.16±0.05 (n=7)
1/5000	0.30±0.04 (n=4)

<sup>a</sup> Todas las medidas se obtuvieron en solución acuosa en presencia de Na<sup>+</sup> 5 mM, Mg<sup>2+</sup> 5 mM y los agentes desnaturizados indicados; Las digestiones con MNasa y pronasa además contenían Ca<sup>2+</sup> 1mM.

<sup>b</sup> Los valores listados corresponden a la media±desviación estándar obtenida a partir de las (n) medidas independientes. El valor de  $\mu$  de la mica en las condiciones de trabajo fue de 0.18±0.03 (n=26).

<sup>c</sup> Se añadió directamente una solución concentrada a la muestra en el microscopio; la concentración final fue de 2–3 M.

<sup>d</sup> El EDTA también fue añadido directamente a la muestra; la concentración final fue de 250–400 mM.

<sup>e</sup> La muestra adsorbida en mica fue tratada con la dilución indicada de una solución concentrada de pronasa (~1mg/ml).

<sup>f</sup> El mismo procedimiento se utilizó para el tratamiento con MNasa; se indican las diluciones de la solución concentrada (~226 U/ml).

Parte IV

# DISCUSIÓN GENERAL



## Capítulo 21

# Condiciones de existencia de las placas de cromatina

*Desde el descubrimiento de las placas como un nuevo elemento estructural en nuestro laboratorio (Caravaca, 2004), se han producido muchas críticas fundamentadas, en parte, en que los modelos propuestos en la bibliografía están basados en fibras de cromatina. El hecho de encontrar una estructura tan singular y diferente al resto de modelos, ha inducido a pensar que las placas pueden ser un artefacto químico producido por el método de obtención y/o los diversos tratamientos necesarios para la visualización de los cromosomas metafásicos mediante microscopía TEM convencional. No obstante, recientemente Eltsov et al. (2008) han demostrado, a partir de criosecciones de células vitrificadas y visualizadas con crio-EM, que en el interior del cromosoma metafásico no existen fibras de 30–40 nm. Esta observación hace menos contradictorio el modelo estructural propuesto por nuestro grupo basado en la existencia de placas como elemento estructural interno del cromosoma metafásico.*

### **Las placas no son un artefacto debido al método de preparación**

Inicialmente, en nuestro grupo los cromosomas se purificaban exclusivamente mediante un gradiente escalonado de sacarosa (Caravaca, 2004). La elevada concentración de sacarosa utilizada (hasta un 60 %) en este proceso puede inducir a pensar que las placas son un artefacto provocado por la cristalización de la propia sacarosa. Pero la visualización de placas en cromosomas purificados con gradientes de glicerol (hasta un 70 %) indica que las placas existen independientemente del uso de sacarosa a elevada concentración en la etapa de purificación de los cromosomas (ver Figura 15.1, pág. 127). En la misma línea, se podría pensar que el mero hecho de utilizar una solución altamente concentrada (ya sea sacarosa o glicerol) podría cristalizar o provocar la cristalización de algún componente presente en el medio en el que estaba disuelta la cromatina. Por esta razón, la observación de placas después de dializar

exhaustivamente las muestras (en solución o extendidas en rejilla; ver Figura 15.2, pág. 128), elimina la posibilidad de que las placas sean cristales provocados por los agentes utilizados en la purificación.

Estos resultados corroboraban los datos obtenidos mediante TEM con cromosomas visualizados directamente después de realizar el fraccionamiento celular en presencia de poliaminas sin sacarosa ni glicerol (Figura 15.3; pág. 129). También son coherentes con las observación de placas en cromosomas visualizados después de realizar una incubación en PME a 37 °C (Figura 15.4; pág. 130) y están de acuerdo con la observación de placas de cromosomas en diferentes condiciones estudiadas con anterioridad en nuestro laboratorio (Caravaca, 2004). Otro dato que confirma claramente que las placas no están provocadas por la cristalización de ningún componente químico, son los controles realizados (sin contener cromatina) que se preparaban con los mismos procedimientos, pero que no producían placas.

Por otra parte, tanto los controles como las muestras típicas analizadas mediante TEM se sometieron a un lavado final en H<sub>2</sub>O Milli-Q (20 min frente a un volumen de 4 ml) y después a una deshidratación en etanol que eliminaba definitivamente cualquier resto de sal o de compuesto susceptible de cristalizar o precipitar. Si tenemos en cuenta que la superficie de una rejilla puede contener adherida por capilaridad una gota de ~5–10 μl, el factor de dilución aproximado al realizar los lavados es del orden de 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> en solución acuosa, y aún mayor en solución etanólica (debido al volumen utilizado). La Tabla 21.1 indica la gran solubilidad de las sales utilizadas en la preparación de los tampones, y demuestra que los lavados pueden eliminar completamente estas sales.

**Tabla 21.1: Solubilidad de las sales**

Sal	Solubilidad <sup>a</sup>	
	H <sub>2</sub> O	EtOH
NaCl	6.1 M	insoluble
KCl	4.8 M	5.4 × 10 <sup>-2</sup> M
MgCl <sub>2</sub>	8.2 M	2.5 M
CaCl <sub>2</sub>	muy soluble	muy soluble

<sup>a</sup> Los datos corresponden a la solubilidad máxima determinada a 25 °C en los disolventes indicados. Datos procedentes del manual MERCK (Budavari et al., 1996).



## Las placas existen en suspensión

Todas las técnicas que se han utilizado en esta tesis hacen uso de una superficie para visualizar las placas y los cromosomas. Por lo que se podría pensar que la formación de las placas puede ser debida al uso de un soporte plano en la visualización del material. Hay varios resultados que ponen de manifiesto que la formación de placas es independiente del uso de una superficie en su visualización y que las placas existen en suspensión.

En las condiciones iónicas en las que se ha trabajado, la cromatina tiene una clara tendencia a formar láminas que pueden llegar a tener extensiones de varias micras. Este fenómeno es independiente del uso de una superficie de carbono en TEM o de mica en el caso de AFM. En la bibliografía podemos encontrar multitud de trabajos (Finch y Klug, 1976; Thoma et al., 1979; Widom y Klug, 1985; Widom, 1986; Williams et al., 1986; Woodcock et al., 1993; Leuba et al., 1994) algunos de los cuales se han realizado en nuestro laboratorio (Bartolomé et al., 1994, 1995; Bermúdez et al., 1998; Caño et al., 2006) en condiciones de menor fuerza iónica en las que se han visualizado fibras de cromatina sobre los mismos tipos de soporte. En los resultados de esta tesis también se ha podido observar cromatina de tipo fibrilar emanando de la propia estructura de las placas (Figuras 15.11 y 15.12, págs. 143 y 144).

Otro elemento clave, es la observación de que al realizar un entrecruzamiento en solución se visualizaron placas perfectamente formadas (como se muestra en la Figura 15.7, pág. 134), lo cual indica que las placas existen en solución previamente y no están inducidas por la superficie del sustrato. También refuerza este argumento el hecho de que cuando se realiza una curación de cromatina en suspensión, en condiciones compactantes, se observa un incremento substancial de la cantidad de placas (Figura 15.15C y D, pág. 150). Lo que sugiere que las placas se autoorganizan en solución si las condiciones iónicas son adecuadas.

## Las placas se pueden visualizar en condiciones fisiológicas

La mayor parte de los estudios realizados en nuestro grupo se han llevado a cabo mediante ME clásica y en el mejor de los casos mediante criomicroscopía electrónica (Castro-Hartmann, 2009). Con estas técnicas se visualizan las muestras en condiciones no fisiológicas. Hay que fijar y deshidratar las muestras para poder obtener imágenes TEM y en el caso de la criomicroscopía se vitrifica la muestra a muy baja temperatura para preservar su estructura. Estas limitaciones pueden inducir a pensar que las placas no son más que un artefacto producido por las técnicas utilizadas.

Uno de los puntos clave del trabajo experimental presentado en esta tesis, es la visualización de placas de cromatina en condiciones fisiológicas mediante microscopía de fuerza atómica. Esta técnica permite observar las placas en medio acuoso y a temperatura ambiente sin necesidad de fijar las muestras (ver Figuras 16.1–16.5,

págs. 155–161). Este resultado es importantísimo, ya que demuestra la existencia de placas mediante una técnica totalmente diferente a las utilizadas hasta el momento y en las condiciones más cercanas posibles a las que existen en la célula viva. Estos resultados indican que las placas son estables en solución. Prueba de ello, es que incluso se pudieron realizar imágenes en *contact mode* (realizando el mínimo de fuerza) sin necesidad de entrecruzar las muestras (ver Figura 16.10C, pág. 169 y imágenes del capítulo 20).

Durante el ciclo celular las condiciones iónicas en el interior de la célula van cambiando. Strick et al. (2001) han determinado mediante SIMS la concentración de los diferentes iones en el interior del cromosoma mitótico. Sus resultados indican que durante la mitosis hay una concentración de 12–22 mM de  $Mg^{2+}$  en el interior del cromosoma, y que este catión se distribuye ubicuamente en su interior. Los resultados obtenidos en los experimentos de AFM realizados en esta tesis indican que las placas existen en solución en el rango de concentraciones de  $Mg^{2+}$  (5–30 mM), que son compatibles con los valores fisiológicos. Todos estos datos refuerzan la idea de que las placas existen en los cromasomas en condiciones nativas.

## Capítulo 22

# Estructura y comportamiento mecánico de las placas

*Teniendo en cuenta los resultados discutidos en el capítulo anterior podemos afirmar que las placas no son un artefacto químico, son una entidad estructural que existe en solución y en condiciones fisiológicas. El conocimiento de la estructura y propiedades mecánicas es muy importante para establecer la posible funcionalidad de las placas en el interior del cromosoma metafásico.*

### Las placas son muy delgadas y tienden a apilarse

Las placas observadas mediante TEM y AFM tienen una área variable. Se han observado placas con una extensión de varias micras. Otra observación fundamental es la capacidad de apilarse unas sobre las otras formando estructuras multicapa (ver Figuras 15.1, 15.2 y 16.9; págs. 127, 128 y 168). Probablemente esta propiedad les confiere la capacidad de compactar y preservar en mayor grado la integridad estructural del DNA, una de las principales funciones del cromosoma metafásico.

Aunque en la mayoría de estudios estructurales en el campo de la cromatina se consideran los modelos basados en fibras, en un estudio previo mediante un sistema más sencillo consistenete en NCPs (i.e. nucleosomas aislados sin H1 ni DNA *linker*) estudiadas mediante crio-TEM, Leforestier et al. (2001) demostraron que las NCPs a elevadas concentraciones se asociaban dando lugar a estructuras laminares de varias capas. Este empaquetamiento laminar es debido a la formación de sistemas columnares gracias al los contactos cara-cara de los nucleosomas, del mismo modo que fue descrito por primera vez (ver introducción, capítulo 3) por Dubochet y Noll (1978); las interacciones electrostáticas que intervienen en esta estructura lamelar han sido estudiadas en un trabajo teórico propuesto por Cherstvy y Everaers (2006). Recientemente, Engelhardt (2007) ha propuesto que en las fibras de cromatina extendidas la asociación lateral provocada por una interdigitación de nucleosomas puede producir estructuras más densas compuestas por diversas láminas, y Hancock (2008)

ha encontrado experimentalmente que en presencia de elevadas concentraciones de agentes de *crowding*, polinucleosomas purificados pueden formar gruesas láminas de cromatina.

Los resultados de microscopía TEM y AFM excluyen la posibilidad de que las placas estén formadas por una monocapa de nucleosomas con las caras orientadas paralelamente a la superficie de la placa. Resultados de tomografía electrónica (Castro-Hartmann et al., 2010) y de crio-TEM (Castro-Hartmann, 2009) han corroborado esta conclusión. Otra disposición posible, sería que las placas estuviesen formadas por columnas de nucleosomas con el eje paralelo al de la superficie de la placa. Esta estructura fue observada en los agregados lamelares obtenidos a partir de NCPs purificadas (Leforestier et al., 2001, ver más arriba). Sin embargo, si tenemos en cuenta los datos obtenidos mediante TEM, AFM y AFS del grosor de la placa ( $\sim 6.5$  nm; ver Tabla 22.1), podemos constatar que el grosor encontrado para la placa es menor que el diámetro de una columna de NCPs (igual al diámetro de un nucleosoma:  $\sim 11$  nm; Luger et al., 1997; Harp et al., 2000). El hecho de que el grosor de una placa sea menor al diámetro de un nucleosoma y que en la observación mediante microscopía TEM no se pueda visualizar un patrón sencillo de nucleosomas, sugiere que los nucleosomas deben estar parcialmente inclinados en el interior de la placa de cromatina, permitiendo la interdigitación entre estos y una reducción considerable del grosor de la placa, de acuerdo con los datos de altura obtenidos. Esta reducción de grosor es consistente con la considerable reducción de longitud de los solenoides interdigitados actualmente aceptados en la bibliografía (Daban y Bermúdez, 1998; Robinson et al., 2006; Wong et al., 2007). La inclinación permite el apilamiento cara-cara de los nucleosomas de diferentes capas y explicaría la ligera reducción de altura de placas sobre otra placa, respecto a la altura observada para las placas monocapa sobre carbono (ver Figura 18.1B, pág. 178). Este fenómeno también explica la aparente altura mínima que presentan los histogramas de una placa sobre otra placa ( $\sim 4$  nm; Figura 18.1A), que seguramente corresponde a la altura mínima de una capa interdigitada.

Diversos resultados (McDowall et al., 1986; Daban, 2000, 2003; Mangenot et al., 2003) sugieren que la interacción cara-cara de los nucleosomas es la fuerza directriz de la formación de estructuras con una elevada concentración local de DNA. Estos trabajos fortalecen la interpretación estructural de las placas consideradas en el párrafo precedente. Además, Kepper et al. (2008) han demostrado mediante simulaciones de Monte Carlo que los solenoides interdigitados con un elevado ángulo de inclinación de los nucleosomas ( $40$ – $60^\circ$ ) facilitan el alineamiento y las interacciones cara-cara de nucleosomas, lo que se traduce en una mayor estabilidad en comparación con otras conformaciones posibles. Del mismo modo Depken y Schiessel (2009) también concluyen a partir de su modelado que los contactos entre las caras en el interior de la fibra, son vitales para su estabilidad y conformación. Schalech et al. (2005) también han observado en su modelo obtenido a partir de tetranucleosomas cristalizados que existe un contacto entre las caras. El estudio detallado a partir de

Tabla 22.1: Altura de la placa de cromatina

Técnica utilizada		Altura <sup>a</sup>
TEM	sobre otra placa	5.3±1.8 nm (n=26)
	sobre carbono	7.4±2.5 nm (n=77)
AFM <sup>b</sup>		4.0±0.9 nm (n=100)
AFS	Mg <sup>2+</sup> 5 mM	6.8±0.9 nm (n=30)
	Mg <sup>2+</sup> 20 mM	6.1±1.3 nm (n=32)

<sup>a</sup> Los valores listados corresponden a la media±desviación estándar obtenida a partir de las (n) medidas independientes.

<sup>b</sup> Este valor es substancialmente menor debido a la compresión de la placa por efecto la punta (sección 18.2).

difracción de Rayos X de alta resolución (Luger et al., 1997; Harp et al., 2000; White et al., 2001) indica que en las interacciones cara-cara está implicada una zona acídica (*acidic patch*) formada por las histonas H2A y H2B de la zona dorsal de una NCP, que establecen puentes de hidrógeno con los residuos básicos de la zona N terminal de la histona H4 de la zona ventral de la partícula adyacente. Estudios más recientes han determinado que el *acidic patch* (Chodaparambil et al., 2007; Zhou et al., 2007) es muy importante para la regulación del plegamiento y la autoasociación de la cromatina en la formación de estructuras de orden superior (Caterino y Hayes, 2007).

Todos estos datos experimentales son coherentes, aunque no han sido obtenidos con placas de cromatina, con las interacciones internucleosomales que hemos propuesto que se pueden establecer en el interior de las placas de cromatina y posibilitan la formación de un sistema multilaminar.

