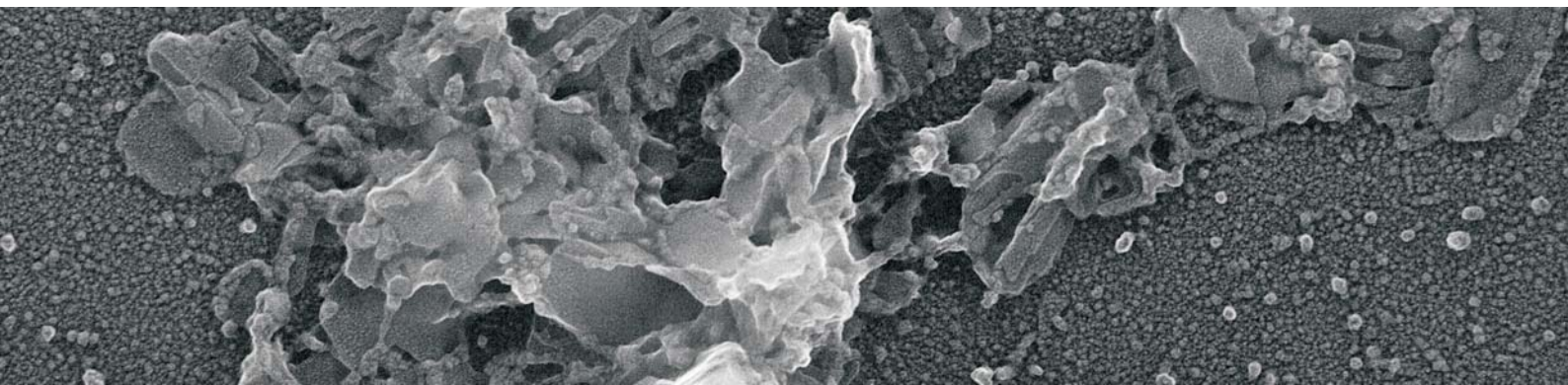

Plaques de cromatina dels cromosomes metafàsics: estructura i autoassociació

Maria Milla Astals



En moltes de les imatges mostrades anteriorment s'observa un fons amb agregats de cromatina de diverses mides. Hi destaquen cossos circulars d'uns 30 nm de diàmetre que són idèntics a les estructures circulars compactes descrites pel nostre grup d'investigació en treballs previs realitzats amb petits fragments de cromatina d'eritròcit de pollastre (Bartolomé et al., 1994 i 1995; Caño, 2007). A la figura 3.33, es mostren camps sencers plens d'aquestes estructures circulars produïdes amb fragments de cromatina de cromosomes metafàsics.

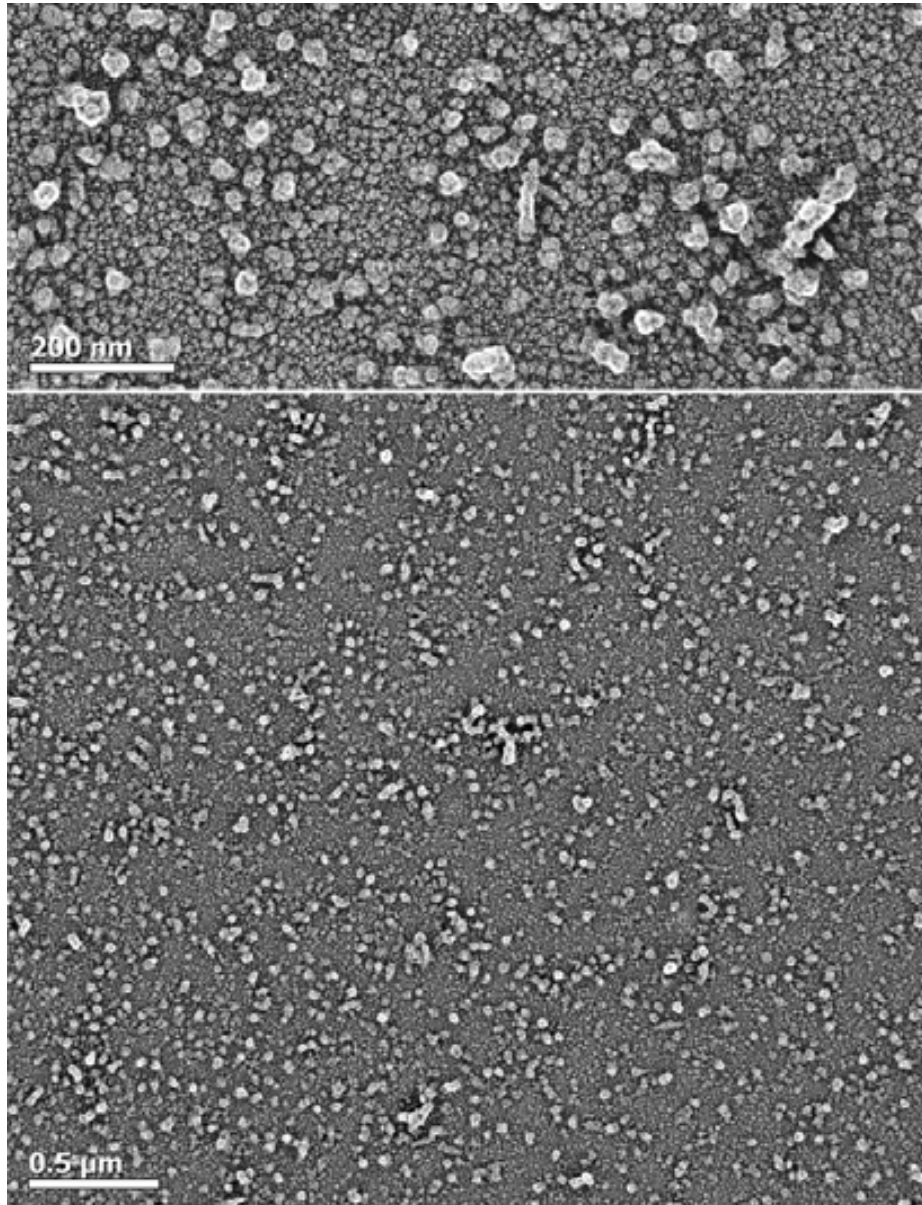


Figura 3.33. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂.

En molts dels experiments (veure exemples a les figures 3.34 i 3.35) apareixien cossos circulars compactes de 30 nm de diàmetre al voltant de les plaques en formació, però també associats amb els marges de les estructures laminars i amb la seva superfície. En algunes imatges es veu com les estructures circulars són absorbides per les plaques en procés de formació.

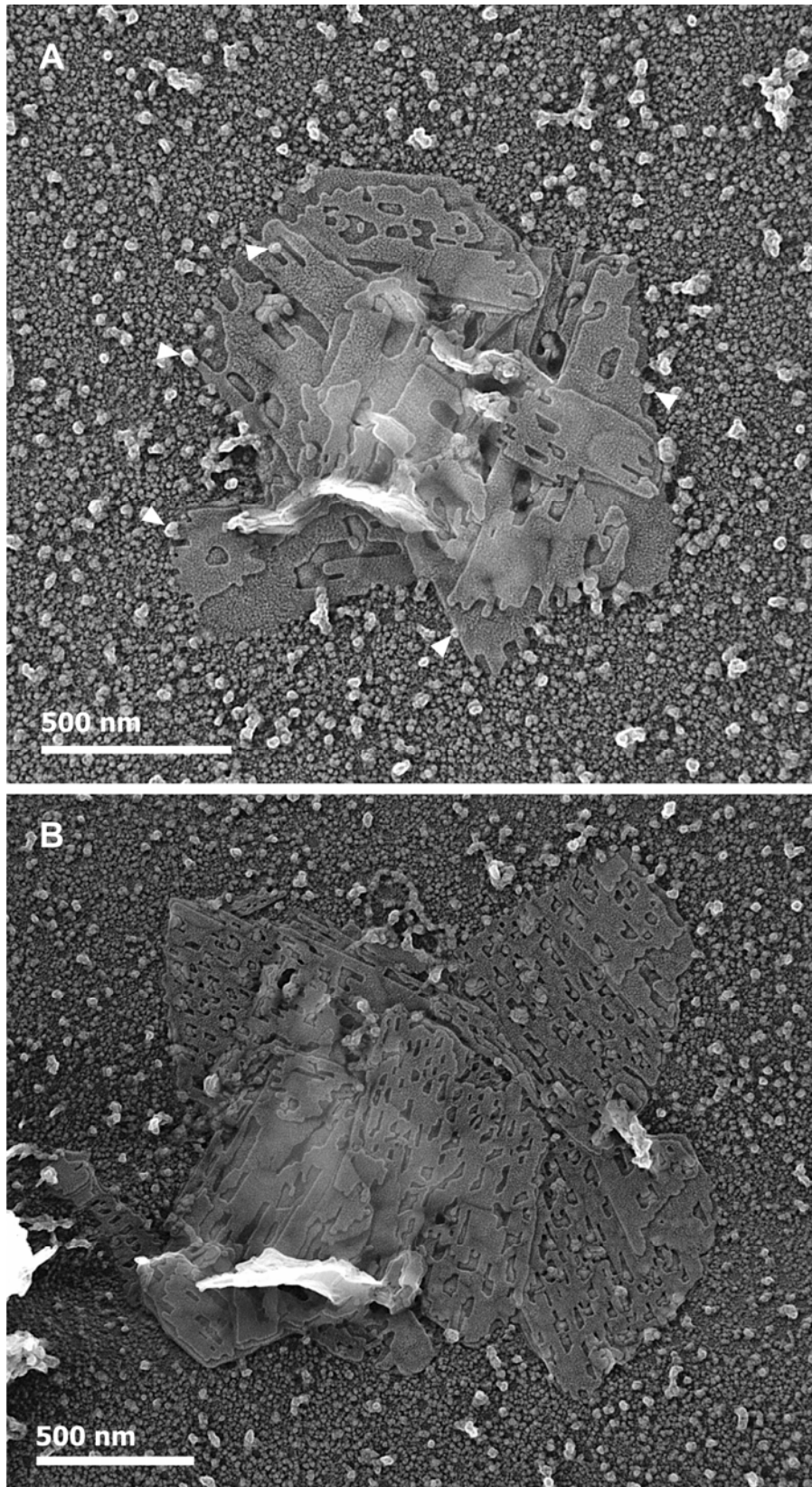


Figura 3.34. Plaques i estructures circulars en extensions de fragments de cromatina metafàsica dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ durant 5 hores a 4°C. (A) Les fletxes blanques indiquen cossos de 30 nm que es fusionen amb els laterals de les plaques.

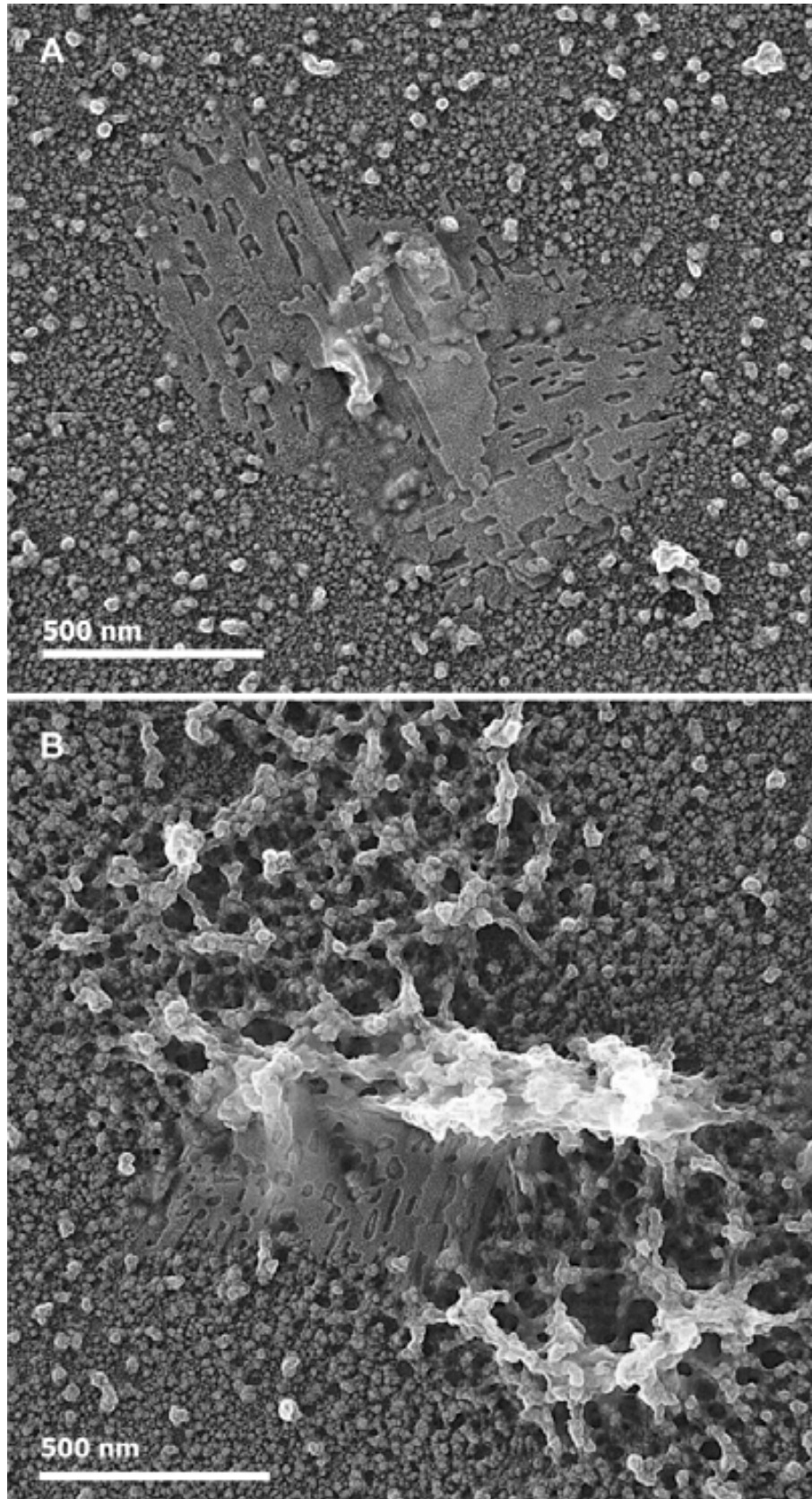


Figura 3.35. Plaques i estructures circulars en mostres de fragments de cromatina metafàsica dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ durant 5 hores a 4°C.

3.3.3. Formació de plaques en presència de $MgCl_2$ i $CaCl_2$.

Es va analitzar la formació d'agregats laminars en altres condicions que no fossin les especificades anteriorment. En primer lloc, es va analitzar la formació de plaques en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2) i concentracions creixents de $MgCl_2$, però en absència d'ions monovalents. A les figures 3.36 i 3.37 es mostra l'efecte de concentracions creixents de $MgCl_2$. Quan s'augmenta la concentració de $MgCl_2$, augmenta també la presència de plaques i la seva grandària.

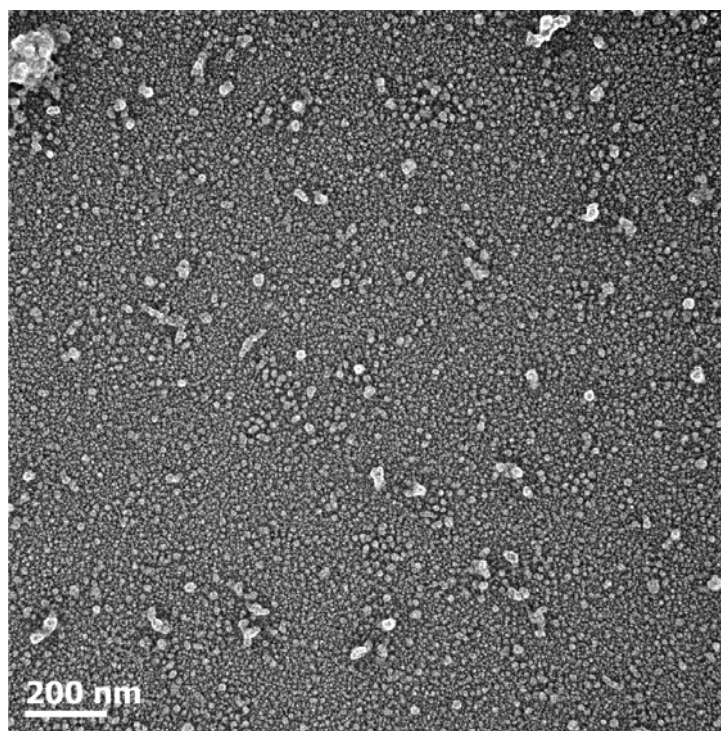
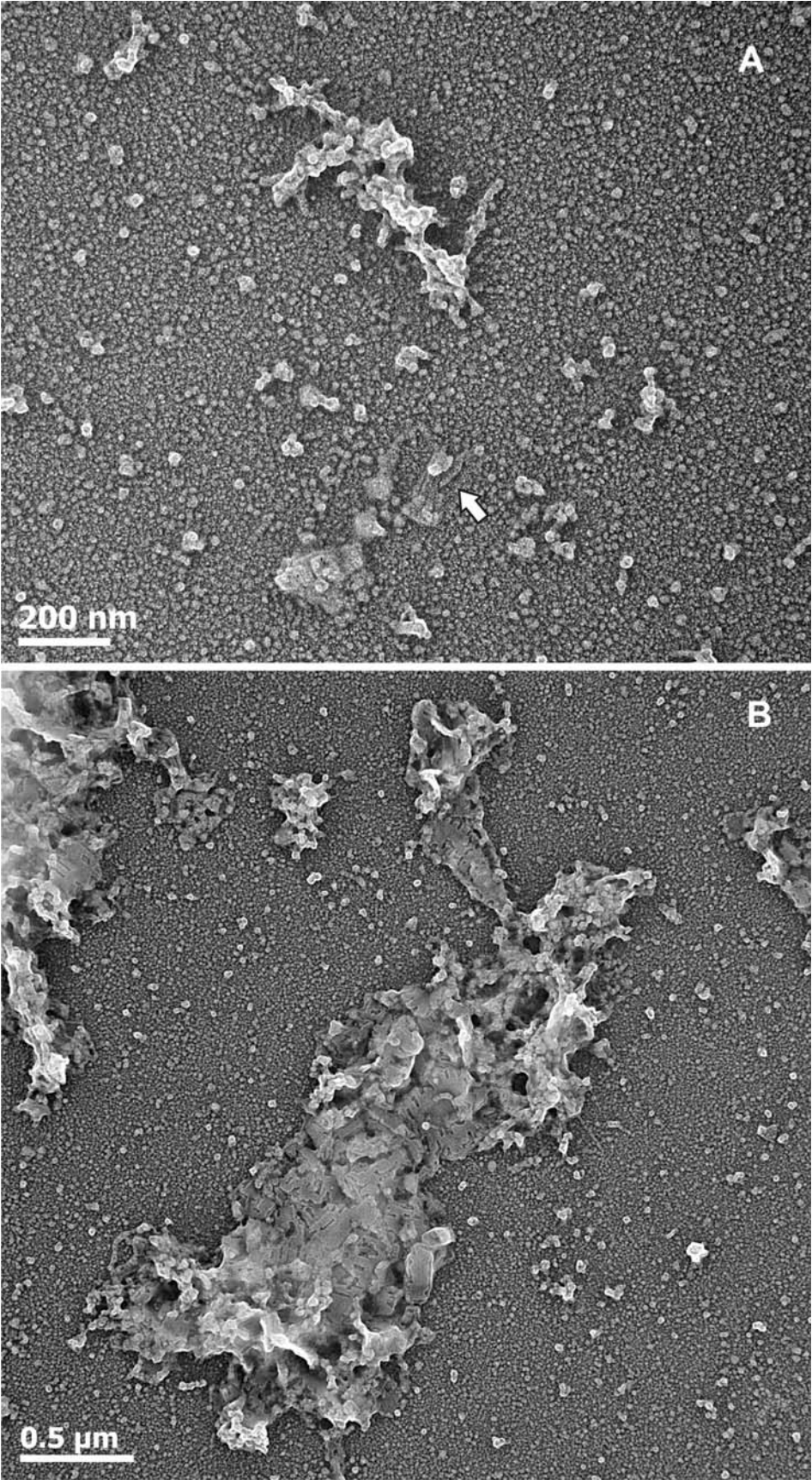


Figura 3.36. Agregats obtinguts per autoassociació de fragments de cromatina i dialitzats en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2) sense cations. La mostra ha estat estesa per centrifugació, fixada sobre reixeta i platinada rotacionalment (apartats 2.12.4-6).

Figura 3.37. (a la pàgina següent). Fragments de cromatina obtinguts per autoassociació i dialitzats en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2) i de concentracions creixents de $MgCl_2$: (A) 1 mM $MgCl_2$ i (B) 2 mM $MgCl_2$. La fletxa en A indica un agregat laminar en formació. La mostra ha estat estesa per centrifugació, fixada sobre reixeta i platinada rotacionalment (apartats 2.12.4-6).



A més, també es va estudiar la formació de plaques a concentracions creixents de $MgCl_2$ i a concentracions fisiològiques de ions monovalents. Tal com s'observa de les figures 3.38-3.41 i com en el cas anterior, a l'augmentar la concentració de $MgCl_2$, augmenta la presència i grandària de les plaques observades.