### Las placas son flexibles y dinámicas

La cromatina es un sistema supramacromolecular muy dinámico y con una gran flexibilidad estructural (Widom, 1986; Caño et al., 2006). La comparación de imágenes de TEM con las de AFM indica que se observan mucho más frecuentemente estructuras multicapa en las imágenes de TEM. Probablemente, esto se produce en los estudios de AFM debido a la interacción de la punta con la placa, incluso realizando muy poca fuerza en AM-AFM *mode*, hay una compresión elástica que provoca la reestructuración de la cromatina. Eltsov et al. (2008) han sugerido que la cromatina se comporta como un polímero fundido. Este comportamiento le confiere unas características muy dinámicas a lo largo de la cadena de DNA, que permiten la interacción entre nucleosomas de zonas distantes. Nuestros resultados, también indican que los nucleosomas no forman una red cristalina rígida. Probablemente se

comportan como un cristal líquido en el que los nucleosomas mantienen un cierto orden. Mangenot et al. (2003), han descrito diversas fases con propiedades de cristal líquido en estudios realizados con NCPs purificadas. La existencia de grados de libertad en el interior de las placas, permitiría explicar porque no ha sido posible la visualización de un patrón estructural en la superficie de las placas de cromatina (ver Figuras 15.6 y 16.3, págs. 132 y 158), lo cual ha impedido asignar la disposición de los nucleosomas en su interior.

Por otra parte, en los experimentos de fricción se han aplicado elevadas fuerzas laterales (hasta  $\sim 5$  nN) sin provocar ningún daño sobre la estructura de la placa nativa como se puede observar en la Figura 20.3A–C (pág. 203), por ejemplo. Este dato es importante si tenemos en cuenta que la fuerza necesaria para romper una molécula de DNA desnudo al ser estirado es de  $\sim 1$  nN (Bustamante et al., 2000). De acuerdo con la teoría tribológica básica (Salmeron, 2001; Cannara et al., 2007; Mo et al., 2009), la relativamente elevada fricción obtenida sobre las placas nativas indica que las placas son capaces de disipar la energía cinética absorbida de la punta de AFM. La placa es capaz de comportarse elásticamente cuando es deformada por la punta. Teniendo en cuenta que la fuerza necesaria para desensamblar un nucleosoma al ser estirado por sus extremos (Bennink et al., 2001; Cui et al., 2004; Kruithof et al., 2009) o por torsión (Bancaud et al., 2006) es muy pequeña, el paso de la punta podría producir disociaciones transitorias. También se ha observado a nivel experimental con DNA e histonas purificadas (Aragay et al., 1988, 1991; Samsó y Daban, 1993) que hay procesos espontáneos de reasociación y plegado muy rápidos, en los que intervienen intermediarios parcialmente desasociados y nucleosomas que contienen un exceso de histonas. Si pensamos en el nucleosoma como una entidad dinámica que engloba un conjunto de isoformas muy alejado del concepto canónico (van Holde y Zlatanova, 1999; Lavelle y Prunell, 2007; Zlatanova et al., 2009; ver introducción, sección 2.2), tienen mucho sentido los planteamientos de dinámica y elasticidad mecánica de las placas. Estos procesos pueden tener lugar durante el experimento de fricción y probablemente son responsables de la disipación de la energía cinética de la punta que permite que este proceso sea reversible y no se produzca ninguna deformación plástica en condiciones nativas.

Por otra parte este comportamiento flexible puede ser una de las razones por la cual los valores de altura determinados a partir de AFM en solución ( $\sim 4$  nm) sean menores en comparación con los obtenidos a partir de muestras sombreadas unidireccionalmente (Tabla 22.1). Y fue totalmente corroborado al realizar un estudio de indentación de las placas de cromatina mediante AFS, determinando que la placa presenta un régimen elástico que explica la reducción de la altura determinada mediante AFM. La altura de una placa en condiciones nativas y en medio acuoso es de  $\sim 6.5$  nm (Tabla 22.1). Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Jiao y Schäffer (2004) en los que el estudio sobre cromosomas muestra como la forma es dependiente de las condiciones en las que se realiza la imagen debido a una compresión.

A partir del comportamiento elástico de las placas, se calculó el módulo de Young de la estructura ( $\sim 0.2$  GPa) ajustando los datos al modelo de Hertz. Estos datos son similares a los encontrados para proteínas globulares y DNA en estudios de espectroscopia de fuerza ( $\sim 0.5$  GPa; Zlatanova et al., 2000) lo que constituye otro dato en favor de que no se trata de un artefacto cristalino. Si tenemos en cuenta los datos de estrés mecánico y del módulo de Young de materiales sólidos y cristales iónicos ( $10$ – $10^3$  GPa; Fraxedas et al., 2002; Callister y Rethwisch, 2008) observaremos que la placa está muy por debajo ( $10^2$ – $10^5$  ordenes de magnitud) del valor que presentan los cristales de sales iónicas. Estas observaciones, junto a los datos de fricción y monitorización en tiempo real nos permiten descartar totalmente que las placas son un artefacto químico provocado por la cristalización de algún elemento utilizado durante la preparación de la muestra.





## Capítulo 23

# El DNA y las histonas como una red bidimensional en la placa

*Hasta aquí se han discutido los datos sobre la estructura y propiedades de las placas estudiadas mediante TEM y mediante AFM en medio acuoso. El análisis de fricciones realizado en esta tesis es pionero en el campo de la cromatina, ya que en Biología los estudios de Nanotribología mediante LFM de forma cuantitativa y en líquido se restringen a dos trabajos sobre bicapas lipídicas (Grant y Tiberg, 2002; Oncins et al., 2005). Además, esta tesis ha permitido demostrar que las placas contienen DNA y proteínas en su interior y presentan un comportamiento compatible con las propiedades típicas de la cromatina condensada.*

### **Las placas contienen una estructura lineal que forma un tejido**

Los resultados de desnaturalización, obtenidos mediante TEM, después de añadir NaCl a elevadas concentraciones (1–2 M) mostraron emanaciones fibrilares de los bordes de las placas (Figuras 15.11 y 15.12, págs. 143 y 144), con uno grosor que es consistente con fibras de cromatina parcialmente desnaturalizada (diámetro de  $15.8 \pm 5.5$  nm para el caso de desnaturalización post-entrecruzamiento). Estos resultados indican que en las placas hay un elemento lineal que, en las condiciones típicas en las que la cromatina se desnaturaliza (Aragay et al., 1991; Bartolomé et al., 1995; Bermúdez et al., 1998), emana del interior de las placas. Los estudios de raspado realizados en solución mediante AFM (aplicando fuerzas muy elevadas) demostraron que las placas solamente se rompían cuando se raspaba una zona que contenía los bordes de la placa. Por el contrario, un raspado en una zona interna podía provocar la reorganización de pequeños agujeros pero en ningún caso la rotura de la placa (ver Figura 16.12C→D, pág. 172). Estos resultados sugieren que la placa es un sistema constituido por un filamento que forma un tejido o red bidimensional que está más fuertemente cohesionado en la zona interna que en las periferias. Si lo comparamos con un tejido macroscópico como por ejemplo una tela, este planteamiento tiene

sentido, ya que para desgarrar una tela es más fácil hacerlo desde los bordes que desde el interior. Por otra parte, tal como se ha demostrado mediante un análisis de fricción (Barrena et al., 1999, 2000), también es coherente con el comportamiento de sistemas laminares más sencillos formados por asociaciones de pequeñas moléculas, en los que existe una cohesión mayor en las zonas internas que en las externas.

### Las placas están formadas por cromatina

Uno de los problemas más importantes que nos encontramos al intentar demostrar que las placas son un elemento estructural del cromosoma metafásico (como se comentó en el capítulo 21) es la dificultad de encontrar técnicas que indiquen de forma inequívoca que las placas están compuestas por cromatina, y por lo tanto por histonas y DNA. La monitorización en tiempo real de las placas después de añadir un volumen de NaCl concentrado (4 M) permitió observar la desnaturalización total de las estructuras a medida que se realizaban las imágenes<sup>1</sup>. Esto concuerda con lo esperado para un estructura compuesta por cromatina ya que a altas concentraciones de NaCl ( $\geq 0.6$  M) se disocian las histonas del DNA (Widom, 1986; Burton et al., 1978; Yager et al., 1989; Bartolomé et al., 1995; Carruthers et al., 1998; Caño et al., 2006) provocando una desestabilización de la placa de cromatina (ver Figuras 19.3–5; págs. 187–189). Estos resultados, junto a la observación de fibras procedentes de placas parcialmente desnaturalizadas estudiadas mediante TEM (ver Figuras 15.11 y 15.12; págs, 143 y 144), refuerzan la idea de que la placa está compuesta por cromatina.

La eliminación del  $Mg^{2+}$  con una concentración de EDTA muy elevada (400 mM) provocó la desestabilización de las placas del mismo modo que con NaCl. El  $Mg^{2+}$  es un ion compactador y estabilizador de la cromatina (Widom, 1986; Bartolomé et al., 1995; Carruthers et al., 1998; Caño et al., 2006), por lo que la eliminación del medio de la actividad efectiva de este catión, por efecto del EDTA, provoca que la placa sea menos estable en solución.

Los resultados de LFM de placas en presencia de EDTA y NaCl indicaron un cambio drástico en comparación con la fricción sobre cromatina nativa. En la ma-

---

<sup>1</sup>En AFM hemos podido realizar el seguimiento de la desnaturalización debido a que estamos perturbando mecánicamente, en cierto grado, la estructura al realizar la imagen y por lo tanto forzamos al sistema a mostrar su inestabilidad. En el apartado de desnaturalización en tiempo real se utilizó una frecuencia de resonancia de la punta ( $\sim 13$  kHz) que está por encima del valor nominal ( $\sim 7$  kHz) para las puntas utilizadas en AM-AFM *mode* (ver sección 11.4), esto tiene como resultado que hay una modificación del modo de oscilación típico de la punta (el típico esquema de la palanca doblándose por la zona media), vibrando en armónicos mucho más complejos (flexión por más de un punto a lo largo del *cantilever* e incluso llegando a una torsión lateral, Stark et al., 2001) lo cual se traduce en una mayor fuerza de contacto al realizar la imagen. Esto nos ha permitido realizar imágenes sin perturbar las placas en estado nativo, pero al mismo tiempo realzar los cambios en la estabilidad estructural de las placas provocados por los diferentes agentes desnaturalizantes. Por esta razón, al realizar imágenes en *contact mode* aplicando muy poca fuerza no observamos una desestructuración tan evidente como en los experimentos de desnaturalización en tiempo real.

yoría de los casos, la adición de EDTA o NaCl, provocó un cambio en el patrón típico (ver Figuras 20.3 y 20.5; págs. 203 y 206 respectivamente) en el que se perdía la transición abrupta (zona **b** de la Figura 20.1B; pág. 200). Pero el cambio más importante observado fue una gran reducción del coeficiente de fricción de las placas en presencia de EDTA ( $\mu=0.12\pm0.04$ ) y NaCl ( $\mu=0.05\pm0.02$ ). La reducción de  $\mu$  indica que la placa no está absorbiendo tanta energía cinética de la punta (Salmeron, 2001; Cannara et al., 2007), debido a que se desliza por encima de la placa sin dar lugar a una gran deflexión lateral (Oncins et al., 2005). En el caso del EDTA, la reducción del coeficiente de fricción puede estar provocado por un menor apantallamiento de las cargas negativas de los fosfatos del DNA por el  $Mg^{2+}$ , lo que provoca: (i) La desestructuración de la cromatina (como se ha comentado más arriba) y (ii) Un incremento de  $\sigma^-$  de la placa y por lo tanto una mayor repulsión de la punta<sup>2</sup>. Este dato es consistente con lo resultados de espectroscopia de fuerza atómica (Figura 17.1, pág.174). A una concentración de  $Mg^{2+}$  5mM se puede observar una repulsión en el momento de la interacción punta-placa (región **b**) debido a un menor apantallamiento de las cargas en comparación con el comportamiento en presencia de  $Mg^{2+}$  20 mM, en el que no hay prácticamente repulsión (región **b'**; Butt, 1991). El NaCl a alta concentración compite con las histonas por la interacción con el DNA, apantallando tanto la carga de los fosfatos como de las histonas, dando lugar a una desnaturalización y/o disociación de las histonas. Sin embargo, los resultados indican que la fricción entre la punta y la placa se reduce indicando que hay una repulsión remanente (Oncins et al., 2005).

Aunque la monitorización en tiempo real y el análisis de fricciones de placas en presencia de EDTA y NaCl indicaban el comportamiento esperado para la cromatina, los datos inequívocos para determinar la composición de las placas fueron los obtenidos al digerir las placas con proteasas y con MNasa. Al monitorizar en tiempo real la digestión con proteasas el resultado fue contundente. Las placas se desnaturalizaron al añadir tanto el coctel de pronasa (Figura 19.6; pág. 191) como la tripsina (Figura 19.7; pág. 192), lo que demostraba claramente que las placas contenían proteínas en su interior. Teniendo en cuenta que el material de partida eran cromosomas de células HeLa purificados y que según los datos presentados por Uchiyama et al. (2004, 2005) aproximadamente el 75 % del contenido molar proteico del cromosoma metafásico humano son histonas, podemos concluir que las placas contienen histonas en su interior. Por otra parte, la monitorización en tiempo real de la digestión con MNasa indicaba que las placas se veían afectadas estructuralmente a medida que la MNasa iba actuando (ver por ejemplo Figura 19.11; pág. 197). Este resultado indica claramente, teniendo en cuenta la altísima especificidad de la MNasa, que las placas estaban compuestas por DNA. Por lo tanto, los resultados apuntan a que las placas contienen los dos elementos fundamentales de la cromatina: DNA e histonas.

Un análisis más detallado mediante LFM corroboró el efecto de la pronasa y la

---

<sup>2</sup>La punta a pH 7 tiene  $\sigma^-$  (Oncins et al., 2005)

MNasa sobre las placas de forma cuantitativa. Los resultados obtenidos mostraron como después de añadir estas enzimas a elevadas concentraciones se producía un incremento drástico del coeficiente de fricción en comparación con las placas nativas (Tabla 20.1, pág. 218), indicando que se estaban alterando mucho las propiedades mecánicas de las placas. Al ir diluyendo la concentración de pronasa y la de MNasa se observaba un restablecimiento de la fricción hasta llegar a los valores de  $\mu$  de una placa nativa. Otro elemento importante asociado al análisis de fricción es que en ambos casos después de realizar una digestión, con una concentración muy elevada, se podía observar la rotura de la placa en la zona en la que se realizaba el experimento de fricción (Figuras 20.6, pág. 208 y 20.10, pág. 214)<sup>3</sup>. En este caso el comportamiento era diferencial, ya que la formación de agujeros era más frecuente en las digestiones con MNasa (ver Figura 20.9; pág. 213) e incluso se podía observar a lo largo de digestiones con MNasa diluida hasta 1/50. En contraste, la formación de agujeros con pronasa solo ocurrió en la concentración más elevada (1/2 ó 0.5 mg/ml) y después de realizar sucesivos experimentos de fricción sobre la misma zona.