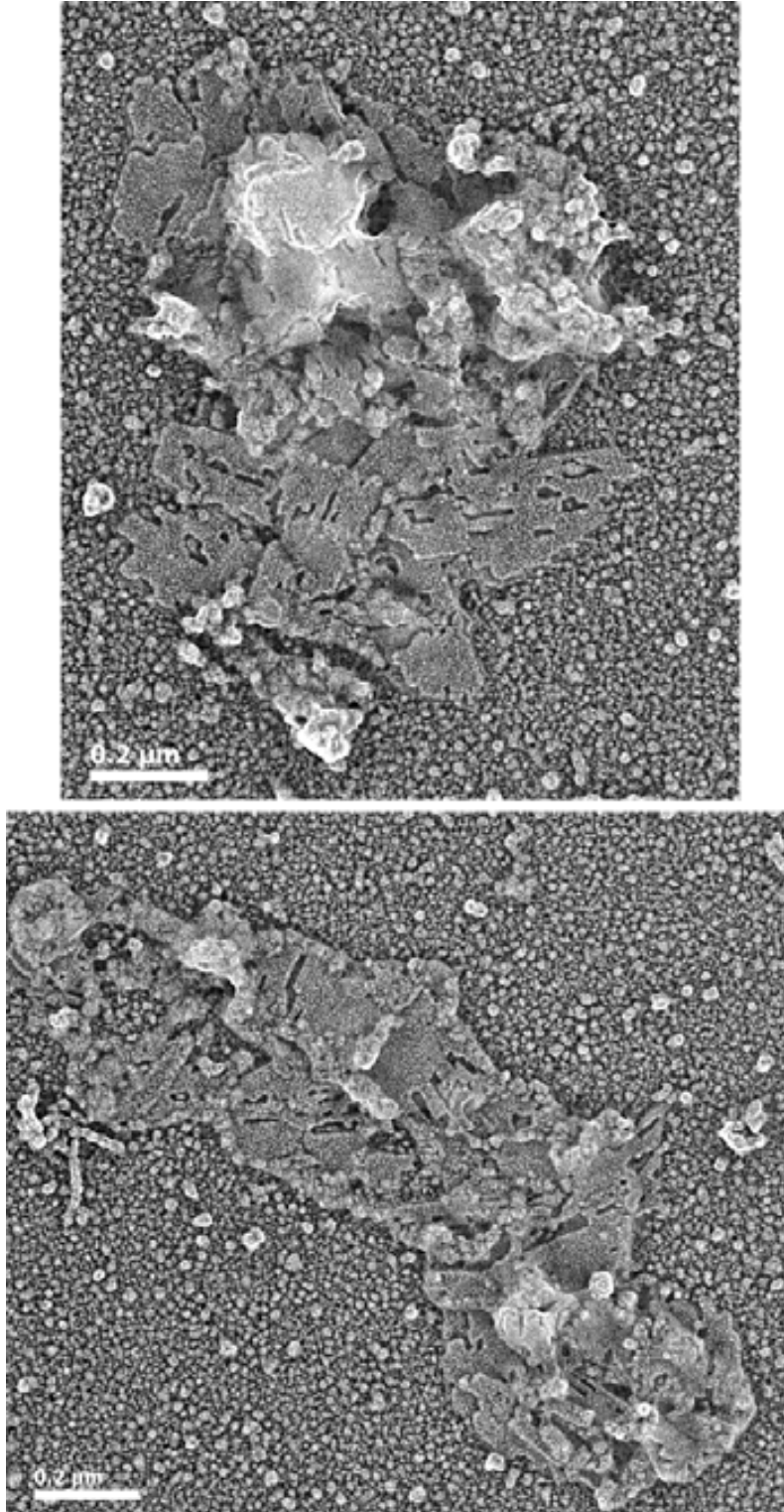


Figura 3.38. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió de plaques obtingudes per associació de fragments de cromatina metafàsica dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 1 mM $MgCl_2$ durant 6 h a 4°C.

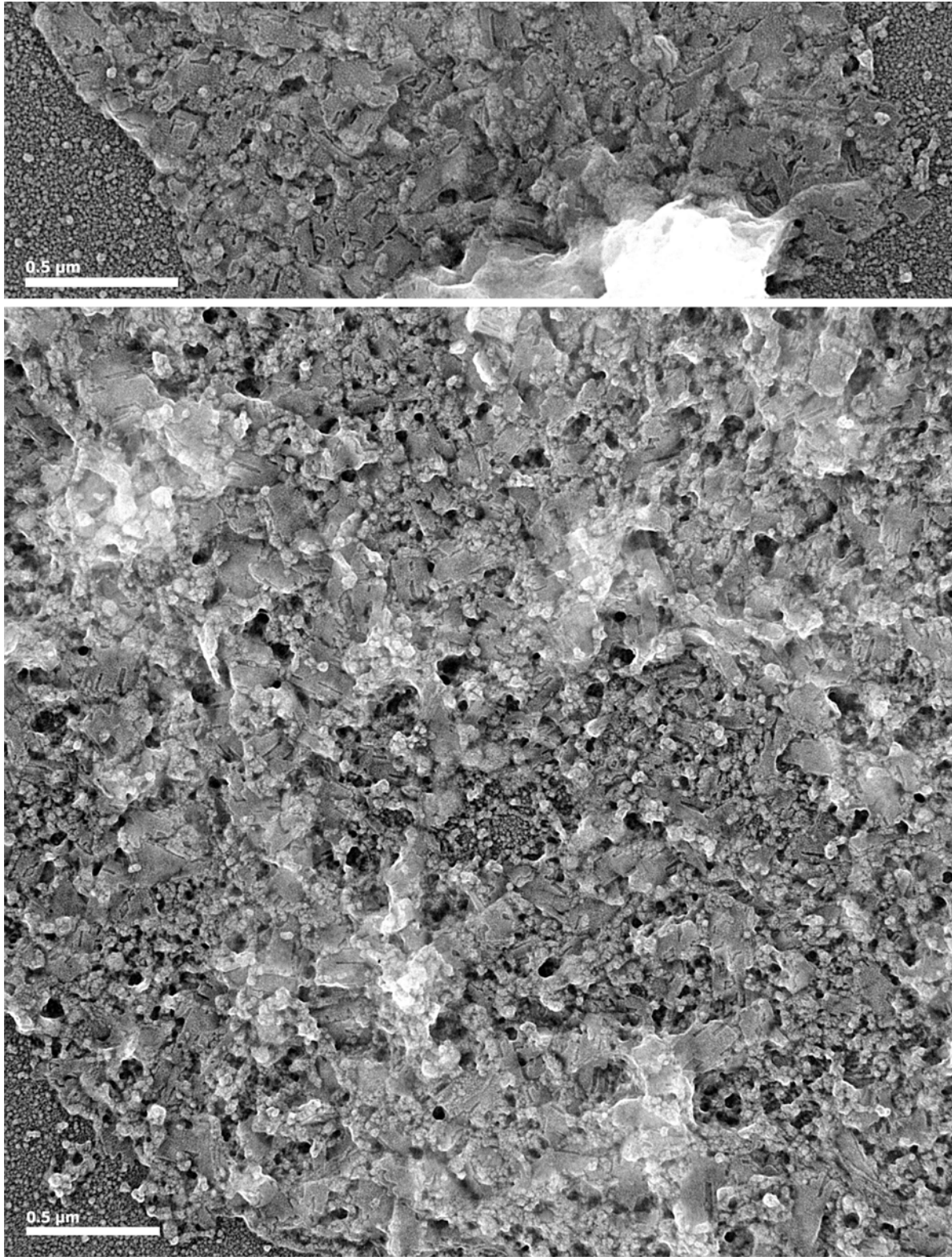


Figura 3.39. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió de plaques obtingudes per associació de fragments de cromatina metafàsica dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 2 mM $MgCl_2$ durant 6 h a 4°C.

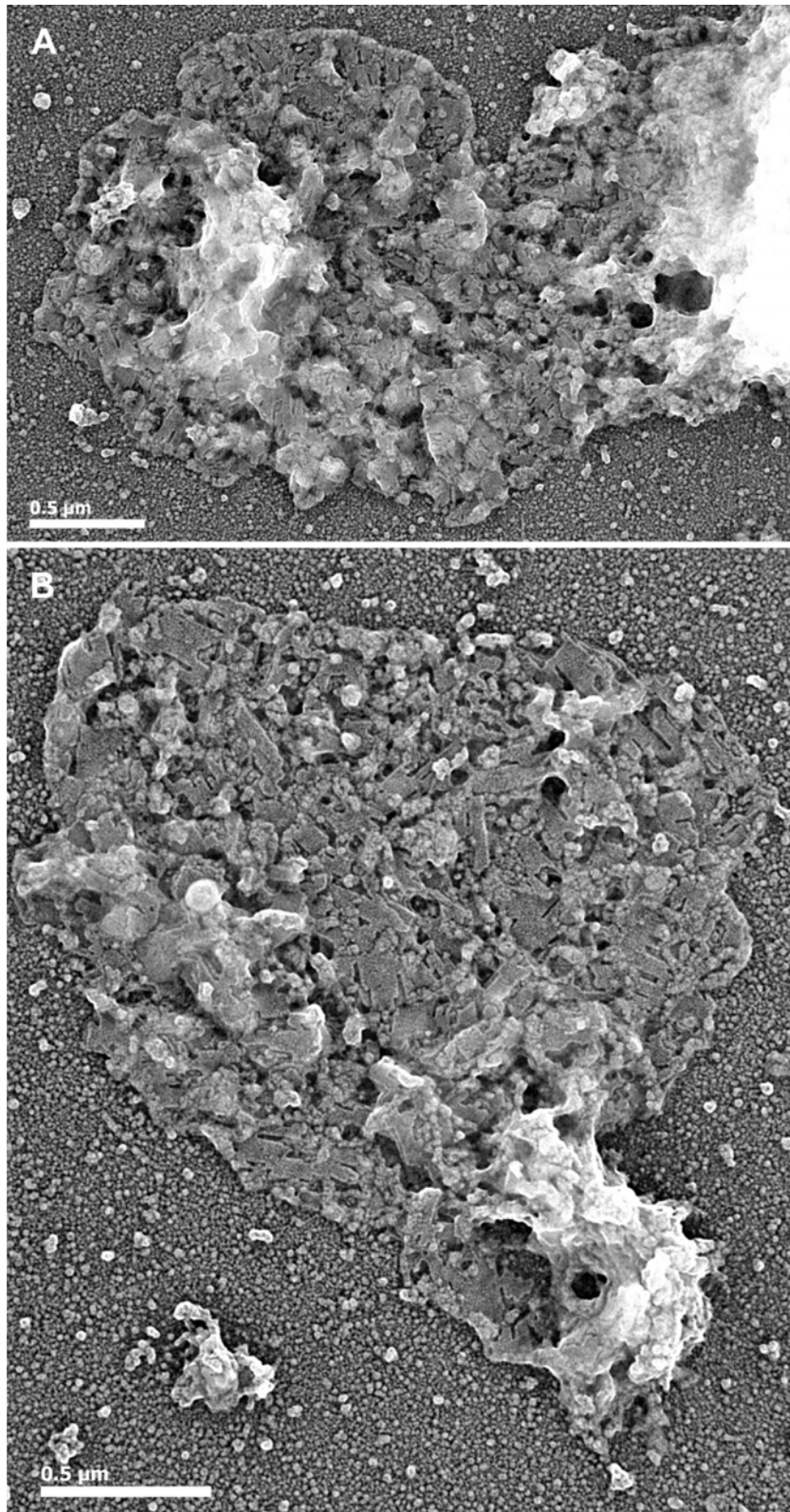


Figura 3.40. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió d'estructures laminars observades després de la diàlisi dels fragments de cromatina metafàsica amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl i diverses concentracions de $MgCl_2$, durant 6 h a $4^\circ C$. (A) 3 mM $MgCl_2$; (B) 4 mM $MgCl_2$.

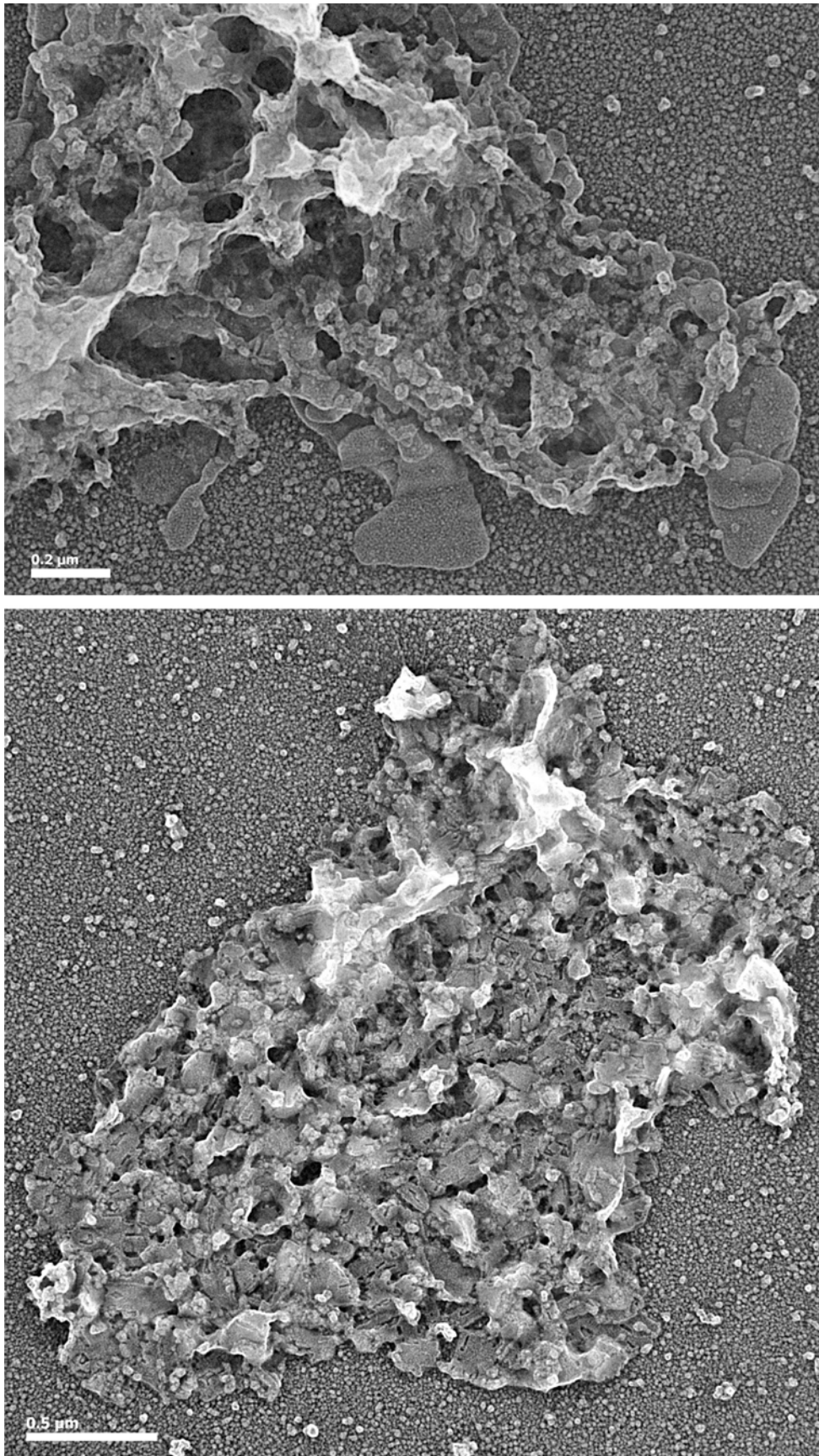


Figura 3.41. Imatges de microscòpia electrònica de transmissió d'estructures laminars observades després de la diàlisi dels fragments de cromatina metafàsica amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 5 mM MgCl₂, durant 6 h a 4°C.

Per altra banda, també es va estudiar si es formaven plaques a l'afegir CaCl_2 al tampó 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 17 mM MgCl_2 . Tal com s'observa a les figures 3.42-3.45, en presència de concentracions significatives de CaCl_2 (12.5 i 25 mM), es segueixen formant estructures laminars a partir dels fragments de cromatina obtinguts a partir de la digestió de cromosomes metafàsics amb nucleasa micrococcal.

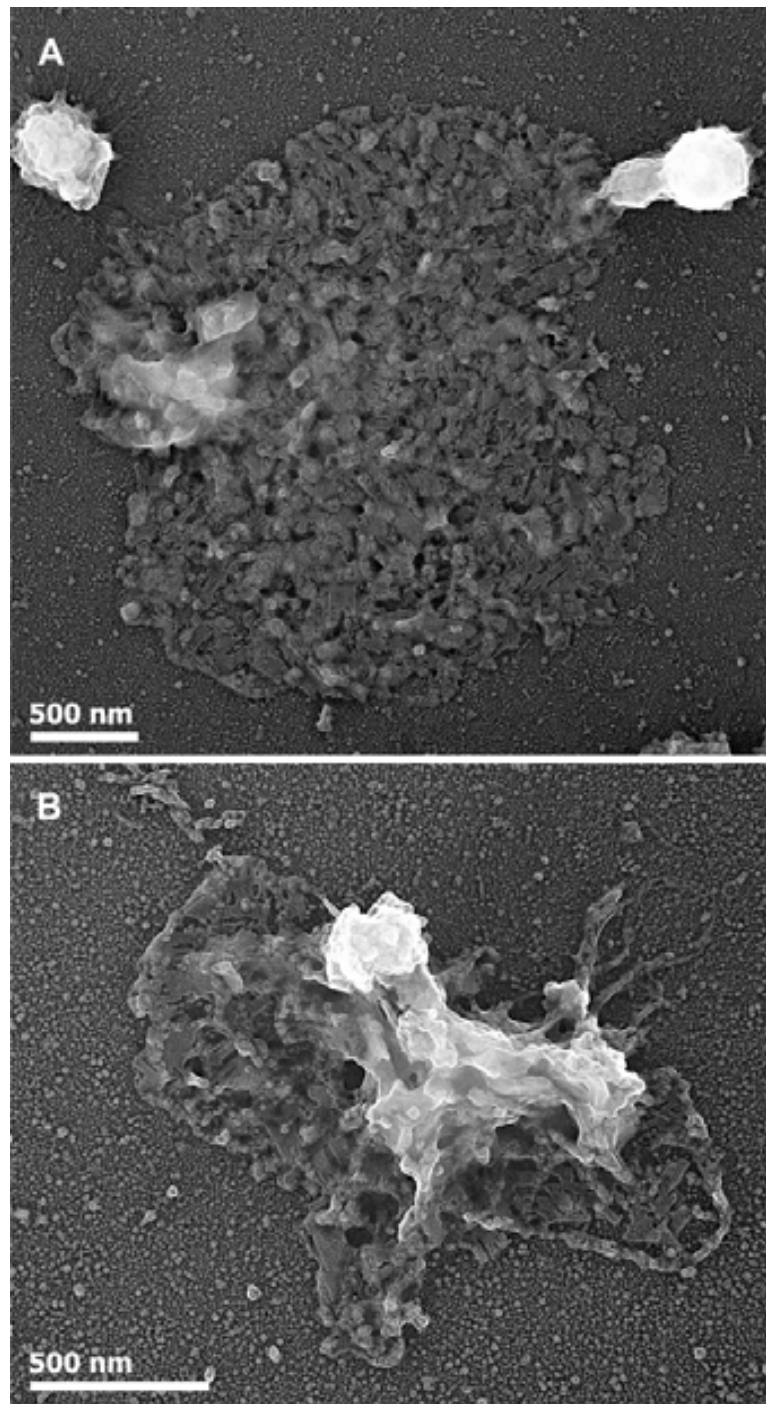


Figura 3.42. Plaques obtingudes a partir de l'associació de fragment de cromatina obtinguts per digestió amb nucleasa micrococcal 1:100 (15 min) de cromosomes metafàsics i de la posterior diàlisi amb 10 mM Pipes pH 7.2, 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl_2 i de concentracions creixents de CaCl_2 : (A) 2.5 mM CaCl_2 , (B) 7.5 mM CaCl_2 .

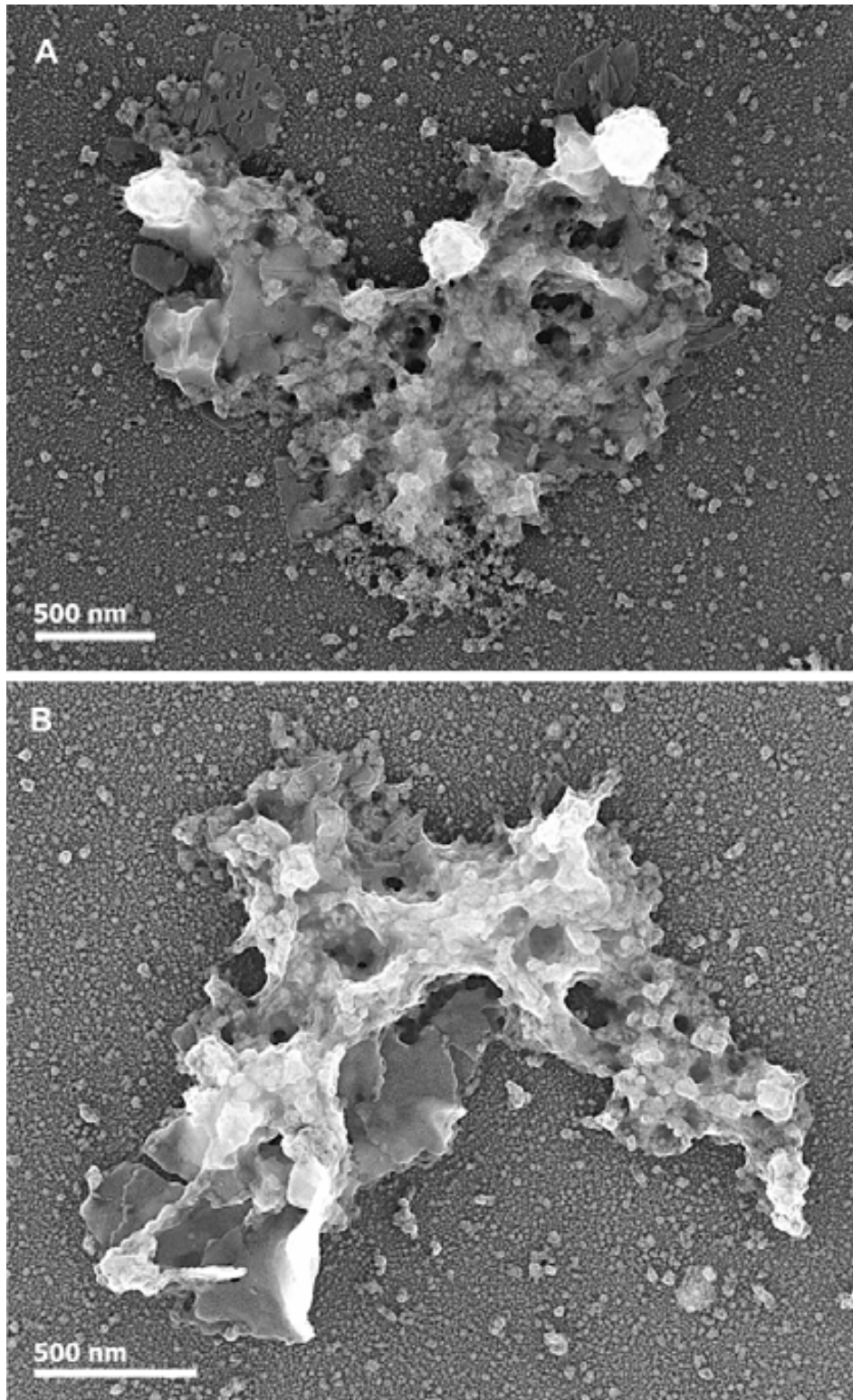


Figura 3.43. Plaques en mostres de fragments de cromatina metafàsica dialitzats durant 5 h a 4°C amb de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl, 17 mM MgCl₂ i concentracions creixents de CaCl₂: (A) 12.5 mM CaCl₂, (B) 25 mM CaCl₂.