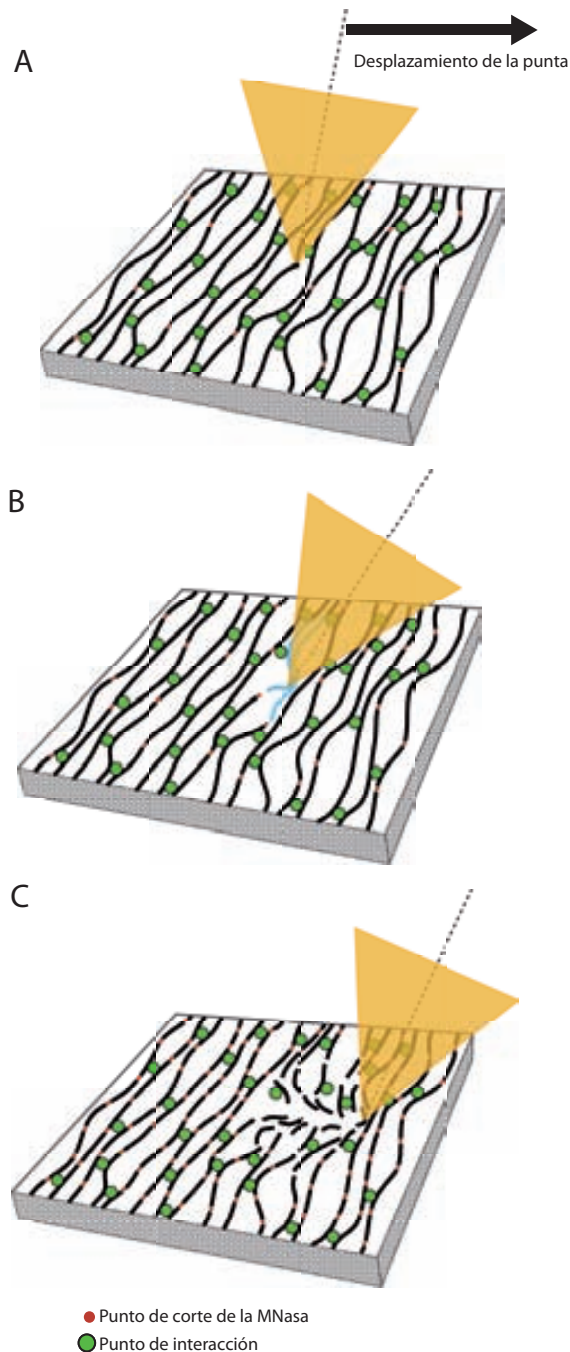
Al digerir la placa con MNasa o proteasas estamos rompiendo el DNA o las histonas, este hecho provoca que la placa esté menos cohesionada estructuralmente y por lo tanto puede ceder al paso de la punta durante el experimento de fricción. La placa absorbe más energía cinética de la punta lo cual, de acuerdo con las leyes de la nanotribología (Salmeron, 2001; Cannara et al., 2007; Mo et al., 2009), se traduce en una mayor fricción entre la punta y la placa. Si comparamos los valores de  $\mu$ , las placas digeridas con MNasa llegan a valores mucho más elevados ( $\mu > 1$ ) en comparación con la pronasa ( $\mu \sim 0.6$ ). Esta diferencia en los valores de  $\mu$  se puede explicar considerando que la placa está compuesta por cromatina, y que el DNA constituye una red bidimensional a lo largo del plano de la placa. Cuando digerimos las placas con pronasa también estamos alterando la estructura mecánicamente, pero aunque las histonas resulten digeridas aún pueden mantener uniones con el DNA, que permanece covalentemente intacto formando una red que permite mantener un comportamiento bastante elástico de las placas. Sin embargo, cuando realizamos una digestión con una actividad de MNasa muy elevada, en este caso, estamos alterando el elemento covalente lineal que confiere cohesión al conjunto de la placa. En consecuencia, al pasar la punta por encima de la placa se encuentra con una estructura mecánicamente más alterada. Aunque la placa está fragmentada la estructura se mantiene gracias a que el DNA sigue unido a las histonas, y el conjunto es capaz de mantener las interacciones inter- e intrafibra. Gracias a estas interacciones remanentes es posible visualizar las placas incluso cuando se han digerido con una cantidad elevada de MNasa. El mayor incremento de  $\mu$  observado después de la digestión con MNasa es debido a que la placa está compuesta por fragmentos de

<sup>3</sup>Aunque se rompe y se arrastra material, y por lo tanto puede haber un cierto contacto de la punta con el soporte de mica, el coeficiente de fricción observado es totalmente diferente al coeficiente de la mica ( $0.18 \pm 0.03$  n=26). Esto indica que la fricción es debida a la cromatina digerida que entra en contacto con la punta en cada línea de escaneado.

cromatina relativamente pequeños (ver Figura 23.1C, pág. 236) lo cual incrementa los grados de libertad del sistema (o la entropía). Este sistema, de acuerdo con la teoría nanotribológica, puede absorber más energía mecánica de la punta ya que hay más elementos susceptibles de absorberla. Este resultado es un dato más a favor de que el DNA constituye una red bidimensional en el interior de la placa y es una evidencia clara, junto con los datos comentados anteriormente, de que el DNA tiene el papel más importante como elemento de sustento estructural dentro de la placa de cromatina.

Los resultados discutidos antes, son coherentes con los estudios de *stretching* realizados en el grupo de John Marko (Poirier y Marko, 2002b), en los que observaron como después de digerir cromosomas en tensión con MNasa y enzimas de restricción, estos perdían totalmente el comportamiento elástico. Por el contrario, cuando estos autores realizaban digestiones con proteasas (Pope et al., 2006) el cromosoma no perdía totalmente el comportamiento elástico (manteniendo la integridad estructural) pero había una reducción del módulo del Young.

Si nos centramos en el caso de la MNasa, observaremos como el coeficiente de fricción máximo se establece a concentraciones intermedias de MNasa (dilución 1/100), contrariamente a lo que ocurre con la pronasa (ver Tabla 20.1; pág. 218). Este comportamiento aparentemente anómalo también se puede explicar si consideramos que la placa es una red bidimensional compuesta por un filamento de cromatina. Al digerir poco, el DNA está roto por un número menor de puntos (ver Figura 23.1B) y presenta regiones en las que el DNA mantiene la integridad a lo largo de una porción suficientemente larga como para mantener interacciones con zonas estructuralmente estables. De esta forma, al deslizar la punta por encima de la placa se pueden establecer contactos con algunas de estas zonas interconectadas, lo cual implica la deformación plástica de una área mucho mayor que el área de contacto directa entre la punta y la placa, y provoca un gran incremento del coeficiente de fricción. A medida que diluimos más la MNasa hay una mayor integridad estructural y una menor proporción de zonas por donde la punta puede deformar plásticamente la estructura (ver Figura 23.1A), reduciéndose el coeficiente de fricción. Finalmente, cuando la concentración de MNasa es muy elevada (ver Figura 23.1C), la cohesión de la estructura está muy disminuida y el coeficiente de fricción es menor que el observado en presencia de concentraciones intermedias de MNasa.



**Figura 23.1: Esquema de fricción sobre una placa digerida con MNasa.** Actualmente, no tenemos información de la trayectoria interna del filamento de cromatina ni de la disposición exacta de los nucleosomas en el interior de la placa. Por esta razón, esta figura representa de forma esquemática la interacción entre la punta y una placa constituida por una red bidimensional de DNA e histonas a medida que se incrementa la actividad de MNasa. Los filamentos negros esquematizan la cromatina en el interior de la placa. La placa mantiene su cohesión gracias a las interacciones esquematizadas con un círculo verde a lo largo del filamento de cromatina. Los puntos de corte producidos por la MNasa se indican con un círculo rojo. **(A)** Situación en la que se ha utilizado una actividad muy baja de MNasa (dilución 1/5000), en la que  $\mu \sim 0.3$  y el comportamiento mecánico global es similar al de una placa nativa (ver Tabla 20.1, pág. 218). **(B)** En condiciones de actividad de MNasa intermedia (dilución 1/100) se obtiene el máximo valor de  $\mu \sim 1.2$ . Esto es debido a que el espaciado promedio entre los cortes provocados por la MNasa (círculo rojo) son lo suficientemente grandes como para que los filamentos de cromatina mantengan contactos estables, provocando que la punta deforme plásticamente un área mayor (filamento de color azul) que la de contacto directo entre la punta y la muestra. Esto provoca una mayor disipación de la energía cinética de la punta y por lo tanto una mayor fricción que en **A** y **C** (ver texto). **(C)** Placa digerida con una elevada actividad de MNasa (dilución 1/10). En esta situación la placa está más afectada mecánicamente por lo que la punta puede crear un agujero fácilmente en la zona en la que se realiza el experimento de fricción (ver Figura 20.9C), y tiene una fricción ( $\mu \sim 0.8$ ) intermedia entre las situaciones **A** y **B**.

## Capítulo 24

# El cromosoma metafásico: La placa como elemento estructural

*Por último queda hacer referencia al cromosoma metafásico en conjunto. Existen varios modelos que intentan explicar cómo la cromatina se empaqueta formando estructuras de orden superior en el cromosoma durante la metafase (ver introducción sección 5.4). Se han propuesto modelos basados en lazos con un “scaffold” central (Paulson y Laemmli, 1977; Pienta y Coffey, 1984). También se ha propuesto un modelo formado por cromómeros (Wanner y Formanek, 2000) y más dinámico en el que la cromatina forma un “network” (Marko, 2008). Un modelo reciente, basado en datos de crio-EM que demuestra que no hay fibras de cromatina de 30 nm en el cromosoma metafásico, considera que la cromatina se empaqueta dentro de la cromátide como si fuese un polímero fundido (Eltsov et al., 2008).*

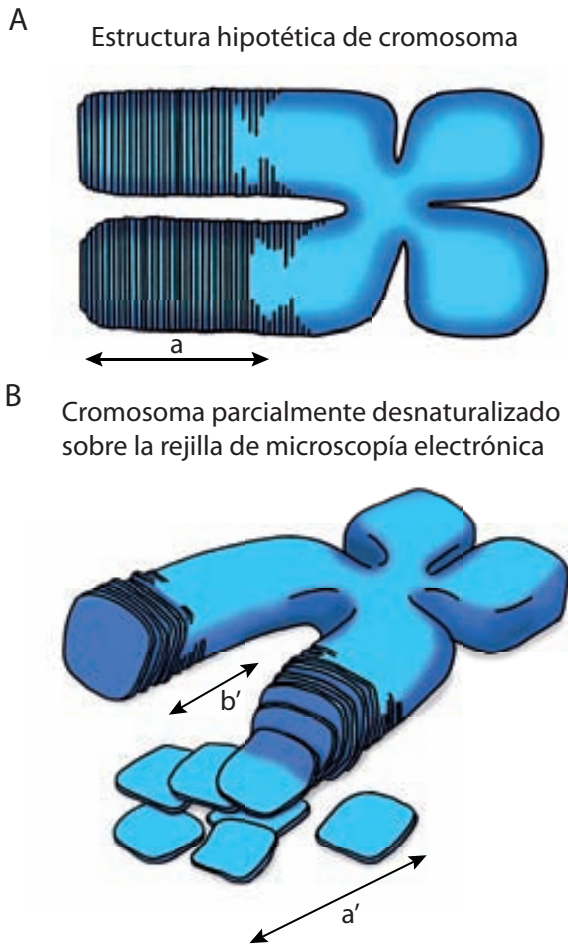
### La placa dentro del cromosoma metafásico

Los estudios realizados mediante TEM en esta tesis indican que las placas son un elemento estructural del cromosoma compacto. Estos resultados junto a los resultados obtenidos en nuestro grupo (Caravaca, 2004; Caño, 2007; Castro-Hartmann, 2009) indican que la placa es el elemento estructural dominante de las cromátides en condiciones nativas. Otro dato que refuerza el hecho de que la placa es un elemento intrínseco del cromosoma metafásico es que al realizar un tratamiento mecánico con jeringuilla se incrementa el rendimiento de visualización, lo que sugiere claramente que existen en su interior y al alterar los cromosomas se pueden visualizar en mayor número placas multicapa dispersas. Teniendo en cuenta que tanto los cromosomas como las placas extruidas de estos tienen una apariencia multilaminar, en nuestro laboratorio hemos propuesto que el cromosoma debe estar formado por el apilamiento sucesivo de placas. La manera en que el DNA conecta las diferentes capas aun no está claro. Sin embargo, si tenemos en cuenta la estricta relación que existe entre el mapa citogenético y la secuencia del DNA dentro de un cromosoma (Internatio-

nal Human Genome Sequencing Consortium, 2001; The BAC Resource Consortium, 2001), estos datos nos indican claramente que una sola molécula de DNA va rellenando progresivamente una cromátide desde un extremo hasta el otro. Esta restricción impide la posibilidad de un modelo basado en placas paralelas al eje de la cromátide. Por lo tanto, es lógico pensar que si el cromosoma en condiciones nativas está formado por placas, éstas deben estar dispuestas en un plano perpendicular al eje de la cromátide, como se puede observar en el esquema del cromosoma metafásico presentado por nuestro grupo (Figura 24.1). Las placas observadas tanto con TEM como con AFM tienen una superficie variable pero su extensión, en la mayoría de los casos, es igual o mayor que el área formada por la sección de un a cromátide (ver Figuras 15.1, pág. 127; 15.13, pág. 147; 16.2, pág. 157 y 16.5, pág. 161). Pero, si las placas dentro del cromosoma están dispuestas ortogonalmente, ¿cómo es que en las imágenes las placas extruidas de cromosomas metafásicos son paralelas al film de carbono y en consecuencia al eje de las cromátides?. Este fenómeno tiene fácil explicación si consideramos la manera de visualizar las estructuras en microscopía, tanto TEM como AFM. Cuando visualizamos las placas en TEM, por ejemplo, lo que vemos es material extruido o parcialmente extruido de los cromosomas; esta extrusión, directamente conectada con el cromosoma, o independiente, está dispuesta en menor o mayor grado sobre una superficie, film de carbono en TEM o la mica en AFM. Estos dos soportes provocan que en muchos casos el plano de las placas se disponga de forma paralela al eje de las cromátides (ver esquema en Figura 24.1a').

La observación del clásico bandeo citogenético de los cromosomas puede ser una evidencia directa de la existencia del apilamiento de las placas orientadas perpendicularmente respecto al eje de las cromátides. La identificación de los diferentes cromosomas está basada en diversas técnicas de tinción que permiten visualizar el bandeo de los cromosomas fácilmente mediante microscopía óptica (Sumner, 1989; Castleman, 2000). En los cromosomas teñidos las bandas se disponen aproximadamente ortogonales al eje de la cromátide. Algunos autores (Oberringer et al., 2003; Tamayo, 2003b), a partir de observaciones en AFM en seco de cromosomas preparados mediante la típica preparación de citogenética, sugieren que mediante esta técnica es posible visualizar el bandeo citogenético. La orientación transversal de las bandas se ha caracterizado y esquematizado ampliamente mediante ideogramas para los cromosomas humanos (ISCN, 2005). Las técnicas típicas utilizadas en el estudio del bandeo utilizan tratamientos con metanol/ácido acético que altera claramente la estructura nativa interna del cromosoma metafásico humano. Aun que en los estudios clásicos del bandeo el cromosoma está fijado con medios orgánicos y por lo tanto la cromatina está localmente desnaturalizada, si existe una disposición laminar de la cromatina la cromátide puede presentar un patrón bandeo a nivel de conjunto. Por otra parte, también se ha podido visualizar el bandeo, aproximadamente ortogonal al eje de la cromátide, en cromosomas en condiciones nativas (no tratados con disolventes orgánicos) teñidos con marcadores fluorescentes (Saitoh y Laemmli, 1994). Las bandas citogenéticas son mucho más gruesas que la altura de





**Figura 24.1: Modelo de placas delgadas para la condensación de la cromatina en los cromosomas metafásicos. (A)** Los resultados encontrados en nuestro grupo sugieren que las cromátides están compuestas por placas delgadas de cromatina. Las placas estarían apiladas perpendicularmente y a lo largo del eje de la cromátide produciendo cromátides con una superficie lisa; para simplificar el dibujo se ha esquematizado la disposición de las placas solo en la región **a**. **(B)** La preparación, extensión y los diversos tratamientos realizados para estudiar más detalladamente la ultraestructura del cromosoma metafásico, provocan la distorsión y el deslizamiento de las placas de cromatina; esto se ha esquematizado en el extremo de los brazos largos del cromosoma. Las placas extruidas que rodean las cromátides son orientadas por el film de carbono haciéndolas claramente visibles (**a'**). Solamente las placas distorsionadas en el interior de los cromosomas son las que se pueden observar con relativa facilidad en la periferia de las cromátides (**b'**).

una placa de cromatina ( $\sim 6.5$  nm) por lo tanto una banda podría estar formada por la asociación de diversas placas. El estudio de *stretching* de cromosomas ha demostrado que cuando se estira un cromosoma por los extremos, a partir de una banda gruesa aparecen varias bandas paralelas más finas (Hliscs et al., 1997). Todos estos datos sugieren que el bandeo citogenético es debido a la agrupación de diversas placas que contienen en su interior una composición adecuada de DNA para la asociación de los agentes de tinción utilizados en los métodos de bandeo citogenético. La relativamente pequeña fuerza de interacción entre placas de cromatina (ver más adelante) puede estar relacionada con la separación de bandas en minibandas en los experimentos de *stretching*.

### El cromosoma metafásico es flexible y dinámico

El cromosomas metafásico como conjunto es una estructura muy blanda, razón por la cual su visualización mediante AFM en solución no fue posible. Sólo después de realizar una fijación con glutaraldehído se pudieron visualizar, con muchas dificultades, cromosomas metafásicos (ver Figura 16.2I, pág. 157). Esto es debido a que al escanear un cromosoma con la punta de AFM en condiciones nativas se comporta como un gel de muy baja consistencia (como si se tratara de una estructura mucilaginoso) y por lo tanto se deforma. Estudios realizados sobre cromosomas rehidratados muestran que la topografía obtenida varía en función de la fuerza que se ejerce con la punta al realizar la imagen, sugiriendo que incluso en tratamientos en los que el cromosoma está expuesto a condiciones no fisiológicas es una estructura elástica y deformable (Fritzsche y Henderson, 1997; Jiao y Schäffer, 2004). En la bibliografía, la mayoría de trabajos publicados sobre estructura de cromosomas estudiados mediante AFM (también es extensivo a los estudios realizados mediante EM) han sufrido algún paso no nativo. Esto es, en general los cromosomas observados se han preparado mediante la metodología típica de técnicas de citogenética (fijados con metanol/ácido acético; Tamayo et al., 1999; Tamayo, 2003a; Sugiyama et al., 2004), en presencia de hexilen glicol (Hoshi et al., 2006), en condiciones de deshidratación con altas temperaturas de 70–80 °C (Oberringer et al., 2003; Wu et al., 2006) o en el mejor de los casos realizando un proceso de rehidratación del cromosoma (Fritzsche y Henderson, 1997; Stark et al., 1998; Jiao y Schäffer, 2004). En la mayoría de los estudios mediante AFM en las condiciones comentadas, se pueden obtener cromosomas de morfología muy similar a las observados mediante preparaciones típicas en metanol/ ácido acético en TEM y SEM. Los tratamientos con disolventes orgánicos y la deshidratación de los cromosomas compromete seriamente la estructura local, debido al efecto que tiene sobre la estructura de las proteínas y la conformación del DNA. Estudios de la topografía y del volumen mediante AFM demuestran que los cromosomas rehidratados recuperan la elasticidad e incrementan de 3–6 veces el volumen (Fritzsche y Henderson, 1997; Stark et al., 1998). Experimentos de mayor relevancia son los realizados con cromosomas en condiciones nativas, que indican que 1/3 parte del volumen del cromosoma es esencialmente agua (Poirier et al., 2002). Estos estudios constituyen una prueba directa de que el cromosoma contiene una gran cantidad de agua en su interior. Por otra parte, el módulo de Young de un cromosoma rehidratado analizado a partir de estudios de indentación (Stark et al., 1998; Jiao y Schäffer, 2004) es 2–3 órdenes de magnitud superior al módulo Young obtenido a partir de experimentos de *stretching* en el interior de la célula (Houchmandzadeh et al., 1997) corroborando que el proceso de deshidratación afecta la integridad estructural de los cromosomas (Jiao y Schäffer, 2004). El cromosoma en condiciones nativas es una estructura muy flexible y dinámica debido a la elevada hidratación, y a sus propiedades estructurales, pudiendo variar en función del tipo de medio y de las condiciones iónicas (Poirier et al., 2002). Por lo tanto, la realización

de un estudio ultraestructural fidedigno, no puede ser llevado a cabo en condiciones no fisiológicas.

El módulo de Young de una placa en condiciones nativas ( $\sim 0.2$  GPa) es mucho mayor que el encontrado para cromosomas nativos ( $\sim 10^3$  Pa; Houchmandzadeh et al., 1997; Poirier y Marko, 2002a). Esto indica que los cromosomas metafásicos son estructuras blandas compuestas por estructuras más rígidas; las placas de cromatina tienen una rigidez elástica semejante a la observada para DNA y proteínas. Por otra parte, los resultados presentados sugieren que la interacción entre placas adyacentes es menor que las fuerzas que mantienen la cohesión del filamento en el interior de la placa. Estas diferencias podrían explicar las propiedades elásticas del cromosoma en los experimentos de *stretching*. Finalmente, es muy importante considerar que el comportamiento flexible y la consistencia mecánica que muestran las placas puede ser un mecanismo efectivo para proteger la integridad mecánica del DNA genómico frente a las fuerzas establecidas por el huso mitótico ( $\sim 1$  nN) durante los procesos de segregación en la mitosis (Nicklas, 1983).

### Implicaciones estructura-función

El plegado de la fibra de cromatina formando placas en el interior del cromosoma es incompatible con un modelo de cromosoma metafásico basado en fibras de 30 nm. Por otra parte, que el modelo presentado este basado en placas, no excluye la coexistencia de otros niveles de organización del filamento de cromatina. Por ejemplo, la unión de secuencias específicas de DNA a proteínas no histonas puede dar lugar a la formación de lazos que se hacen visibles cuando se tratan los cromosomas con elevadas concentraciones de EDTA (Marsden y Laemmli, 1979) o después de haberles eliminado las histonas (Paulson y Laemmli, 1977). De hecho, si tenemos en cuenta los experimentos de desnaturalización con NaCl realizados en esta tesis (Figura 15.12, pág. 144), estos sugieren que existe una conexión directa entre la placa y el filamento de cromatina. La fibra de cromatina es una molécula con una elevada dinámica estructural que puede variar su estado de compactación en función de las concentraciones de iones divalentes (Tremethick, 2007). Estudios presentados por Strick et al. (2001) demuestran que la concentración de iones divalentes varía a lo largo del ciclo celular, y que en el interior del cromosoma la máxima concentración se establece durante la mitosis. Estos resultados, junto a los estudios de condensación/descondensación del cromosoma metafásico en solución en función de diferentes cationes (Poirier et al., 2002) y los resultados de condensación de la cromatina observados por otros laboratorios (Zlatanova et al., 1994; Bartolomé et al., 1995; Hansen, 2002; Mangenot et al., 2003) indican que la cromatina *per se* puede ser la responsable de la compactación y la formación del cromosoma durante la mitosis. Se ha propuesto que las condensinas son las proteínas responsables de dirigir la condensación del cromosoma durante la mitosis. Experimentos recientes de *knockout* y *knockdown* han demostrado que las condensinas no son necesarias para la

condensación a gran escala, pero pueden intervenir en su estabilidad (Savvidou et al., 2005; Belmont, 2006). Relacionado con esta temática, también recientemente se ha demostrado con estudios de *stretching* que en el interior del cromosoma no existe la presencia de un eje proteico continuo o *scaffold* (Poirier y Marko, 2002b; Pope et al., 2006) en el cual están basados los modelos de lazos, que hasta el momento son los más ampliamente aceptados en la bibliografía.

Teniendo en cuenta todas las consideraciones anteriores, el aspecto denso que tienen las cromátides en presencia de iones divalentes y poliaminas, y la elevada concentración de histonas (Uchiyama et al., 2005) y DNA (Daban, 2000) presentes en el cromosoma metafásico, puede sugerirse que las placas de cromatina ocupan la mayor parte del volumen del cromosoma y que por lo tanto son las responsables de las propiedades físico-químicas del cromosoma metafásico. Recientemente, se han publicado unos experimentos a partir de criocortes de células mitóticas en los que observan un patrón irregular de la cromatina, concluyendo que en el interior del cromosoma metafásico no hay fibras de 30 nm (Eltsov et al., 2008). Por el contrario, estos autores sugieren que la cromatina existe como un polímero fundido en el interior del cromosoma, donde la cromatina se interdigita entre puntos distantes a lo largo del filamento. Un modelo basado en placas no es inconsistente con los resultados de crio-EM obtenidos por Eltsov et al. (2008). En el interior de las placas, los nucleosomas no tienen una disposición fija y orientada perfectamente como en un cristal (como se comentó antes, ver capítulo 22); por el contrario, tienen grados de libertad y en consecuencia podrían dar lugar a una morfología irregular al ser observados mediante criocortes. Por otra parte, como se demostró al realizar imágenes de AFM, las placas son un elemento muy dinámico y flexible estructuralmente hablando, y son capaces de reordenar los nucleosomas de una capa superior cuando se perturba con la punta de AFM. Esto resalta la capacidad que tienen las placas de establecer contactos entre nucleosomas cercanos y lejanos a lo largo del filamento de DNA. Este dato es importante a la hora de considerar un modelo de cromosoma metafásico basado en placas, en el que se establecen contactos entre nucleosomas de capas adyacentes facilitando al interdigitación de éstas. Si consideramos la formación de la cromátide a partir de las placas, inevitablemente, aun habiendo una interdigitación entre las diferentes capas, esto provoca una reducción de la densidad y por lo tanto un menor grado de empaquetamiento del DNA (Daban, 2000). Este fenómeno permite una mayor accesibilidad de moléculas pequeñas como el agua, provocando que el comportamiento del cromosoma sea más elástico y en consecuencia más compleja su visualización mediante AFM. Por otra parte, permite también un mayor dinamismo y funcionalidad interna necesarias para justificar los datos de difusión de la H1 (Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000), la topoisomerasa II $\alpha$  (Christensen et al., 2002; Tavormina et al., 2002) y la condensina I (Gerlich et al., 2006) en el interior del cromosoma metafásico. En definitiva un modelo basado en placas permite explicar fácilmente el bandeado citogenético, las propiedades mecano-elásticas y la elevada concentración de DNA en el interior del cromosoma metafásico humano.

Parte V

# CONCLUSIONES



# Capítulo 25

## Conclusiones

A partir del estudio sistemático de placas procedentes del cromosoma metafásico compacto realizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, mediante AFM en medio acuoso y en tiempo real, y mediante el análisis de espectroscopia de Fuerza Atómica (AFS) y de Microscopía de Fuerza Lateral, se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La observación en el microscopio TEM de un elevado número de placas en extrusiones y en el interior de cromosomas metafásicos compactos demuestra que las placas tienen una tendencia a formar estructuras multilaminares y sugiere que son el elemento estructural básico de las cromátides. Estos resultados corroboran los estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Caravaca, 2004).
2. El uso de glicerol en lugar de sacarosa en la etapa de purificación, junto con la realización de diálisis exhaustivas después de la purificación, han permitido demostrar que las placas no son un artefacto químico debido a la cristalización de la sacarosa a elevada concentración utilizada en la purificación de los cromosomas. Además, la realización de lavados exhaustivos en las preparaciones de microscopía electrónica y la visualización de placas en medio acuoso mediante AFM en concentraciones salinas muy alejadas de las condiciones de precipitación, demuestran que las placas no son un artefacto provocado por la cristalización de las sales utilizadas.
3. El tratamiento mecánico con jeringuilla incrementa el rendimiento de obtención de placas a partir de la preparación de cromosomas, permitiendo el estudio exhaustivo de estas. Además este resultado indica que las placas son el componente mayoritario del cromosoma metafásico.
4. La existencia de las placas no depende del tipo de superficie utilizada como sustrato. En esta tesis se han utilizado como sustrato films de carbono activado

y sin activar con Alcian blue en los experimentos de TEM, y mica en los experimentos de AFM. Además los estudios de fijación del material extruido de cromosomas antes de la extensión indican que las placas son un elemento existente en solución y no están condicionadas por la superficie empleada para su visualización.

5. El conjunto de los datos obtenidos mediante platinación unidireccional indica que la altura media de la placa de cromatina es de  $\sim 6.5$  nm, dato que corrobora los estudios realizados con anterioridad en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido determinar que las placas sobre carbono tienen una altura de 7.4 nm, que es superior a los 5.3 nm de una placa dispuesta sobre otra. Esta diferencia de alturas es probablemente debida a que las placas se interdigitan proporcionando una mayor compactación.
6. La visualización de placas mediante AFM con AM-AFM *mode* y *contact mode* en medio acuoso y en condiciones fisiológicas sin fijar ni teñir la muestra ha permitido demostrar que las placas son estables en solución. Esta técnica nos ha permitido demostrar que las placas existen en presencia de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  encontradas en el interior del cromosoma metafásico. Además, estos resultados son coherentes con las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica.
7. El estudio de altura a partir de perfiles topográficos y de curvas  $F_v$  vs.  $\delta$  ha permitido determinar que la altura, en medio acuoso y en condiciones fisiológicas, de las placas es de  $\sim 6.5$  nm, lo cual corrobora los resultados obtenidos mediante TEM. Teniendo en cuenta que la altura de la placa es menor que el diámetro de un nucleosoma ( $\sim 11$  nm) y que no hay evidencias mediante AFM o TEM de que los nucleosomas se dispongan formando pilas mediante asociaciones por las caras laterales, estos datos sugieren que los nucleosomas están parcialmente inclinados en el interior de las placas y se produce la interdigitación entre las sucesivas capas.
8. Los estudios de TEM indican que la curación de cromatina procedente de cromosomas metafásicos en presencia de  $Mg^{2+}$  favorece la formación de placas. Esto indica que la cromatina es una estructura dinámica con propiedades autoasociativas. Por otra parte, la dificultad en la visualización de placas multicapa mediante AFM indica que las placas son estructuras dinámicas con capacidad de reorganizarse formando contactos entre nucleosomas distantes a lo largo del filamento de cromatina.
9. El estudio mediante AFS nos ha permitido conocer que la placa es una estructura mecánicamente resistente, que presenta una rotura plástica principal a 4.4 nN (0.024 GPa) y a 6.2 nN (0.037 GPa) en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM y 20 mM, respectivamente. Esta técnica también nos ha permitido calcular el



---

módulo de Young (0.16 y 0.23 GPa, en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM y 20 mM, respectivamente), lo cual demuestra que las placas tienen un comportamiento elástico en el rango de las biomoléculas.

10. La monitorización mediante AFM en tiempo real de la digestión de placas con MNasa, con proteasas y la desnaturalización en presencia de altas concentraciones de NaCl y EDTA constatan que la placa está compuesta fundamentalmente por DNA y, teniendo en cuenta los datos sobre el proteoma cromosómico, por histonas. Adicionalmente, la digestión con RNasa en experimentos visualizados mediante TEM sugieren que el RNA no tiene ningún papel estructural en la formación de las placas.
11. El análisis nanotribológico de placas de cromatina digeridas con MNasa y pronasa, y desnaturalizadas con concentraciones elevadas de NaCl y EDTA han permitido corroborar cuantitativamente que las placas están compuestas por cromatina. También ha permitido demostrar que el DNA es el componente más importante en el mantenimiento de las propiedades mecánicas de la placa y en consecuencia del cromosoma metafásico.
12. Los resultados de desnaturalización con NaCl obtenidos mediante TEM, el comportamiento diferencial entre las regiones internas y de la periferia de las placas en los raspados realizados con la punta de AFM, y el hecho de que el máximo coeficiente de fricción se establezca a diluciones de MNasa intermedias, concuerda con un modelo de placa basado en una red bidimensional del filamento de cromatina.
13. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, y en otros trabajos de nuestro laboratorio, se ha podido proponer un modelo estructural del cromosoma metafásico en el que las placas de cromatina se interdigitan y apilan ortogonalmente en relación al eje de la cromátide. Este modelo permite explicar fácilmente el bandeo citogenético y la elevada concentración de DNA observada experimentalmente en el cromosoma metafásico. Los resultados de esta tesis sugieren que en los cromosomas nativos, las propiedades de flexibilidad y dinámica estructural interna de las placas pueden constituir un mecanismo efectivo para proteger la integridad del DNA genómico de las fuerzas establecidas por el huso mitótico durante el proceso de segregación cromosómica.