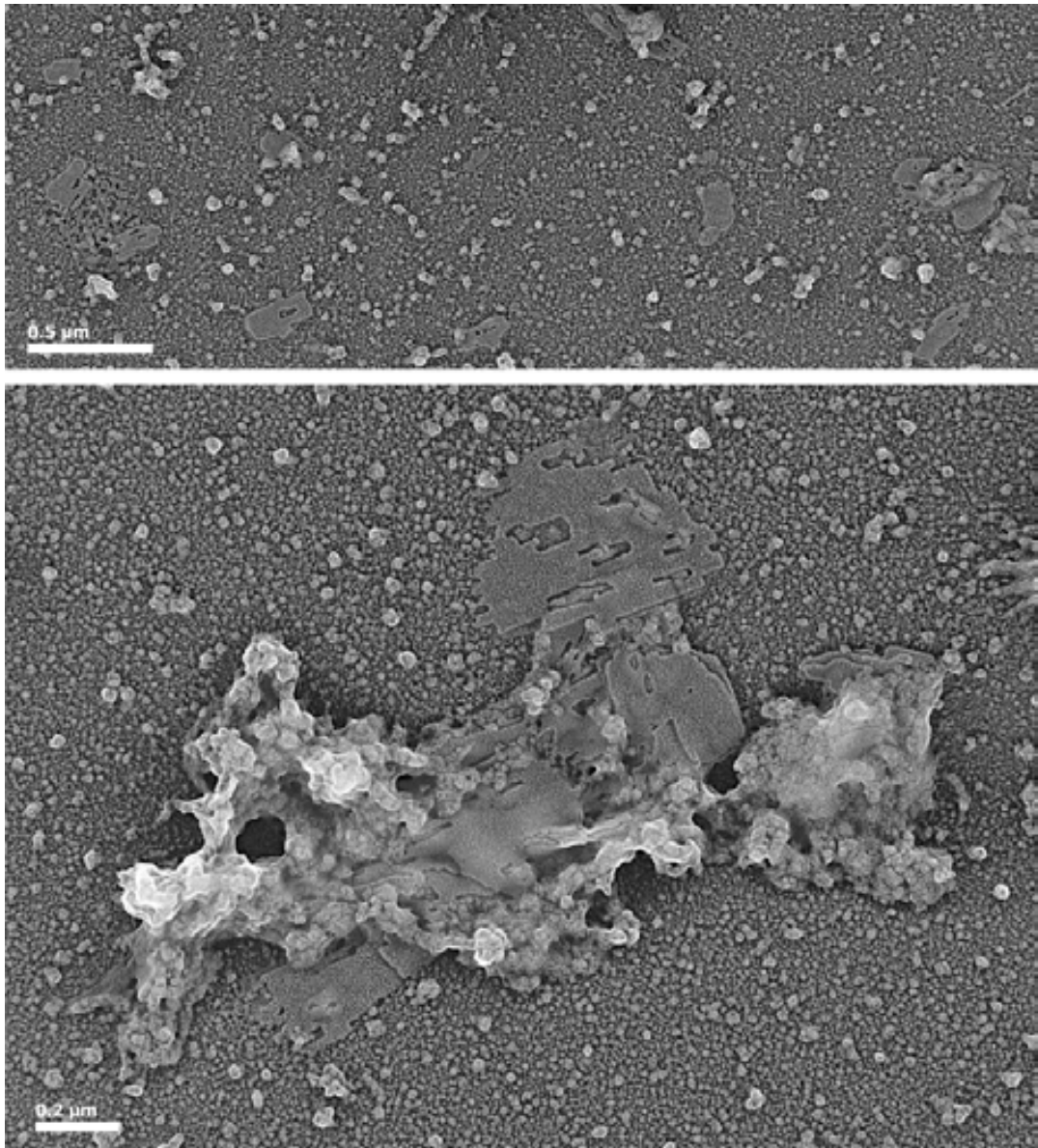


Figura 3.44. Plaques en mostres de fragments de cromatina metafàsica dialitzats durant 6 h a 4°C amb de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl, 17 mM MgCl₂ i 12.5 mM CaCl₂.

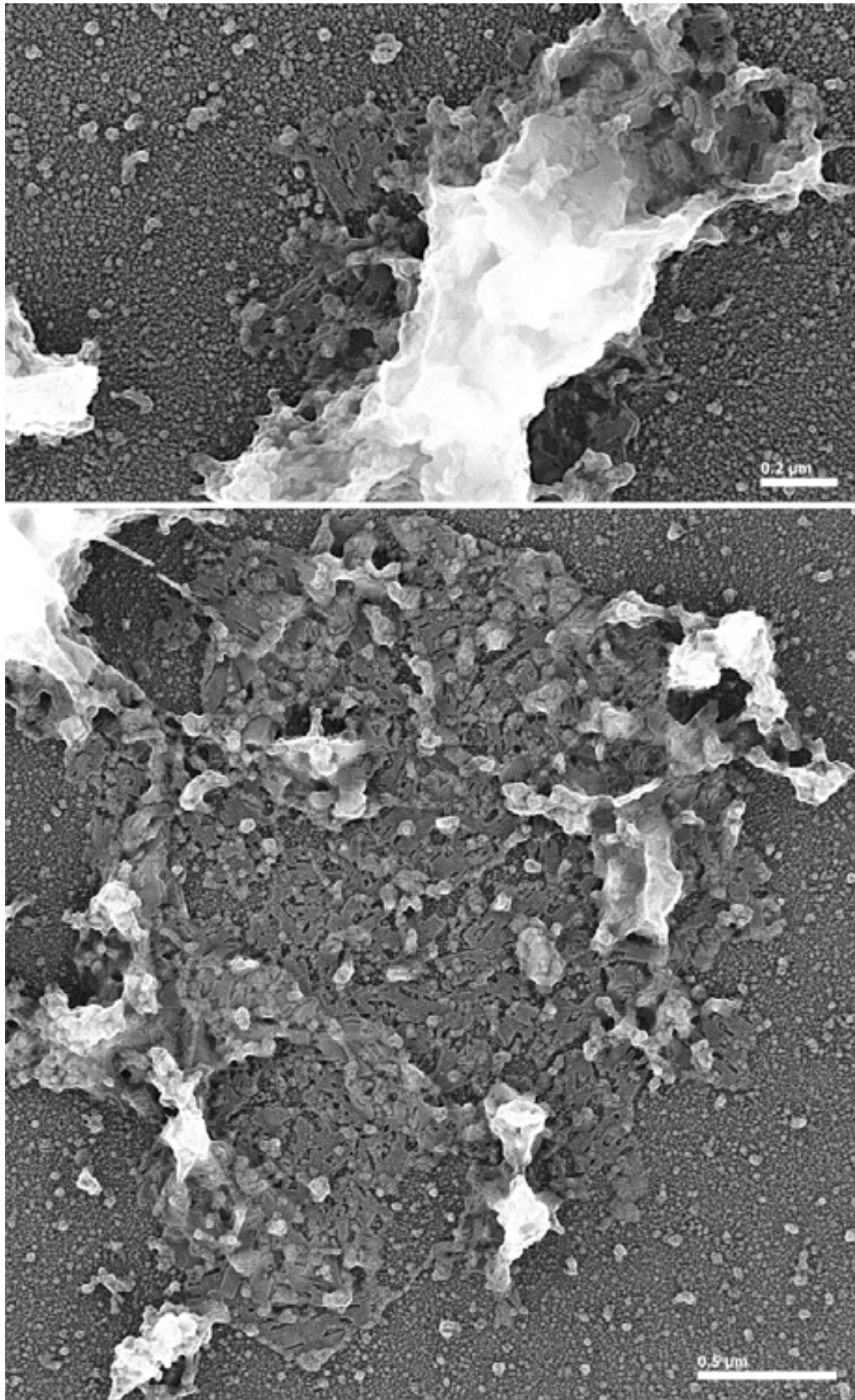


Figura 3.45. Plaques en mostres de fragments de cromatina metafàsica dialitzats durant 6 h a 4°C amb de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl, 17 mM MgCl₂ i 25 mM CaCl₂.

3.3.4. Associació de fragments de cromatina de longitud definida.

En altres experiments, es va estudiar el procés d'associació de fragments de cromatina metafàsica purificats en gels electroforètics d'agarosa i dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 17 mM MgCl₂ durant 5 hores a 4°C. Es va analitzar l'associació de fragments de mida diferent. En tots els casos, els resultats obtinguts van indicar que es formaven plaques a partir de fragments de cromatina purificats. A les figures 3.47 i 3.48 es poden veure exemples de les plaques generades per autoassociació.

A més, també es va observar que sobre aquestes plaques generades per autoassociació apareixien cossos circular de mida inferior a la dels cossos circulars de 30 nm. Cal destacar que sobre les plaques tan sols apareixien aquest tipus de cossos, mentre que a les rodalies i als marges de les estructures laminars, s'observaven cossos circulars de 30 nm. A la figura 3.49 es poden veure en detall cossos petits sobre plaques obtingudes a partir de la diàlisi de fragments de baix pes molecular (0.4-1.3 kbp de longitud) en presència de medi estructurant. A partir de l'anàlisi mitjançant microscòpia electrònica de transmissió, s'ha vist que el diàmetre d'aquests fragments és de 10 a 19 nm (figura 3.46).

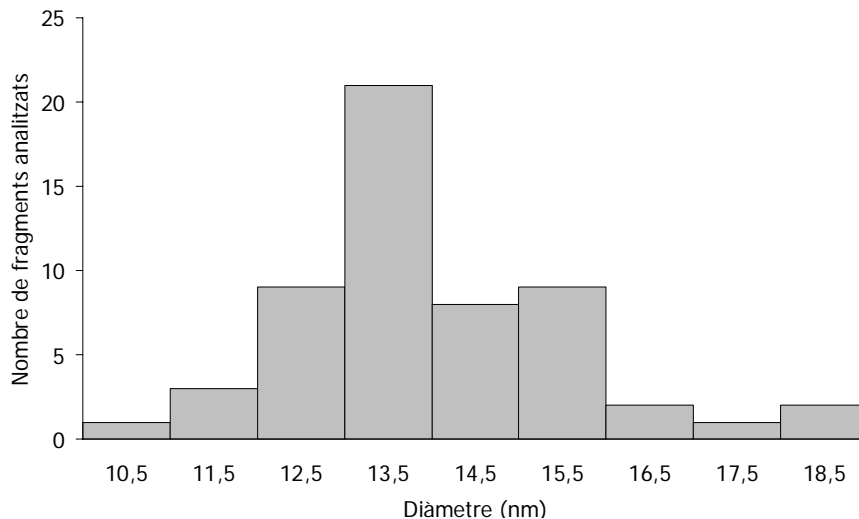


Figura 3.46. Histograma de la distribució de diàmetres obtinguts mitjançant TEM dels fragments de cromatina observats sobre plaques de mostres platinades rotacionalment.