Parte VI

# BIBLIOGRAFÍA



# Bibliografía

- Adolph, K. W. (1980). Isolation and structural organization of human mitotic chromosomes. *Chromosoma*, 76(1):23–33.
- Alberts, B., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 5th edition.
- Alexander, S., Hellemans, L., Marti, O., Schneir, J., Elings, V., Hansma, P. K., Longmire, M., y Gurlley, J. (1989). An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J Appl Phys*, 65(1):164–7.
- Almagro, S., Riveline, D., Hirano, T., Houchmandzadeh, B., y Dimitrov, S. (2004). The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope. *J Biol Chem*, 279(7):5118.
- Anderson, V. J. y Lekkerkerker, H. N. W. (2002). Insights into phase transition kinetics from colloid science. *Nature*, 416(6883):811–5.
- Aragay, A. M., Diaz, P., y Daban, J. R. (1988). Association of nucleosome core particle DNA with different histone oligomers. Transfer of histones between DNA-(H2A,H2B) and DNA-(H3,H4) complexes. *J Mol Biol*, 204(1):141–54.
- Aragay, A. M., Fernandez-Busquets, X., y Daban, J. R. (1991). Different mechanism for in vitro formation of nucleosome core particles. *Biochemistry*, 30(20):5022–5032.
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., y Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(22):10148–52.
- Arents, G. y Moudrianakis, E. N. (1993). Topography of the histone octamer surface: Repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(22):10489–93.
- Arents, G. y Moudrianakis, E. N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(24):11170–4.
- Ausió, J., Abbott, D. W., Wang, X., y Moore, S. C. (2001). Histone variants and histone modifications: A structural perspective. *Biochem Cell Biol*, 79(6):693–708.
- Ausio, J., Borochoy, N., Seger, D., y Eisenberg, H. (1984). Interaction of chromatin with NaCl and MgCl<sub>2</sub>: Solubility and binding studies, transition to and characterization of the higher-order structure. *J Mol Biol*, 177(3):373–98.
- Bancaud, A., Conde e Silva, N., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J. F., Mozziconacci, J., Lavelle, C., Croquette, V., Victor, J. M., Prunell, A., y Viovy, J. L. (2006). Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation. *Nat Struct Mol Biol*, 13(5):444–50.
- Barrena, E., Kopta, S., Ogletree, D. F., Charych, D. H., y Salmeron, M. (1999). Relationship between friction and molecular structure: Alkylsilane lubricant films under pressure. *Phys Rev Lett*, 82(14):2880–3.
- Barrena, E., Ocal, C., y Salmeron, M. (2000). Molecular packing changes of alkanethiols monolayers on Au(111) under applied pressure. *J Chem Phys*, 113(6):2413–8.
- Bartolomé, S., Bermúdez, A., y Daban, J. R. (1994). Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. *J Cell Sci*, 107 (11):2983–92.
- Bartolomé, S., Bermúdez, A., y Daban, J. R. (1995). Electrophoresis of chromatin on nondenaturing agarose gels containing Mg<sup>2+</sup>. Self-assembly of small chromatin fragments and folding of the 30-nm fiber. *J Biol Chem*, 270(38):22514–21.
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J., y Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA,

- and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(24):14173–8.
- Belmont, A. S. (2002). Mitotic chromosome scaffold structure: New approaches to an old controversy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(25):15855–15857.
- Belmont, A. S. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol*, 18(6):632–8.
- Belmont, A. S. y Bruce, K. (1994). Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J Cell Biol*, 127(2):287–302.
- Belmont, A. S., Sedat, J. W., y Agard, D. A. (1987). A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: Evidence for a complex hierarchical organization. *J Cell Biol*, 105(1):77–92.
- Bennewitz, R. (2005). Feriction force microscopy. *Mat Today*, 8(5):42–48.
- Bennink, M. L., Leuba, S. H., Leno, G. H., Zlatanova, J., de Grooth, B. G., y Greve, J. (2001). Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Mol Biol*, 8(7):606–10.
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., y Wang, J. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, 379(6562):225–32.
- Bermudez, A. (1994). *Análisis microscópico de la fibra de cromatina plegada. Modelo del solenoide interdigitado compacto*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Bermúdez, A., Bartolomé, S., y Daban, J.-R. (1998). Partial denaturation of small chromatin fragments: Direct evidence for the radial distribution of nucleosomes in folded chromatin fibers. *J Cell Sci*, 111 (12):1707–15.
- Bertin, A., Leforestier, A., Durand, D., y Livolant, F. (2004). Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles. *Biochemistry*, 43(16):4773–80.
- Bhushan, B., Israelachvili, J. N., y Landman, U. (1995). Nanotribology: Friction, wear and lubrication at the atomic scale. *Nature*, 374(6523):607–16.
- Binnig, G., Quate, C. F., y Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett*, 56(9):930–3.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., y Weibel, E. (1982). Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl Phys Lett*, 40(2):178–180.
- Bonaldi, T., Längst, G., Strohner, R., Becker, P. B., y Bianchi, M. E. (2002). The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J*, 21(24):6865–73.
- Bordas, J., Perez-Grau, L., Koch, M. H., Vega, M. C., y Nave, C. (1986). The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. II. Theoretical analysis of the X-ray scattering patterns and model calculations. *Eur Biophys J*, 13(3):175–85.
- Bouck, D. C., Joglekar, A. P., y Bloom, K. S. (2008). Design features of a mitotic spindle: Balancing tension and compression at a single microtubule kinetochore interface in budding yeast. *Annu Rev Genet*, 42:335–59.
- Bowden, F. P. y Tabor, D. (1954). *The friction and lubrication of solids, Part I*. Clarendon Press, Oxford.
- Bozzola, J. J. y Russell, L. D. (1992). *Electron microscopy: Principles and techniques for biologists*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Bradbury, E. M. y Baldwin, J. P. (1986). Neutron scatter and diffraction techniques applied to nucleosome and chromatin structure. *Cell Biophys*, 9(1-2):35–66.
- Budavari, S., O’Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., y Kinneray, J. F. (1996). *THE MERCK INDEX an enciclopedia of chemicals, drugs and biologicals Index an enciclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Merck & CO., Inc., Whitehouse Station, NJ, 12th edition.
- Burton, D. R., Butler, M. J., Hyde, J. E., Phillips, D., Skidmore, C. J., y Walker, I. O. (1978). The interaction of core histones with DNA: equilibrium binding studies. *Nucleic Acids Res*, 5(10):3643–63.
- Bustamante, C., Smith, S. B., Liphardt, J., y Smith, D. (2000). Single-molecule studies of DNA mechanics. *Curr Opin Struct Biol*, 10(3):279–85.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 26(3):152–3.
- Butt, H.-J. (1991). Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophys J*, 60(6):1438–44.

- Cain, R. G., Biggs, S., y Page, N. W. (2000). Force Calibration in Lateral Force Microscopy. *J Colloid Interface Sci*, 227(1):55–65.
- Callister, W. y Rethwisch, G. (2008). *Fundamentals of materials science and engineering*. Wiley, New York.
- Cannara, R. J., Brukman, M. J., Cimatú, K., Sumant, A. V., Baldelli, S., y Carpick, R. W. (2007). Nanoscale friction varied by isotopic shifting of surface vibrational frequencies. *Science*, 318(5851):780–3.
- Caño, S. (2003). Estudio de las condiciones de formación y de la estructura de los agregados de cromatina. Trabajo experimental de tercer ciclo, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Caño, S. (2007). *Estructura de la cromatina condensada*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Caño, S., Caravaca, J. M., Martín, M., y Daban, J.-R. (2006). Highly compact folding of chromatin induced by cellular cation concentrations. Evidence from atomic force microscopy studies in aqueous solution. *Eur Biophys J*, 35(6):495–501.
- Caravaca, J. M. (2004). *Elementos estructurales de la cromatina en los cromosomas mitóticos*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Carpenter, A. J. y Porter, A. C. G. (2004). Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II $\alpha$  mutant human cell line. *Mol Biol Cell*, 15(12):5700–11.
- Carpick, R. W. (2006). Physics. Controlling friction. *Science*, 313(5784):184–5.
- Carpick, R. W. y Salmeron, M. (1997). Scratching the surface: fundamental investigations of tribology with atomic force microscopy. *Chem Rev*, 97(4):1163–1194.
- Carruthers, L. M., Bednar, J., Woodcock, C. L., y Hansen, J. C. (1998). Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: Mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, 37(42):14776–87.
- Castleman, K. R. (2000). *Image processing and analysis. A practical approach*, capítulo: Image analysis: Quantitative interpretation of chromosome images, páginas 69–109. Balbock R, Graham J, eds. The practical approach series. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Castro-Hartmann, P. (2009). *Estructura de la cromatina en los cromosomas metafásicos: Estudio de microscopía electrónica de transmisión, criomicroscopía y tomografía electrónica*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Castro-Hartmann, P., Milla, M., y Daban, J.-R. (2010). Irregular orientation of nucleosomes in the well-defined chromatin plates of metaphase chromosomes. *Biochemistry*, 49(19):4043–50.
- Caterino, T. y Hayes, J. (2007). Chromatin structure depends on what's in the nucleosome's pocket. *Nat Struct Biol*, 14(11):1056–8.
- Chang, C.-J., Goulding, S., Earnshaw, W. C., y Carmona, M. (2003). RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *J Cell Sci*, 116(23):4715–26.
- Chen, A. y Moy, V. T. (2002). *Atomic Force Microscopy in cell biology*, capítulo: Single-Molecule Force Measurements, páginas 301–309. Bhanu P. Jena and J. K. Heinrich Hörber, eds. Academic Press, San Diego.
- Cherstvy, A. G. y Everaers, R. (2006). Layering, bundling, and azimuthal orientations in dense phases of nucleosome core particles. *J Phys-Condens Mat*, 18(50):11429–42.
- Chodaparambil, J. V., Barbera, A. J., Lu, X., Kaye, K. M., Hansen, J. C., y Luger, K. (2007). A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat Struct Mol Biol*, 14(11):1105–7.
- Christensen, M. O., Larsen, M. K., Barthelmes, H. U., Hock, R., Andersen, C. L., Kjeldsen, E., Knudsen, B. R., Westergaard, O., Boege, F., y Mielke, C. (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases II $\alpha$  and II $\beta$  in living cells The online version of this article contains supplemental material. *J Cell Biol*, 157(1):31–44.
- Cidade, G. A. G., Weissmuller, G., y Bisch, P. M. (1998). A microcontroller-based system for piezoscanner nonlinearity correction: Atomic force microscope. *Rev Sci Instrum*, 69(10):3593–7.
- Clark, D. J. y Kimura, T. (1990). Electrostatic Mechanism of Chromatin Folding. *J Mol Biol*, 211(4):883–96.
- Coggins, L. W. (1987). *Electron microscopy in molecular biology. A practical approach*, capítulo: Preparation of nucleic acids for electron microscopy, páginas 1–28. J. Somerville and U. Scheers, eds. The practical approach series. IRL Press.

- Cook, P. R. (1995). A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J Cell Sci*, 108(9):2927–35.
- Craig, J. (1999). *Chromosome structural analysis*, capítulo: Isolation of vertebrate metaphase chromosomes and their analysis by FISH (protocol 3), páginas 59–80. W. A. Bickmore, editor. The practical approach series. Oxford University press, Oxford, New York.
- Cremer, T. y Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2(4):292–301.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., y Anfinsen, C. B. (1967). Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of staphylococcus aureus. *J Biol Chem*, 242(7):1541–7.
- Cui, H., Kalinin, S. V., Yang, X., y Lowndes, D. H. (2004). Growth of carbon nanofibers on tipless cantilevers for high resolution topography and magnetic force imaging. *Nano Letters*, 4(11):2157–61.
- Czarnota, G. J. y Ottensmeyer, F. P. (1996). Structural states of the nucleosome. *J Biol Chem*, 271(7):3677–83.
- Daban, J.-R. (2000). Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochemistry*, 39(14):3861–6.
- Daban, J.-R. (2003). High concentration of DNA in condensed chromatin. *Biochem Cell Biol*, 81(3):91–99.
- Daban, J.-R. y Bermúdez, A. (1998). Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry*, 37(13):4299–304.
- Daban, J.-R. y Cantor, C. R. (1982a). Role of histone pairs H2A, H2B and H3, H4 in the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 156(4):771–789.
- Daban, J.-R. y Cantor, C. R. (1982b). Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 156(4):749–69.
- de la Tour, E. B. y Laemmli, U. K. (1988). The metaphase scaffold is helically folded: Sister chromatids have predominantly opposite helical handedness. *Cell*, 55(6):937–44.
- DeLange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L., y Bonner, J. (1969). Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of epsilon-N-acetyllysine. *J Biol Chem*, 244(2):319–34.
- Depken, M. y Schiessel, H. (2009). Nucleosome shape dictates chromatin fiber structure. *Biophys J*, 96(3):777–84.
- Dobson, P. S., Weaver, J. M., Holder, M. N., Unwin, P. R., y Macpherson, J. V. (2005). Characterization of batch-microfabricated scanning electrochemical-atomic force microscopy probes. *Anal Chem*, 77(2):424–34.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., y Richmond, T. J. (2003). Chromatin fiber folding: Requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol*, 327(1):85–96.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., y Richmond, T. J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, 306(5701):1571–3.
- Dowson, D. (1979). *History of tribology*. Longman, London.
- Drake, B., Prater, C. B., Weisenhorn, A. L., Gould, S. A., Albrecht, T. R., Quate, C. F., Cannell, D. S., Hansma, H. G., y Hansma, P. K. (1989). Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*, 243(4898):1586–9.
- Drobek, T., Stark, R. W., y Heckl, W. M. (2001). Determination of shear stiffness based on thermal noise analysis in atomic force microscopy: Assive overtone microscopy. *Phys. Rev. B*, 64(4):045401.
- Dubochet, J. y Noll, M. (1978). Nucleosome arcs and helices. *Science*, 202(4365):280–6.
- Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M., y Liu, L. F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol*, 100(5):1706–15.
- Ebner, A., Madl, J., Kienberger, F., Chtcheglova, L. A., Puntheeranurak, T., Zhu, R., Tang, J., Gruber, H. J., Schutz, G. J., y Hinterdorfer, P. (2007). Single molecule force microscopy on cells and biological membranes. *Current Nanoscience*, 3(1):49–56.
- el Alfy, M. y Leblond, C. P. (1989). An electron microscopic study of mitosis in mouse duodenal crypt cells confirms that the prophasic condensation of chromatin begins during the DNA-synthesizing (S) stage of the cycle. *Am J Anat*, 186(1):69–84.



- Eltsov, M., Maclellan, K. M., Maeshima, K., Frangakis, A. S., y Dubochet, J. (2008). Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(50):19732–7.
- Engelhardt, M. (2007). Choreography for nucleosomes: the conformational freedom of the nucleosomal filament and its limitations. *Nucleic Acids Res*, 35(16):e106.
- Filipski, J., Leblanc, J., Youdale, T., Sikorska, M., y Walker, P. R. (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J*, 9(4):1319–27.
- Finch, J. y Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(6):1897–901.
- Florin, E., Rief, M., Lehmann, H., Ludwig, M., Dornmair, C., Moy, V., y Gaub, H. (1995). Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosens Bioelectron*, 10(9-10):895–901.
- Foster, T. T., Alexander, M. R., Leggett, G. J., y McAlpine, E. (2006). Friction force microscopy of alkylphosphonic acid and carboxylic acids adsorbed on the native oxide of aluminum. *Langmuir*, 22(22):9254–59.
- Fraxedas, J., Garcia-Manyes, S., Gorostiza, P., y Sanz, F. (2002). Nanoindentation: Toward the sensing of atomic interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(8):5228–32.
- Fritzsche, W. y Henderson, E. (1997). Mapping elasticity of rehydrated metaphase chromosomes by scanning force microscopy. *Ultramicroscopy*, 69(3):191–200.
- Furuyama, T. y Henikoff, S. (2009). Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell*, 138(1):104–13.
- García, R. y Pérez, R. (2002). Dynamic atomic force microscopy methods. *Surf Sci Rep*, 47(6-8):197–301.
- Garcia-Manyes, S., Bucior, I., Ros, R., Anselmetti, D., Sanz, F., Burger, M. M., y Fernández-Busquets, X. (2006). Proteoglycan mechanics studied by single-molecule force spectroscopy of allotypic cell adhesion glycans. *J Biol Chem*, 281(9):5992–9.
- Garcia-Manyes, S., Oncins, G., y Sanz, F. (2005a). Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys J*, 89(3):1812–26.
- Garcia-Manyes, S., Oncins, G., y Sanz, F. (2005b). Effect of temperature on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. *Biophys J*, 89(6):4261–74.
- Garcia-Ramirez, M., Dong, F., y Ausio, J. (1992). Role of the histone “tails” in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J Biol Chem*, 267(27):19587–95.
- Gasser, S. M. y Laemmli, U. K. (1987). Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes. *Exp Cell Res*, 173(1):85–98.
- Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., y Laemmli, U. K. (1986). Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol*, 188(4):613–29.
- Gassmann, R., Henzing, A. J., y Earnshaw, W. C. (2005). Novel components of human mitotic chromosomes identified by proteomic analysis of the chromosome scaffold fraction. *Chromosoma*, 113(7):385–97.
- Gassmann, R., Vagnarelli, P., Hudson, D., y Earnshaw, W. C. (2004). Mitotic chromosome formation and the condensin paradox. *Exp Cell Res*, 296(1):35–42.
- Gautier, T., Masson, C., Quintana, C., Arnoult, J., y Hernandez-Verdun, D. (1992). The ultrastructure of the chromosome periphery in human cell lines. An in situ study using cryomethods in electron microscopy. *Chromosoma*, 101(8):502–510.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J.-M., y Ellenberg, J. (2006). Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Curr Biol*, 16(4):333–44.
- Giménez-Abián, J. F. y Clarke, D. J. (2003). Replication-coupled topoisomerase II templates the mitotic chromosome scaffold? *Cell Cycle*, 2(3):230–2.
- Giménez-Abián, J. F., Clarke, D. J., Mullinger, A. M., Downes, C. S., y Johnson, R. T. (1995). A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *J Cell Biol*, 131(1):7–17.

- Goldenberg, M., Welsh, J., Haas, R., Rideout, D. C., y Cantor, C. R. (1988). Synthesis and properties of novel psoralen derivatives. *Biochemistry*, 27(18):6971–6.
- Grant, L. M. y Tibergh, F. (2002). Normal and lateral forces between lipid covered solids in solution: correlation with layer packing and structure. *Biophys J*, 82(3):1373–85.
- Graziano, V., Gerchman, S. E., Schneider, D. K., y Ramakrishnan, V. (1994). Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature*, 368(6469):351–4.
- Green, C. P., Lioe, H., Cleveland, J. P., Proksch, R., Mulvaney, P., y Sader, J. E. (2004). Normal and torsional spring constants of atomic force microscope cantilevers. *Rev Sci Instrum*, 75(6):1988–96.
- Grigoryev, S. A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C. L., y Schlick, T. (2009). Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(32):13317–22.
- Hancock, R. (2008). Self-association of polynucleosome chains by macromolecular crowding. *Eur Biophys J*, 37(6):1059–64.
- Hansen, J. C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: Determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31:361–92.
- Hansen, J. C., Tse, C., y Wolffe, A. P. (1998). Structure and function of the core histone N-termini: More than meets the eye. *Biochemistry*, 37(51):17637–41.
- Harp, J. M., Hanson, B. L., Timm, D. E., y Bunick, G. J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Cryst D*, 56(12):1513–34.
- Heinz, W. F. y Hoh, J. H. (1999). Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends Biotechnol*, 17(4):143–50.
- Henderson, E., Haydon, P. G., y Sakaguchi, D. S. (1992). Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, 257(5078):1944–6.
- Hernandez-Verdun, D. y Gautier, T. (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays*, 16(3):179–85.
- Hewish, D. R. y Burgoyne, L. A. (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, 12(2):504–10.
- Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schilcher, K., y Schindler, H. (1996). Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(8):3477–81.
- Hirano, T. (1998). SMC protein complexes and higher-order chromosome dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 10(3):317–22.
- Hirano, T. (2000). Chromosome cohesion, condensation and separation. *Annu Rev Biochem*, 69:115–44.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5):311–22.
- Hirano, T. y Mitchison, T. J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, 120(3):601–12.
- Hliscs, R., Mühlig, P., y Claussen, U. (1997). The nature of G-bands analyzed by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet*, 79(1-2):162–6.
- Hörber, J. K. H. (2002). *Atomic force microscopy in cell biology*, capítulo: Local Probe Technics, páginas 1–31. Bhanu P. Jena and J. K. Heinrich Hörber, eds. Academic Press, San Diego.
- Horowitz, R. A., Agard, D. A., Sedat, J. W., y Woodcock, C. L. (1994). The three-dimensional architecture of chromatin in situ: Electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol*, 125(1):1–10.
- Hoshi, O., Shigeno, M., y Ushiki, T. (2006). Atomic force microscopy of native human metaphase chromosomes in a liquid. *Arch Histol Cytol*, 69(1):73–8.
- Houchmandzadeh, B. y Dimitrov, S. (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J Cell Biol*, 145(2):215–23.
- Houchmandzadeh, B., Marko, J. F., Chatenay, D., y Libchaber, A. (1997). Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol*, 139(1):1–12.

- Huynh, V. A. T., Robinson, P. J. J., y Rhodes, D. (2005). A method for the in vitro reconstitution of a defined "30 nm" chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. *J Mol Biol*, 345(5):957–68.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921.
- ISCN (2005). *An international system for human cytogenetic nomenclature*. L. G. Shaffer and N. Tommerup, eds. S. KARGER, Basel.
- Ishiguro, K.-I. y Watanabe, Y. (2007). Chromosome cohesion in mitosis and meiosis. *J Cell Sci*, 120(3):367–9.
- Israelachvili, J., McGuiggan, P., Gee, M., Homola, A., Robbins, M., y Thompson, P. (1990). Liquid dynamics in molecularly thin-films. *J Phys-Condens Mat*, 2(Suppl. A):SA89–SA98.
- Jena, B. P. y Cho, S.-J. (2002). *Atomic force microscopy in cell biology*, capítulo: Atomic Force Microscopoe Imaging of Cells and Membranes, páginas 33–50. Bhanu P. Jena and J. K. Heinrich Hörber, eds. Academic Press, San Diego.
- Jiao, Y. y Schäffer, T. E. (2004). Accurate height and volume measurements on soft samples with the atomic force microscope. *Langmuir*, 20(23):10038–45.
- Kawamura, R., Pope, L. H., Christensen, M. O., Sun, M., Terekhova, K., Boege, F., Mielke, C., Andersen, A. H., y Marko, J. F. (2010). Mitotic chromosomes are constrained by topoisomerase II-sensitive DNA entanglements. *J Cell Biol*, 188(5):653–63.
- Kepper, N., Foethke, D., Stehr, R., Wedemann, G., y Rippe, K. (2008). Nucleosome geometry and internucleosomal interactions control the chromatin fiber conformation. *Biophys J*, 95(8):3692–705.
- Kindt, J. H., Sitko, J. C., Pietrasanta, L. I., Emin Orudjev, N. B., Viani, M. B., y Hansma, H. G. (2002). *Atomic force microscopy in cell biology*, capítulo: Single-Molecule Force Measurements, páginas 213–229. Bhanu P. Jena and J. K. Heinrich Hörber, eds. Academic Press, San Diego.
- Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T., y Belmont, A. S. (2004). Visualization of early chromosome condensation: A hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol*, 166(6):775–85.
- Koch, M. H. J. (1989). *Protein-Nucleic acid interaction*, capítulo: Structure and condensation of chromatin. W. Sanger and U. Heinemann eds. Macmillan Press Scienific & Medical, London.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184(139):868–71.
- Kornberg, R. D. y Thomas, J. O. (1974). Chromatin structure: Oligomers of the histones. *Science*, 184(139):865–8.
- Krim, J. (2002). Surface science and the atomic-scale origins of friction: What once was old is new again. *Surf Sci*, 500(1-3):741–58.
- Kruithof, M., Chien, F.-T., Routh, A., Logie, C., Rhodes, D., y van Noort, J. (2009). Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol*, 16(5):534–40.
- Kuhle, A., Sorensen, A. H., y Bohr, J. (1997). Role of attractive forces in tapping tip force microscopy. *J Appl Phys*, 81(10):6562–6569.
- Lavelle, C. y Prunell, A. (2007). Chromatin polymorphism and the nucleosome superfamily: A genealogy. *Cell Cycle*, 6(17):2113–9.
- Lee, J., Shin, H., Kim, S., Hong, S., Chung, J., Park, H., y Moon, J. (2003). Fabrication of atomic force microscope probe with low spring constant using SU-8 photoresist. *Jpn J Appl Phys* 2, 42(10A):L1171–L1174.
- Lee, S.-W. y Sigmund, W. M. (2002). AFM study of repulsive van der Waals forces between Teflon AF(TM) thin film and silica or alumina. *Colloid Surf A*, 204(1-3):43–50.
- Leforestier, A., Dubochet, J., y Livolant, F. (2001). Bilayers of nucleosome core particles. *Biophys J*, 81(4):2414–21.
- Leforestier, A., Fudaley, S., y Livolant, F. (1999). Spermidine-induced aggregation of nucleosome core particles: Evidence for multiple liquid crystalline phases. *J Mol Biol*, 290(2):481–94.
- Leuba, S. H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K., Zlatanova, J., y Bustamante, C. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(24):11621–5.
- Lever, M. A., Th'ng, J. P., Sun, X., y Hendzel, M. J. (2000). Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*, 408(6814):873–6.

- Li, G., Levitus, M., Bustamante, C., y Widom, J. (2005). Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1):46–53.
- Li, G. y Widom, J. (2004). Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol*, 11(8):763–9.
- Liu, E., Blanpain, B., y Celis, J. P. (1996). Calibration procedures for frictional measurements with a lateral force microscope. *Wear*, 192(1-2):141–50.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., y Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–60.
- Luheshi, L. M. y Dobson, C. M. (2009). Bridging the gap: from protein misfolding to protein misfolding diseases. *FEBS letters*, 583(16):2581–6.
- Maali, A., Hurth, C., Boisgard, R., Jai, C., Cohen-Bouhacina, T., y Aime, J.-P. (2005). Hydrodynamics of oscillating atomic force microscopy cantilevers in viscous fluids. *J Appl Phys*, 97(7):074907.
- Maeshima, K. y Laemmli, U. K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell*, 4(4):467–80.
- Magonov, S. N. y Yerina, N. A. (2005). *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*, capítulo: Visualization of Nanostructures with Atomic Force Microscopy, páginas 113–154. N Yao y Z L Wang, editores. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Mangenot, S., Leforestier, A., Durand, D., y Livolant, F. (2003). Phase diagram of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 333(5):907–16.
- Manning, G. S. (1978). The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q Review Biophys*, 11(2):179–246.
- Marko, J. F. (2008). Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *Chromosome Res*, 16(3):469–97.
- Marsden, M. P. F. y Laemmli, U. K. (1979). Metaphase chromosome structure: Evidence for a radial loop model. *Cell*, 17(4):849–58.
- Martín, M. (1999). Desestructuració dels fragments de cromatina mitjançant proteòlisi limitada. Trabajo experimental de tercer ciclo, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Mate, C. M., McClelland, G. M., Erlandsson, R., y Chiang, S. (1987). Atomic-scale friction of a tungsten tip on a graphite surface. *Phys Rev Lett*, 59(17):1942–1945.
- McDowall, A. W., Smith, J. M., y Dubochet, J. (1986). Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *EMBO J*, 5(6):1395–402.
- McGhee, J. D., Nickol, J. M., Felsenfeld, G., y Rau, D. C. (1983). Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell*, 33(3):831–41.
- Miesbauer, O., Götzinger, M., y Peukert, W. (2003). Molecular dynamics simulations of the contact between two NaCl nano-crystals: adhesion, jump to contact and indentation. *Nanotechnology*, 14(3):371.
- Miller, O. L. y Beatty, B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science*, 164(882):955–7.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., y Brown, D. T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 408(6814):877–81.
- Mo, Y., Turner, K. T., y Szlufarska, I. (2009). Friction laws at the nanoscale. *Nature*, 457(7233):1116–9.
- Mora, L. (2007). *Organización de los cromosomas en el núcleo interfásico de Primates*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Mora, L., Sánchez, I., Garcia, M., y Ponsà, M. (2006). Chromosome territory positioning of conserved homologous chromosomes in different primate species. *Chromosoma*, 115(5):367–75.
- Mozziconacci, J. y Lavelle, C. (2009). *Computational Biology: New Research*, capítulo: Chromatin Fiber: 30 years of Models, páginas 147–163. Russe, A. S. ed. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- Mozziconacci, J. y Victor, J. M. (2003). Nucleosome gaping supports a functional structure for the 30 nm chromatin fiber. *J Struct Biol*, 143(1):72–6.
- Murphy, M. F., Lalor, M. J., Manning, F. C., Lilley, F., Crosby, S. R., Randall, C., y Burton, D. R. (2006). Comparative study of the conditions required to image live human epithelial and fibroblast cells using atomic force microscopy. *Microsc Res Tech*, 69(9):757–765.
- Narayanswamy, S. y Hamkalo, B. A. (1987). *Electron microscopy in molecular biology. A practical approach*, capítulo: Hibridization to chromatin and whole chromosome mounts, páginas 215–232. J. Somerville and U. Scheers, eds. The practical approach series. IRL Press, Oxford, Washington DC.

- Nasmyth, K. y Haering, C. H. (2009). Cohesin: Its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*, 43:525–58.
- Nicklas, R. B. (1983). Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J Cell Biol*, 97(2):542–8.
- Oberinger, M., Englisch, A., Heinz, B., Gao, H., Martin, T., y Hartmann, U. (2003). Atomic force microscopy and scanning near-field optical microscopy studies on the characterization of human metaphase chromosomes. *Eur Biophys J*, 32(7):620–7.
- Ogletree, D. F., Carpick, R. W., y Salmeron, M. (1996). Calibration of frictional forces in atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum*, 67(9):3298–306.
- Ohnuki, Y. (1965). Demonstration of the spiral structure of human chromosomes. *Nature*, 208(5013):916–7.
- Olins, A. L. y Olins, D. E. (1974). Spheroid chromatin units ( $\nu$  bodies). *Science*, 183(4122):330–2.
- Oncins, G. (2007). *Nanomechanics of organic layers and biomembranes*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Facultat de Química.
- Oncins, G., Garcia-Manyes, S., y Sanz, F. (2005). Study of frictional properties of a phospholipid bilayer in a liquid environment with lateral force microscopy as a function of NaCl concentration. *Langmuir*, 21(16):7373–9.
- Oncins, G., Vericat, C., y Sanz, F. (2008). Mechanical properties of alkanethiol monolayers studied by force spectroscopy. *J Chem Phys*, 128(4):44701.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F., y Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, 115(1):109–21.
- Parada, L. y Misteli, T. (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*, 12(9):425–32.
- Park, J. Y., Ogletree, D. F., Thiel, P. A., y Salmeron, M. (2006). Electronic control of friction in silicon pn junctions. *Science*, 313(5784):186.
- Paulson, J. R. y Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3):817–28.
- Pienta, K. J. y Coffey, D. S. (1984). A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J Cell Sci Suppl*, 1:123–35.
- Poirier, M., Eroglu, S., Chatenay, D., y Marko, J. F. (2000). Reversible and irreversible unfolding of mitotic newt chromosomes by applied force. *Mol Biol Cell*, 11(1):269–76.
- Poirier, M. G. y Marko, J. F. (2002a). Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *J Muscle Res Cell Motil*, 23(5-6):409–31.
- Poirier, M. G. y Marko, J. F. (2002b). Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(24):15393–7.
- Poirier, M. G., Monhait, T., y Marko, J. F. (2002). Reversible hypercondensation and decondensation of mitotic chromosomes studied using combined chemical-micromechanical techniques. *J Cell Biochem*, 85(2):422–34.
- Pope, L. H., Xiong, C., y Marko, J. F. (2006). Proteolysis of mitotic chromosomes induces gradual and anisotropic decondensation correlated with a reduction of elastic modulus and structural sensitivity to rarely cutting restriction enzymes. *Mol Biol Cell*, 17(1):104–13.
- Popov, V. L. (2001). Electronic and phononic friction of solids at low temperatures. *Tribol Int*, 34(4):277–286.
- Radmacher, M. (2002). *Atomic force microscopy in cell biology*, capítulo: Measuring the Elastic Properties of Living Cells by the Atomic Force Microscope, páginas 67–90. Bhanu P. Jena and J. K. Heinrich Hörber, eds. Academic Press, San Diego.
- Radmacher, M., Fritz, M., y Hansma, P. K. (1995). Imaging soft samples with the atomic force microscope: Gelatin in water and propanol. *Biophys J*, 69(1):264–70.
- Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., y Hansma, P. K. (1996). Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*, 70(1):556–67.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L., y Sweet, R. M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362(6417):219–23.
- Rattner, J. B. y Lin, C. C. (1985). Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell*, 42(1):291–6.