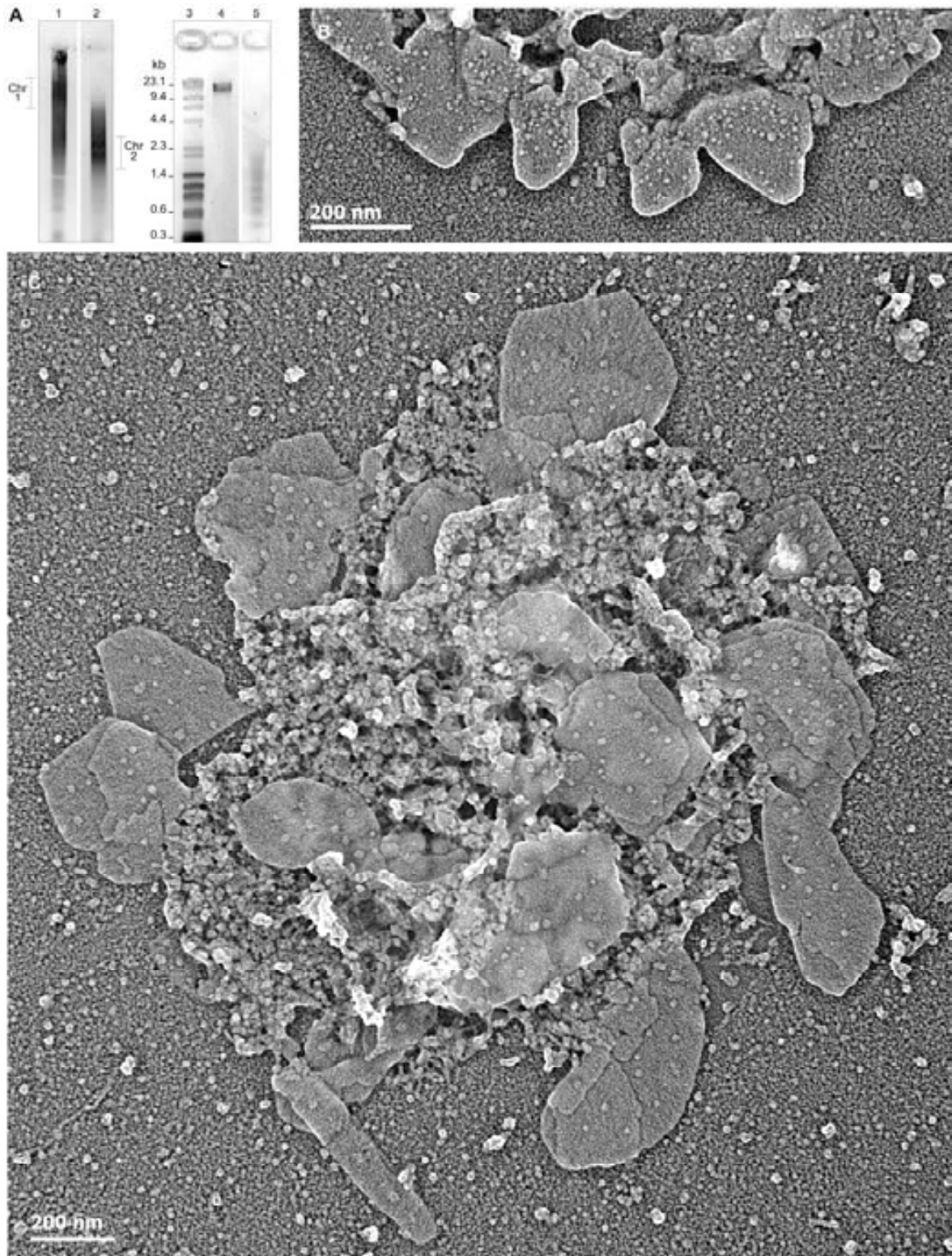


Figura 3.47. (A) Gels d'electroforesi no desnaturalitzants al 0.5% agarosa per separar fragments de cromatina (esquerra) i gel al 0.7% agarosa amb 0.05% SDS per analitzar el DNA (dreta). Chr 1 i Chr 2 indiquen les bandes seleccionades per als experiments d'associació. (B) i (C) Imatges de microscòpia electrònica de plaques generades per autoassociació de fragments de cromatina d'aproximadament 18 kbp (B) i 6.3-9.4 kbp (C) de longitud procedents de cromosomes metafàsics dialitzats 5 h a 4°C amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 17 mM MgCl₂.

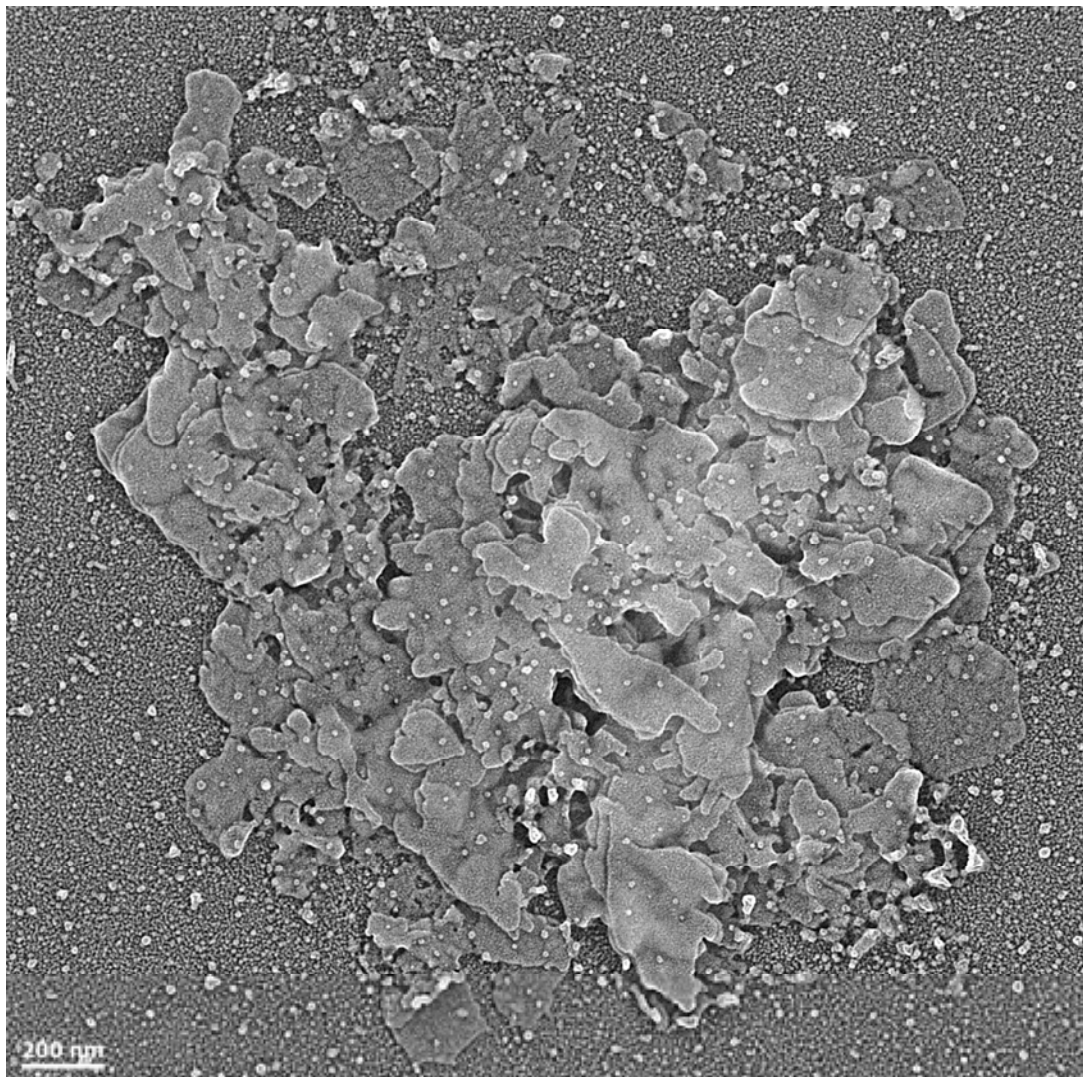


Figura 3.48. Imatges de plaques generades per autoassociació de fragments de cromatina de 0.4-1.3 kbp de longitud procedents de cromosomes metafàsics dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 17 mM $MgCl_2$ durant 5.5 h a 4°C.