- Reeves, R. (2010). Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1799(1-2):3–14.
- Robinson, P. J., Fairall, L., Huynh, V. A., y Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(17):6506–11.
- Robinson, P. J. J. y Rhodes, D. (2006). Structure of the “30 nm” chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*, 16(3):336–43.
- Roque, A., Iloro, I., Ponte, I., Arrondo, J. L. R., y Suau, P. (2005). DNA-induced secondary structure of the carboxyl-terminal domain of histone H1. *J Biol Chem*, 280(37):32141–7.
- Roque, A., Ponte, I., y Suau, P. (2007). Macromolecular crowding induces a molten globule state in the C-terminal domain of histone H1. *Biophys J*, 93(6):2170–7.
- Sahasrabudde, C. G. y Van Holde, K. E. (1974). The effect of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments. *J Biol Chem*, 249(1):152–6.
- Saitoh, Y. y Laemmli, U. K. (1994). Metaphase chromosome structure: Bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, 76(4):609–22.
- Sakaguchi, A. y Kikuchi, A. (2004). Functional compatibility between isoform  $\alpha$  and  $\beta$  of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci*, 117(7):1047–54.
- Salmeron, M. (2001). Generation of defects in model lubricant monolayers and their contribution to energy dissipation in friction. *Tribol Lett*, 10:69–79.
- Samsó, M. y Daban, J. R. (1993). Unfolded structure and reactivity of nucleosome core DNA-histone H2A, H2B complexes in solution as studied by synchrotron radiation X-Ray scattering. *Biochemistry*, 32(17):4609–14.
- Savvidou, E., Cobbe, N., Steffensen, S., Cotterill, S., y Heck, M. M. S. (2005). Drosophila CAP-D2 is required for condensin complex stability and resolution of sister chromatids. *J Cell Sci*, 118(11):2529–43.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D. F., y Richmond, T. J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, 436(7047):138–41.
- Schwarz, P. M., Felthauer, A., Fletcher, T. M., y Hansen, J. C. (1996). Reversible oligonucleosome self-association: Dependence on divalent cations and core histone tail domains. *Biochemistry*, 35(13):4009–15.
- Scipioni, A., Turchetti, G., Morosetti, S., y Santis, P. D. (2010). Geometrical, conformational and topological restraints in regular nucleosome compaction in chromatin. *Biophys Chem*, 148(1-3):56–67.
- Sedat, J. y Manuelidis, L. (1978). A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 42(1):331–50.
- Shull, K. R. y Chen, W. L. (2000). Fracture mechanics studies of adhesion in biological systems. *Interface Sci*, 8(1):95–110.
- Simpson, R. T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*, 17(25):5524–31.
- Smith, M. F., Athey, B. D., Williams, S. P., y Langmore, J. P. (1990). Radial density distribution of chromatin: evidence that chromatin fibers have solid centers. *J Cell Biol*, 110(2):245–54.
- Snyder, J. A. y McIntosh, J. R. (1975). Initiation and growth of microtubules from mitotic centers in lysed mammalian cells. *J Cell Biol*, 67(3):744–60.
- Socoliuc, A., Gnecco, E., Maier, S., Pfeiffer, O., Baratoff, A., Bennewitz, R., y Meyer, E. (2006). Atomic-scale control of friction by actuation of nanometer-sized contacts. *Science*, 313(5784):207–10.
- Sogo, J. M., Stahl, H., Koller, T., y Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J Mol Biol*, 189(1):189–204.
- Stack, S. M. y Anderson, L. K. (2001). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res*, 9(3):175–98.
- Stark, R. W., Drobek, T., y Heckl, W. M. (2001). Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic-force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86(1-2):207–215.
- Stark, R. W., Thalhammer, S., Wienberg, J., y Heckl, W. M. (1998). The AFM as a tool for chromosomal dissection—the influence of physical parameters. *App Phys A*, 66(Part 1 Suppl. S):S579–S584.

- 9th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques, HAMBURG, GERMANY, JUL 20-25, 1997.
- Stehr, R., Schöpflin, R., Ettig, R., Kepper, N., Rippe, K., y Wedemann, G. (2010). Exploring the conformational space of chromatin fibers and their stability by numerical dynamic phase diagrams. *Biophys J*, 98(6):1028–37.
- Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K., y Levi-Setti, R. (2001). Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol*, 155(6):899–910.
- Suau, P., Bradbury, E. M., y Baldwin, J. P. (1979). Higher-order structures of chromatin in solution. *Eur J Biochem*, 97(2):593–602.
- Sugiyama, S., Yoshino, T., Kanahara, H., Shichiri, M., Fukushi, D., y Ohtani, T. (2004). Effects of acetic acid treatment on plant chromosome structures analyzed by atomic force microscopy. *Anal Biochem*, 324(1):39–44.
- Sumner, A. T. (1989). *Light microscopy in biology. A practical approach*, capítulo: Chromosome banding, páginas 279–314. IRL Press, Oxford.
- Sumner, A. T. (2003). *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing company, Malden, MA.
- Tamayo, J. (2003a). Structure of human chromosomes studied by atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 141(3):198–207.
- Tamayo, J. (2003b). Structure of human chromosomes studied by atomic force microscopy. Part II. Relationship between structure and cytogenetic bands. *J Struct Biol*, 141(3):189–97.
- Tamayo, J., Miles, M., Thein, A., y Soothill, P. (1999). Selective cleaning of the cell debris in human chromosome preparations studied by scanning force microscopy. *J Struct Biol*, 128(2):200–10.
- Taniguchi, T. y Takayama, S. (1986). High-order structure of metaphase chromosomes: Evidence for a multiple coiling model. *Chromosoma*, 93(6):511–4.
- Tavormina, P. A., Côme, M.-G., Hudson, J. R., Mo, Y.-Y., Beck, W. T., y Gorbsky, G. J. (2002). Rapid exchange of mammalian topoisomerase II $\alpha$  at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J Cell Biol*, 158(1):23–9.
- The BAC Resource Consortium (2001). Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature*, 409(6822):953–8.
- Thoma, F. y Koller, T. (1981). Unravelled nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: Influence of non-histone components and histone H1. *J Mol Biol*, 149(4):709–33.
- Thoma, F., Koller, T., y Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, 83(2):403–27.
- Thomas, J. O. y Kornberg, R. D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(7):2626–30.
- Tomschik, M., Zheng, H., van Holde, K., Zlatanova, J., y Leuba, S. (2005). Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(9):3278–83.
- Torrent-Burgués, J., Oncins, G., Garcia-Manyes, S., y Sanz, F. (20XX). Biomimetics in biophysics: model systems, experimental techniques and computation. Pendiente de publicar.
- Tremethick, D. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128(4):651–4.
- Urbacher, E. C. y Bunick, G. J. (1985). X-ray structure of the nucleosome core particle. *J Biomol Struct Dyn*, 2(6):1033–55.
- Uchiyama, S., Kobayashi, S., Takata, H., Ishihara, T., Hori, N., Higashi, T., Hayashihara, K., Sone, T., Higo, D., Nirasawa, T., Takao, T., Matsunaga, S., y Fukui, K. (2005). Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J Biol Chem*, 280(17):16994–7004.
- Uchiyama, S., Kobayashi, S., Takata, H., Ishihara, T., Sone, T., Matsunaga, S., y Fukui, K. (2004). Protein composition of human metaphase chromosomes analyzed by two-dimensional electrophoreses. *Cytogenet Genome Res*, 107(1-2):49–54.
- van der Vegte, E. W. y Hadziioannou, G. (1997). Scanning force microscopy with chemical specificity: An extensive study of chemically specific tip-surface interactions and the chemical imaging of surface functional groups. *Langmuir*, 13(16):4357–68.
- van Holde, K. y Zlatanova, J. (1996). What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(20):10548–55.

- van Holde, K. y Zlatanova, J. (1999). The nucleosome core particle: Does it have structural and physiologic relevance? *Bioessays*, 21(9):776–80.
- van Holde, K. y Zlatanova, J. (2007). Chromatin fiber structure: Where is the problem now? *Semin Cell Dev Biol*, 18(5):651–8.
- van Holde, K. E. (1989). *Chromatin*. Springer series in molecular biology. Springer Verlag, New York.
- Walsh, D. M. y Selkoe, D. J. (2007). A  $\beta$  oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*, 101(5):1172–84.
- Wanner, G. y Formanek, H. (2000). A new chromosome model. *J Struct Biol*, 132(2):147–61.
- Watson, J. D. y Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738.
- Weisenhorn, A. L., Khorsandi, M., Kasas, S., Gotzos, V., y Butt, H. J. (1993). Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*, 4:106–113.
- White, C. L., Suto, R. K., y Luger, K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J*, 20(18):5207–18.
- Widom, J. (1986). Physicochemical studies of the folding of the 100 Å nucleosome filament into the 300 Å filament. Cation dependence. *J Mol Biol*, 190(3):411–424.
- Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27:285–327.
- Widom, J. y Klug, A. (1985). Structure of the 300 Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, 43(1):207–13.
- Wiita, A. P., Perez-Jimenez, R., Walther, K. A., Gräter, F., Berne, B. J., Holmgren, A., Sanchez-Ruiz, J. M., y Fernandez, J. M. (2007). Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force. *Nature*, 450(7166):124–7.
- Williams, S. P., Athey, B. D., Muglia, L. J., Schappe, R. S., Gough, A. H., y Langmore, J. P. (1986). Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J*, 49(1):233–48.
- Williams, S. P. y Langmore, J. P. (1991). Small angle X-Ray scattering of chromatin. Radius and mass per unit length depend on linker length. *Biophys J*, 59(3):606–18.
- Woessner, R. D., Mattern, M. R., Mirabelli, C. K., Johnson, R. K., y Drake, F. H. (1991). Proliferation and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ*, 2(4):209–14.
- Wold, D. J. y Frisbie, C. D. (2001). Fabrication and characterization of metal-molecule-metal junctions by conducting probe atomic force microscopy. *J Am Chem Soc*, 123(23):5549–56.
- Wolffe, A. (1998). *Chromatin: structure & function*. Academic Press, San Diego, 3rd edition.
- Wong, H., Victor, J.-M., y Mozziconacci, J. (2007). An all-atom model of the chromatin fiber containing linker histones reveals a versatile structure tuned by the nucleosomal repeat length. *PLoS ONE*, 2(9):e877.
- Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A., y Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(19):9021–5.
- Wu, Y., Cai, J., Cheng, L., Yun, K., Wang, C., y Chen, Y. (2006). Atomic force microscopic examination of chromosomes treated with trypsin or ethidium bromide. *Chem Pharm Bull*, 54(4):501–5.
- Yabuki, H., Dattagupta, N., y Crothers, D. M. (1982). Orientation of nucleosomes in the thirty-nanometer chromatin fiber. *Biochemistry*, 21(20):5015–20.
- Yager, T. D., McMurray, C. T., y Holde, K. E. V. (1989). Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles. *Biochemistry*, 28(5):2271–81.
- Zentgraf, H., Bock, C. T., y Schrenk, M. (1987). *Electron microscopy in molecular biology. A practical approach*, capítulo: Chromatin spreading, páginas 81–100. J. Somerville and U. Scheers, eds. The practical approach series. IRL Press.
- Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K., y Elings, V. (1993). Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surf Sci*, 290(1-2):L688–L692.
- Zhou, J., Fan, J. Y., Rangasamy, D., y Tremethick, D. J. (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat Struct Biol*, 14(11):1070–6.
- Zlatanova, J., Bishop, T. C., Victor, J.-M., Jackson, V., y van Holde, K. (2009). The nucleosome family: Dynamic and growing. *Structure*, 17(2):160–71.



---

Zlatanova, J., Leuba, S. H., Yang, G., Bustamante, C., y van Holde, K. (1994). Linker dna accessibility in chromatin fibers of different conformations: A reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(12):5277–80.

Zlatanova, J., Lindsay, S. M., y Leuba, S. H. (2000). Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol*, 74(1-2):37–61.

Zypman, F. R. y Eppell, S. J. (1997). Electrostatic tip-surface interaction in scanning force microscopy: A convenient expression useful for arbitrary tip and sample geometries. *J Vac Sci Technol B*, 15(6):1853–60.



Parte VII

**APÉNDICES**



# Apéndice A

## Símbolos y acrónimos

$\text{Å}$	Ångström
$A$	área de contacto entre dos superficies
$A_{asp}$	área de contacto a través de las asperezas (asperities)
aa	amino ácido
$B$	medida del ancho de banda
$d$	deflexión real de la punta (nm)
Da	Daltons (equivalente a 1 g/mol)
$\Delta$	<i>offset</i> del <i>loop</i> de fricciones
$d_l$	deflexión lateral de la punta detectada por el fotodetector ( $V$ )
$d_v$	deflexión vertical de la punta detectada por el fotodetector ( $V$ )
$\delta$	profundidad de penetración, deformación de la muestra (nm)
ds	doble hebra
$E$	módulo de Young
et al.	et alter, colaboradores
$F_A$	fuerza de adhesión entre dos cuerpos
$F_{pl}$	fuerza necesaria para romper plásticamente una placa
$F_f$	fuerza de fricción
$F_v$	fuerza vertical
$g$	campo gravitatorio

---

GPa	GigaPascals
h	horas
i.e.	id est, esto es
$k_b$	constante de Boltzmann
kb	kilobases de DNA
kHz	kiloHerzios
kV	kilovoltios
$\Delta L$	<i>Linking number</i>
$L$	carga ejercida
l	litro
M	molar
$M_s$	fuerza ejercida por un cuerpo de masa $M$
mA	miliamperios
mbar	milibares
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
MPa	MegaPascals
$\mu$	coeficiente de fricción
nN	nanoNewton
nm	nanometros
$\nu$	constante de Poison
$\omega_0$	frecuencia de resonancia libre del <i>cantilever</i>
p/v	peso/volumen
Pa	Pascals
pb	pares de bases
pN	picoNewtons
ppi	puntos por pulgada

---

$Q$	factor de calidad del <i>cantilever</i>
$R$	radio de la punta
$r_{par}$	radio de la superficie de contacto punta-placa a medida que progresa la deformación elástica durante la indentación.
rpm	revoluciones por minuto
RT	temperatura ambiente
s	segundo
$S_l$	<i>sensitivity</i> lateral del <i>cantilever</i>
$S_v$	<i>sensitivity</i> vertical del <i>cantilever</i>
$\theta$	ángulo de inclinación de la superficie
$T$	temperatura
$t$	tiempo
$T_-$ o $T_+$	fuerza de tracción (fuerza que contraresta la $F_f$ durante los experimentos de fricción estática)
V	voltios
v/v	volumen/volumen

AFM	Microscopía de fuerza atómica
AFS	Espectroscopia de fuerza atómica
AM-AFM	<i>Amplitude Modulation AFM mode</i>
CCD	Charge-coupled device
CPP	<i>Chromosome peripheral proteins</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

---

EGTA	Ácido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
EM	Microscopía electrónica
FBS	Suero fetal bovino
FFM	Microscopía de fuerza de fricción
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
LFM	Microscopía de fuerza lateral
MNasa	Nucleasa micrococal
NCP	Partícula núcleo del nucleosoma
NRL	<i>Nucleosome repeat length</i>
PA	Tampón poliaminas (ver pág. 71)
PAD	Tampón poliaminas con digitonina (ver pág. 71)
PM	Tampón con $Mg^{2+}$ 5 mM (ver pág. 71)
PME	Tampón PM con EDTA (ver pág. 71)
PVC	Policloruro de vinilo
RMS	<i>Root-mean square</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
SAR	<i>Scaffold associated regions</i>
SDS	Sodio dodecil sulfato
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFA	<i>Surface force apparatus</i>
SIMS	<i>Secondary ion mass spectrometry</i>
STM	Microscopio de efecto túnel
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TIFF	Tagged image file format
UV	Ultravioleta



# Apéndice B

## Publicaciones científicas derivadas de la tesis

Parte del trabajo experimental realizado en esta tesis doctoral ha contribuido a los siguientes artículos científicos:

### Artículos científicos

- **Gállego, I., Castro-Hartmann, P., Caravaca J., Caño, S. & Dabán, J.R.** (2009) Dense chromatin plates in metaphase chromosomes. *Eur Biophys J.* 38(4):503-22. Mirar el comentario en la *Royal Society of Chemistry* “DNA takes a new form” en: <http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2009/February/17020901.asp>.
- **Caravaca, J.M., Caño, S., Gállego, I & Daban, J.R.** (2005) Structural elements of bulk chromatin within metaphase chromosomes. *Chromosome Res.* 13: 725-43.
- **Gállego, I., Oncins, G., Sisquella, X., Fernandez-Busquets, X & Daban, J. R.** Nanotribology results show that DNA forms a mechanically resistant two-dimensional network in metaphase chromatin plates. *Biophys J*, enviado para publicación.