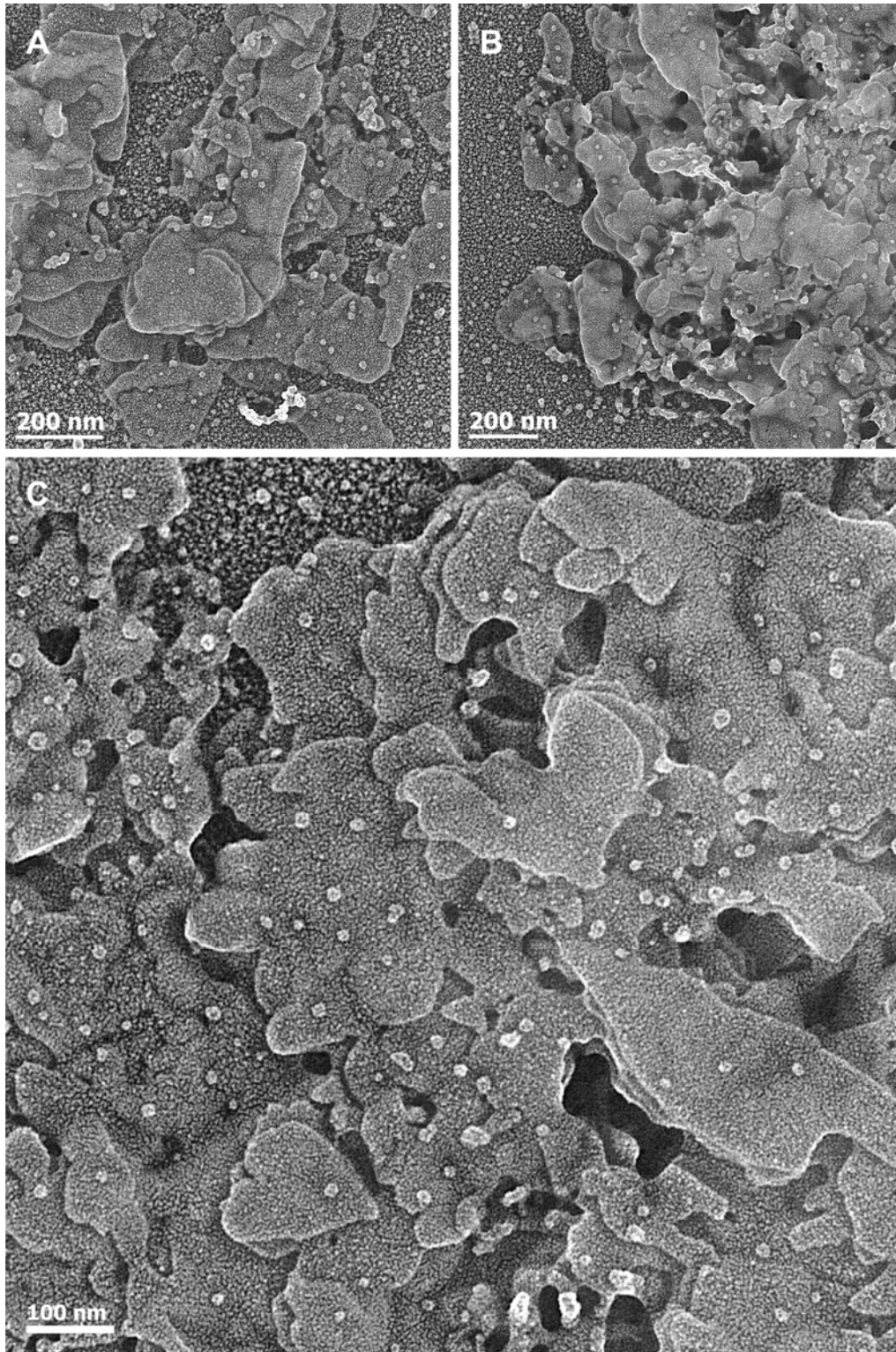


Figura 3.49. Cossos circulars dipositats sobre les plaques de cromatina generades per l'autoassociació de fragments de cromatina de 0.4-1.3 kbp de longitud dialitzats amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ durant 5.5 h a 4°C. (C) Detall del cossos circulars sobre plaques observats a la figura 3.48.

3.3.5. Estudi cinètic de la formació de plaques per autoassociació en condicions properes a la metafase.

Es va estudiar la formació d'agregats a diferents temps de diàlisi (1, 3, 5, 7, 9, 12 i 24 h) amb condicions estructurants [10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂] i a diferents temperatures (4, 25 i 37°C). Tal com es pot observar entre les figures 3.50-3.61, a temps curts d'incubació la mostra s'estructura formant cossos de 30 nm. A mida que augmenta el temps de diàlisi amb el medi estructurant, comencen a aparèixer estructures laminars. El temps en el qual apareixen les plaques varia segons la temperatura a la que es realitza la incubació. A 37°C es formen agregats laminars a temps inferiors que a la resta de temperatures (figures 3.58-3.61). A més, la temperatura pot influir en l'extensió de les estructures laminars: a més temperatura els agregats laminars ocupen una superfície més gran.

A més de les plaques típiques, s'ha observat l'aparició de plaques molt primes, poc distingibles de la cromatina no associada del fons (veure figura 3.50 i apartat 3.3.7). També s'han observat estructures laminars molt denses a temps llargs d'incubació, especialment quan la mostra és dialitzada a 25 i 37°C (veure figura 3.61 i apartat 3.3.8).

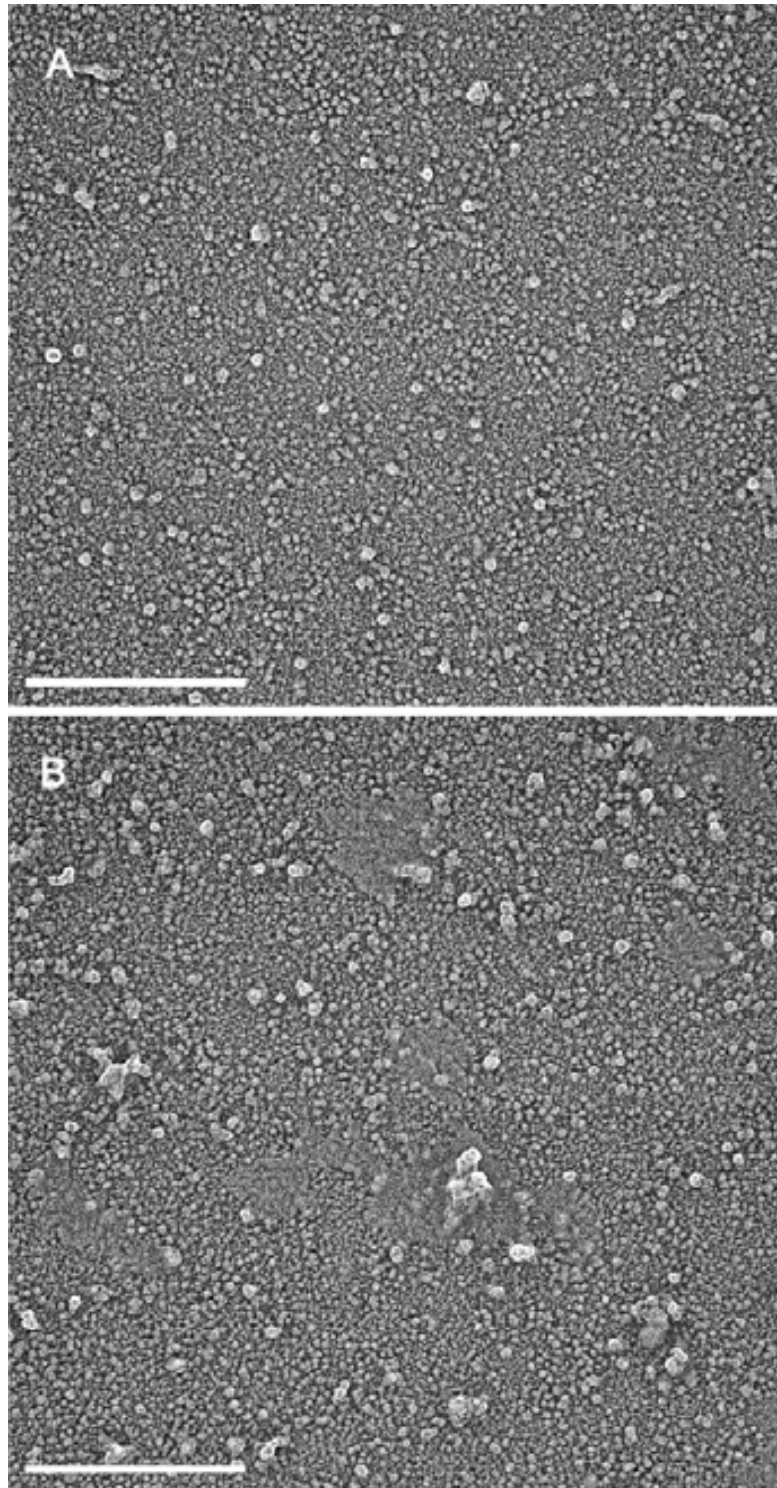


Figura 3.50. Fragments de cromatina de cromosomes metafàsics sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 4°C durant (A) 0 h, (B) 1 h. La barra equival a 500 nm.

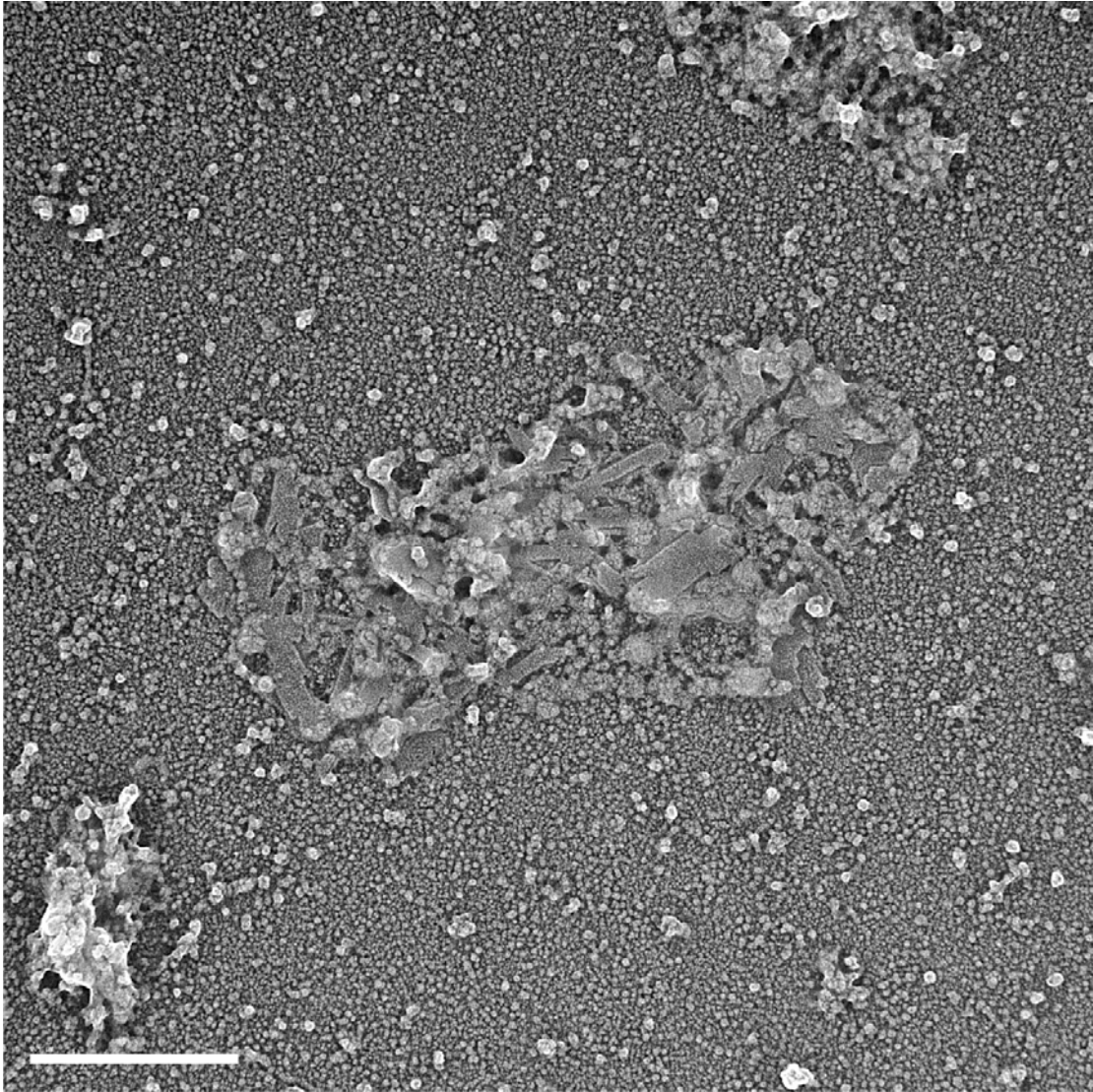


Figura 3.51. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 4°C durant 3 h. La barra equival a 500 nm.