### Participación en congresos

- **Autores:** Daban, J.R., Castro-Hartmann, P., Gállego, I., Milla, M., Caño, S. & Caravaca, J.M.  
**Título:** Metaphase chromosomes are formed by stacked thin plates containing irregularly oriented nucleosomes.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** I Chromatin and Epigenetic meeting. Societat Catalana de Biologia (Secció de Biologia Molecular).  
**Lugar:** Barcelona **Año:** Marzo de 2010.

- **Autores:** Milla M., Castro-Hartman P., Gállego I. & Daban J.-R.  
**Título:** Estructura interna de las placas de cromatina de los cromosomas metafásicos.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** III Jornada de Biofísica. Societat Catalana de Biologia (Secció de Biologia Molecular).  
**Lugar:** Barcelona **Año:** Setiembre de 2009.
- **Autores:** Daban J. R., Castro-Hartman P., Gállego I., Milla M., Caño S. & Caravaca J.M.  
**Título:** Stacked thin plates containing irregularly oriented nucleosomes in metaphase chromosomes  
**Participación:** Comunicación oral  
**Congreso:** Joint Meeting of the Spanish and Portuguese Microscopy Societies  
**Lugar:** Segovia **Año:** Julio 2009
- **Autores:** Milla M., Castro-Hartmann P., Gállego I. & Daban J. R.  
**Título:** Orientación irregular de los nucleosomas en las placas de cromatina de los cromosomas metafásicos.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** XVII Jornades de Biologia Molecular. Societat Catalana de Biologia (Secció de Biologia Molecular).  
**Lugar:** Barcelona **Año:** Junio de 2009.
- **Autores:** Gállego I., Sisquella X., Fernandez-Busquets X & Daban J.R.  
**Título:** Denaturation of metaphase chromatin plates observed by transmission electron microscopy and atomic force microscopy in aqueous solution.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** 14th European Microscopy Congress.  
**Lugar:** Aachen, Alemania **Año:** Septiembre de 2008.
- **Autores:** Daban J.-R., Gállego I., Caño S., Caravaca J.-M. & Castro-Hartman P.  
**Título:** Estudios de microscopía electrónica y de microscopía de fuerza atómica de las placas de cromatina del cromosoma metafásico.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** II Jornades de Biofísica. Societat Catalana de Biologia (Secció de Biologia Molecular).  
**Lugar:** Barcelona **Año:** Diciembre 2007.
- **Autores:** Gállego I., Caravaca J. M., Caño S., Castro-Hartman P. & Daban J. R.  
**Título:** Placas compactas en los cromosomas metafásicos: estudios de microscopía electrónica y de fuerza atómica.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** XXIII reunión bienal de la Sociedad de Microscopía de España.  
**Lugar:** Bilbao **Año:** July 2007
- **Autores:** Caño S., Caravaca J. M., Gállego I. & Daban J. R.  
**Título:** Estructura de la cromatina condensada.  
**Participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** XV Jornada de Biologia Molecular. Societat Catalana de Biologia (Secció de Biologia Molecular).  
**Lugar:** Barcelona **Año:** Junio 2007.

- **Autores:** Gállego I., Caravaca J. M., Caño S. & Daban J. R.  
**Título:** Condicions d'existència de plaques de cromatina extrudides de cromosomes metafàsics.  
**Participación:** Comunicación Oral.  
**Congreso:** XIV Jornada de Biologia Molecular. Societat Catalana de Biologia (Secció de Biologia Molecular).  
**Lugar:** Barcelona **Año:** 2006.



## Apéndice C

# Algo así como un agradecimiento

Desde siempre, o al menos eso creo recordar, he sido una persona curiosa; tanto con el entorno que me rodeaba como con el trasfondo de lo que en principio me rodeaba. Ya desde un principio me sentí muy atraído por las ciencias en general. Poco a poco me fui dando cuenta de que lo que mas interés tenía para mí eran las biociencias. Me fascinaba imaginarme cómo la célula era capaz de, mediante unas nanomáquinas llamadas proteínas, duplicar y transcribir su propio material genético de una forma organizada, como si de una sociedad en progreso se tratara. Pero lo que aún me parecía más fascinante, era cómo el ser humano era capaz de describir esa actividad nanoscópica; como si un colectivo de individuos hubiese filmado con una cámara especial los movimientos de la célula en su actividad social diaria. Supongo que, por permitirme tomar parte de esta complicada película debo dar algunos agradecimientos:

Al Dr. Joan-Ramon Daban por supervisar este trabajo y compartir conmigo todo su conocimiento sin dudarle un momento. Por evitar que me diluyese en el océano del conocimiento científico (que puede ser muy inmenso. . .). Por las muchas y muy interesantes charlas sobre multitud de temas científicos y no tan científicos. Por los muchos trayectos del jueves de camino al PCB. Pero sobre todo, sobre todo. . . por dejarme compartir su interminable entusiasmo por la ciencia.

A mis compañeros de grupo: Juanma, Pablo y Silvia, por transmitirme parte de los conocimientos experimentales en la vida diaria de un laboratorio. Así como por disfrutar de las grandes diferencias que nos unen, de las que todos debemos aprender. A Maria Milla, con la que he compartido cultivos, algún que otro tampón y más de una rejilla en los últimos años de tesis. Con ella he tenido agradables charlas

(y algún que otro debate) y es la que me ha tenido que “soportar” esta última etapa. . . Agradecer también a Maria Nieto por la ayuda prestada en la realización de la Figura 6.1.

Quiero agradecer al Servei de Tècniques Nanomètriques dels Serveis Científico-Tècnics de la UB (SCT-UB) por el estupendo soporte científico-técnico que nos ha prestado. En especial quiero agradecer al Dr. Ismael Díaz (i.e el caimán) y al Dr. Jordi Díez porque han hecho posible, en grandiosa medida, la visualización de las placas mediante AFM. ¡Pero sobre todo, por hacer que cada jueves (que no han sido pocos), en el PCB, me sienta como en mi casa!. ¡Ahora si que me podéis tirar cinco céntimos!.

También quiero agradecer especialmente al Dr. Gerard Oncins del servei de Tècniques Nanomètriques por haberme enseñado prácticamente todo lo que sé de espectroscopia de fuerza atómica y de microscopía de fuerza de fricción. Porque con su gran ayuda hemos obtenido unos resultados magníficos de LFM. Pero sobre todo, porque es una gran persona, con la que hacer ciencia se convierte en algo lúdico y a la vez productivo. Eso sí, siempre se ha de tener muy claro que está prohibido tirarle cacahuets a los técnicos. . .

Quiero agradecer también al Dr. Xavier Fernandez-Busquets del Biomolecular Interactions Team, Grup de Nanobioenginyeria del Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) y del Institut de Nanociències i Nanotecnologia (UB); y a Xavier Sisquella de la Plataforma de Nanotecnologia (PCB). Esta colaboración ha permitido realizar los estudios de desnaturalización en tiempo real. También con su ayuda se pudo realizar la derivación de las puntas de AFM. ¡Quiero agradecer su amabilidad y las charlas a la hora de comer!. Y cómo no, por el intercambio de información musical con X. Sisquella (aún me pregunto de dónde saca tantos grupos).

Al Servei de Cultius Cel·lulars, producció d'Anticosos i Citometria del Institut de Biotecnologia i Biomedicina (SCAC-IBB) por ofrecerme un estupendo servicio y dejarme usar sus instalaciones. Quiero agradecer especialmente a Paqui y a Franc porque me han enseñado todo lo que sé sobre cultivos celulares y siempre han estado dispuestos a ayudarme en todo lo que he necesitado. A Franc, quiero agradecerle todas esas charlas que han sido un gran apoyo desde que entró en el servicio (Franc, ¡créeme si te digo que las voy a echar de menos!). Dentro de este grupo de agradecimientos, me queda por agradecer a una amor de persona, la cual siempre tiene una dulce palabra de acento cálido que te contagia buen humor; ¡Araís, a ti también te voy a echar de menos!.

Al servei d'anàlisi i fotodocumentació d'electroforesis, autoradiografies i luminescència. Y en especial, ¡cómo no! a su ilustrísima don Dr. Salvador Bartolomé por el estupendo servicio que me ha prestado, y por aguantarme durante todos estos años,

que no han sido pocos (qué valor que tienes macho). Creo que hasta lo voy a echar de menos. . .

Al Servei de Microscòpia Electrònica de la UAB, por su asesoramiento y por responder las mil y una preguntas que he tenido durante el transcurso del trabajo experimental.

Quiero agradecer a Marc Pujadas (i.e. Dama) por la confección de la figura del modelo de cromosoma (Figura 24.1, pág. 239), la figura del modelo esquemático de la fricción sobre las placas de cromatina (Figura 23.1, pág. 236) y por el estupendo diseño de la portada de esta tesis. Porque siempre está dispuesto a ayudar a todo el mundo, ¡Gracias Dama, eres un crack!. De retoque, quiero agradecer a su pareja Ivette y al recién llegado Dadá, por haberme dejado robarles a Marc en sus tiempo libre. . .

A los compañeros del departamento que han hecho que esto de la ciencia sea más familiar, ¡y porque no se dejen de hacer las calçotadas en el departamento!. En especial a Esther por haber sido tan buena compañera durante el tiempo que coincidimos. A Zoran por, lo que podríamos llamar, la filosofía de pasillo sin la que la ciencia perdería gran parte de su sentido para mí. A Rita porque siempre ha sabido arrancarme una sonrisa, ¡y por alguna que otra fiesta!. A Jordi por su ácido sentido del humor. A Mar, porque aunque no lo sepa agradezco mucho su compañía. ¡Y a una larga lista de nombres de gente que aún sigue o que lamentablemente ya no están en el departamento!

Al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular por concederme una plaza A.33, una beca propia de departamento y un contrato (capítulo 6). Y por permitirme realizar el trabajo experimental en sus instalaciones.

A la Generalitat de Catalunya por concederme una beca FI.

A mis padres por hacer posible el inicio y sobre todo la parte final de esta etapa, por apoyarme siempre en mis proyectos y por preocuparse tanto (a veces demasiado) de mí. A mi hermana por hacer ver que le interesa la Bioquímica cuando le explico algo y por haber estado ahí cuando he necesitado hablar con alguien.

A mis amigos:

Figus (Oscar y Edu), Dama, Ot, Ferran, Abadias, Soco, Itxaso, Olga, Agnés, Ivette, Jorge, Mar, Lilita, Lucía y, cómo no, a los bebés del grupo Gala y Dadá. Figus, a vosotros os agradezco todos los momentos que hemos vivido en el mar, por encima y por debajo del agua. ¡Uff, sólo de pensarlo me entran ganas de ponerme el traje y las aletas!. porque siempre estáis dispuestos a montar una actividad (aunque siempre lleguéis tarde. . .) que te permite “cargar las pilas” y desconectar en momentos clave. A Ot por las fiestas que nos hemos marcado por Barcelona en el Apolo, Moog, el

mítico Macarena y la noches en la plaza del tripi... ¡Qué tiempos!. A Itxaso porque siempre tiene un sabio consejo, que pone los puntos sobre las íes. A Guille, porque las charlas a la hora de comer han sido un punto de fuga importante y siempre ha estado ahí para dialogar. A Nacho (i.e. Mr. Friend), por ser uno de los personajes más pintorescos que he conocido en Barcelona, persona que no deja de sorprenderme con su aguda forma de razonar y amplia visión las cosas. A Joana, porque aunque hace poco que la conozco siempre me contagia su entusiasmo. Y en general por todas las vivencias habidas y por haber que me han permitido disfrutar de mis amigos, aún que últimamente no nos podamos ver demasiado por tiempo, motivos geográficos...

A Josep, por enseñarme casi todo en cuanto a las múltiples formas de conocimiento y por darme una visión más general de lo que nos rodea; y a Luisa, por sus buenos consejos.

A Mazin, ¡qué decir de este gran hombre!. Creo que cualquier palabra que lo intente definir debería ser redefinida desde el propio diccionario. Personalmente quiero darle las gracias por lo tanto que me ha enseñado con tan poco. Si alguien se cruza con él, la diosa fortuna le habrá hecho un gran regalo.

También quiero hacer referencia a la gente que ha convivido conmigo estos años en Barcelona. Gente con los que he compartido buenos momentos, me han ayudado siempre que lo he necesitado, y con cuya compañía hemos formado una familia. En orden cronológico: Cons, Sadhbh, Koldo, Itxaso y Arianna.

También quiero dar un agradecimiento especial a mis compañeros de promoción, porque durante todos estos años, que empiezan a ser unos cuantos... Siempre nos hemos apoyado moral y prácticamente (¡qué bien que va tener compañeros que te pasan los papers a los cuáles no tienes acceso!). Y porque, aunque el tiempo y la geografía nos separe, mantengamos el contacto, el amic inservible, las birras por Gràcia... Ahí van los nombres: Albert, Asier, Cris, David, Ester, Geral, Gemma, Jordi, Martini, Nere, Xavi C., Xavi M.

Y no me olvido del colectivo Italiano. Una gente estupenda que no duda en abrirte las puertas de su casa e invitarte a una exquisita cena...

Quiero agradecer al *software* libre por desarrollar plataformas tan potentes como L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X. Aunque implique sudor y lágrimas, ha merecido la pena aprender a manejarlo. Quiero agradecer a Galbis, Javi y Nadal del IFAE por iniciarme en este mundillo. A Xavi Castells porque me ha ayudado a resolver algún que otro problema con las tablas y alguna que otra duda. Quiero agradecer el altruismo de las personas que pertenecen a las listas MacT<sub>E</sub>X y CervanT<sub>E</sub>X porque sin su ayuda, el montaje de alguna de las partes de esta tesis hubiese sido prácticamente imposible en tan poco tiempo. En especial quiero recordar algún nombre: Ross Moore, Herbert Schulz, Juan Luis Verona, Luis Rivera, Yago, Peter Dyballa y Richard Koch.



Y finalmente, al lector de los agradecimientos por tener el valor de haber llegado hasta el final.