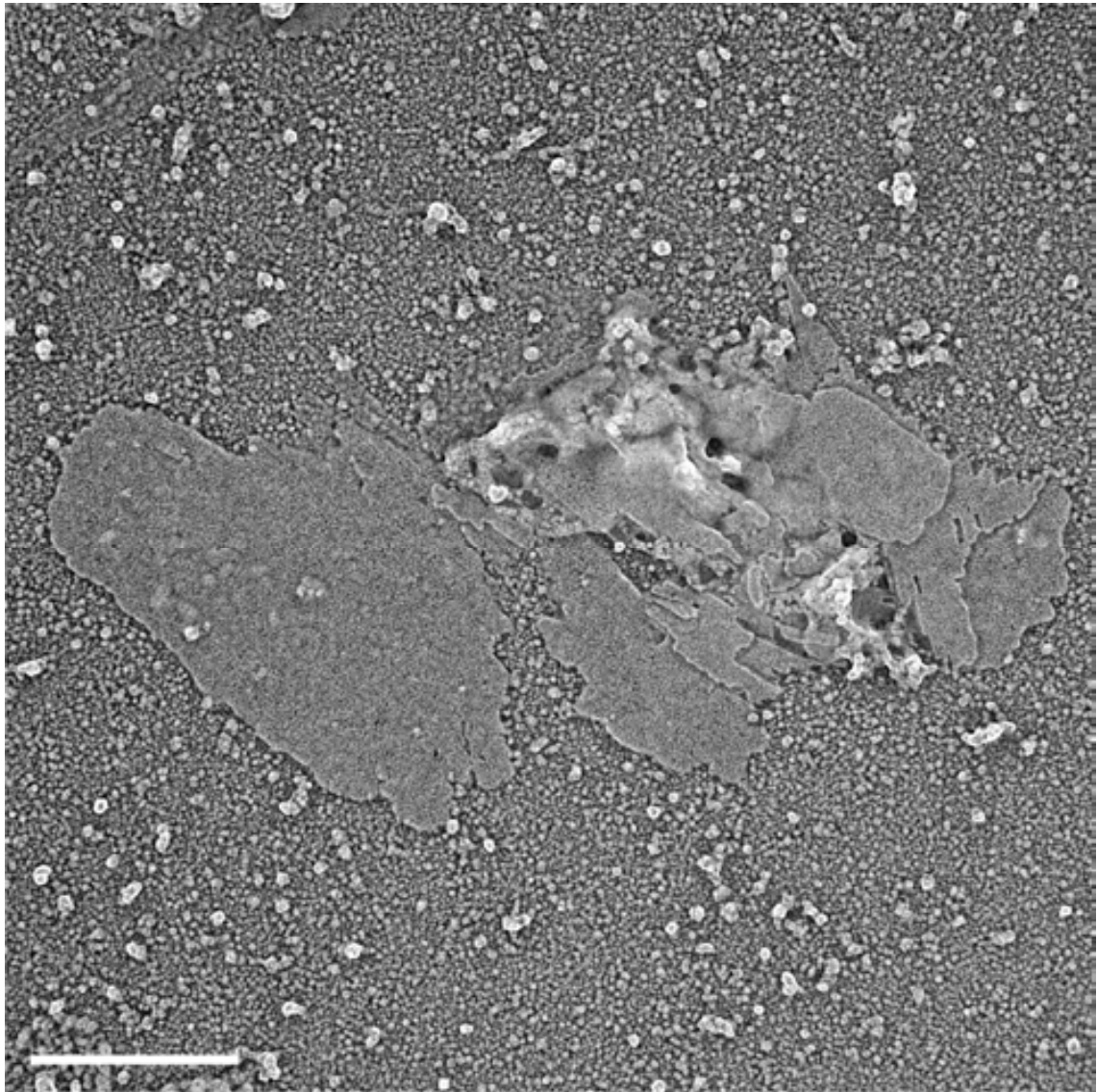


Figura 3.52. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 4°C durant 5 h. La barra equival a 500 nm.

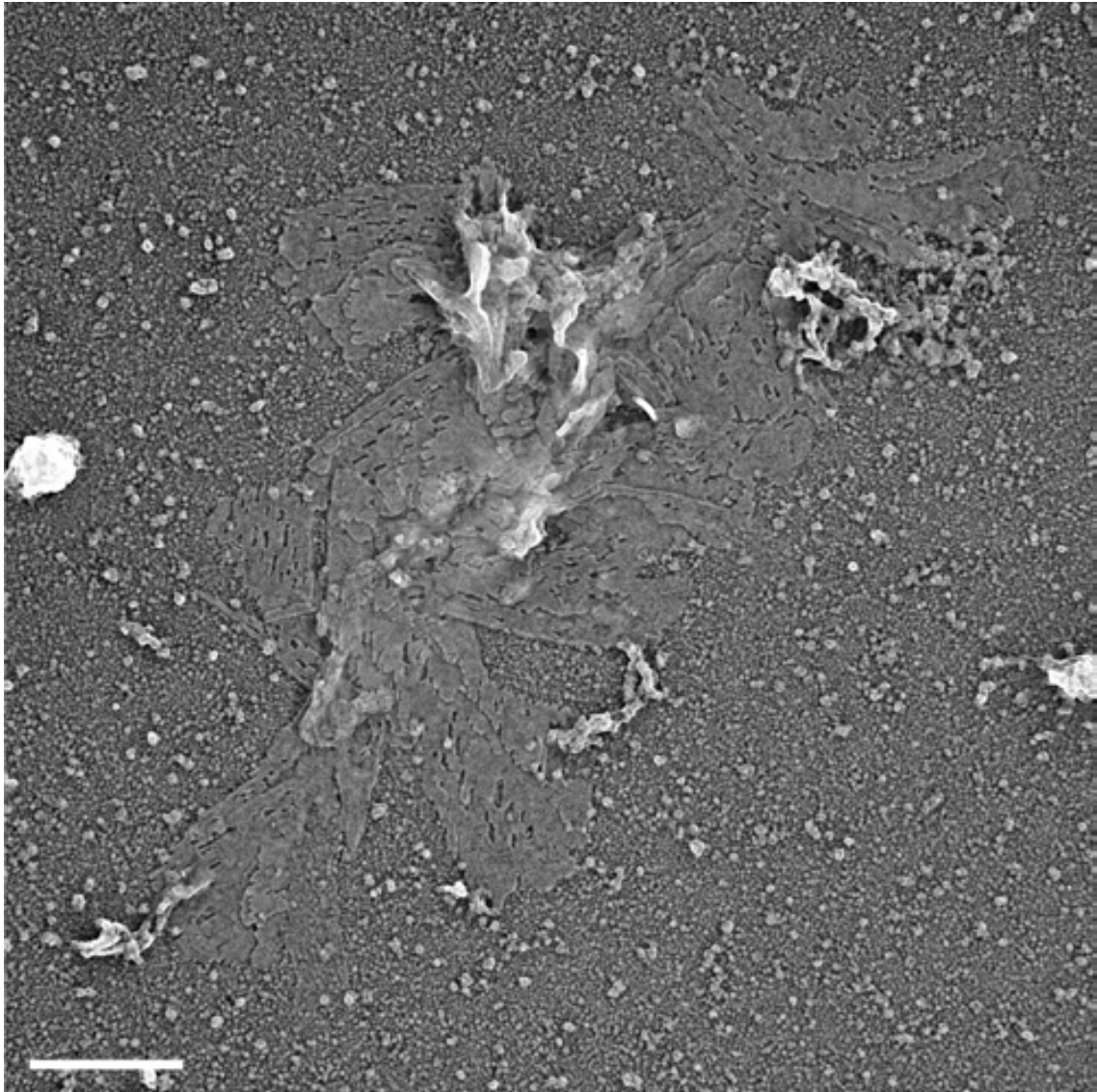


Figura 3.53. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 4°C durant 7 h. La barra equival a 500 nm.

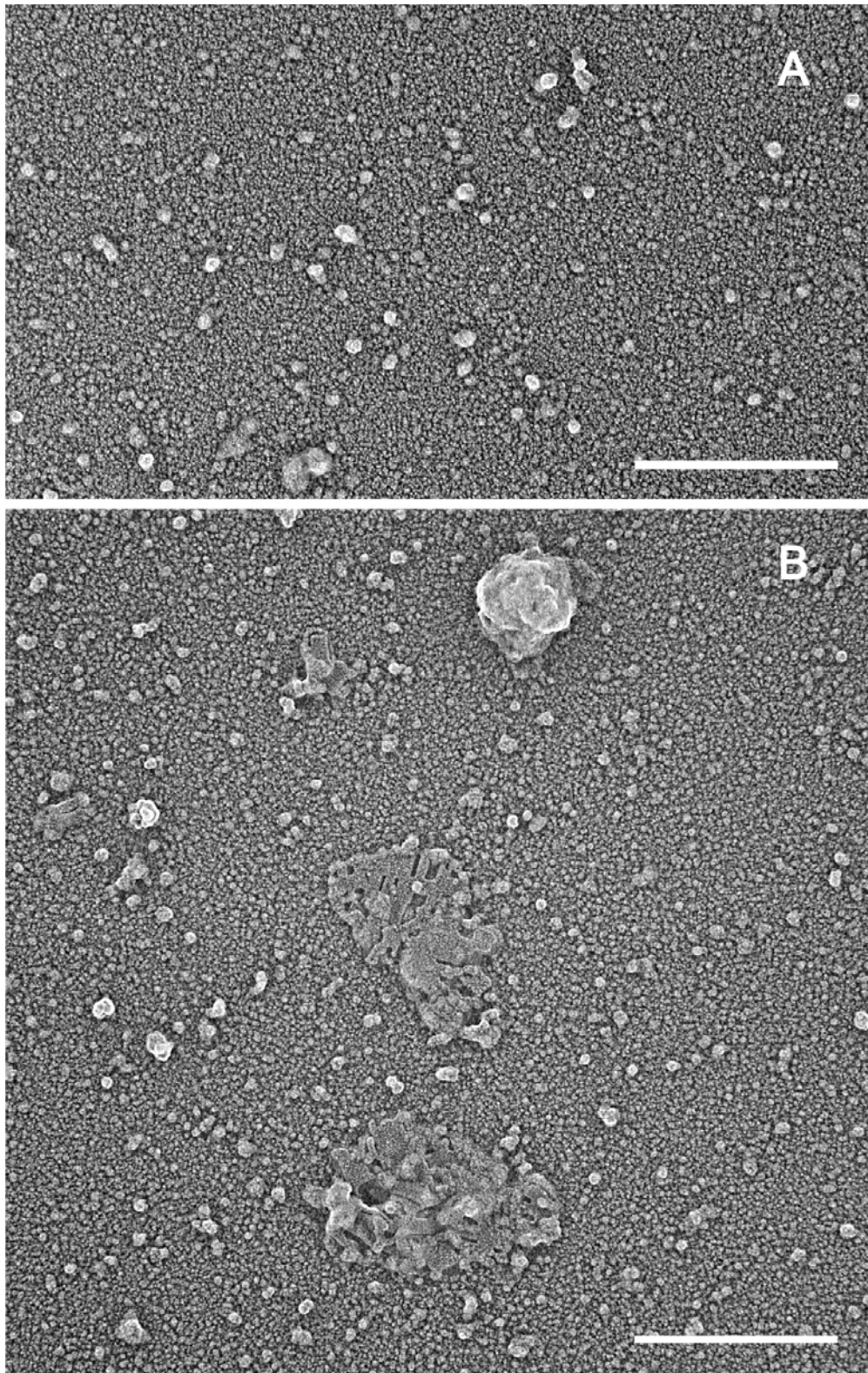


Figura 3.54. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ a 25°C durant (A) 0 h, (B) 1 h. La barra equival a 500 nm.

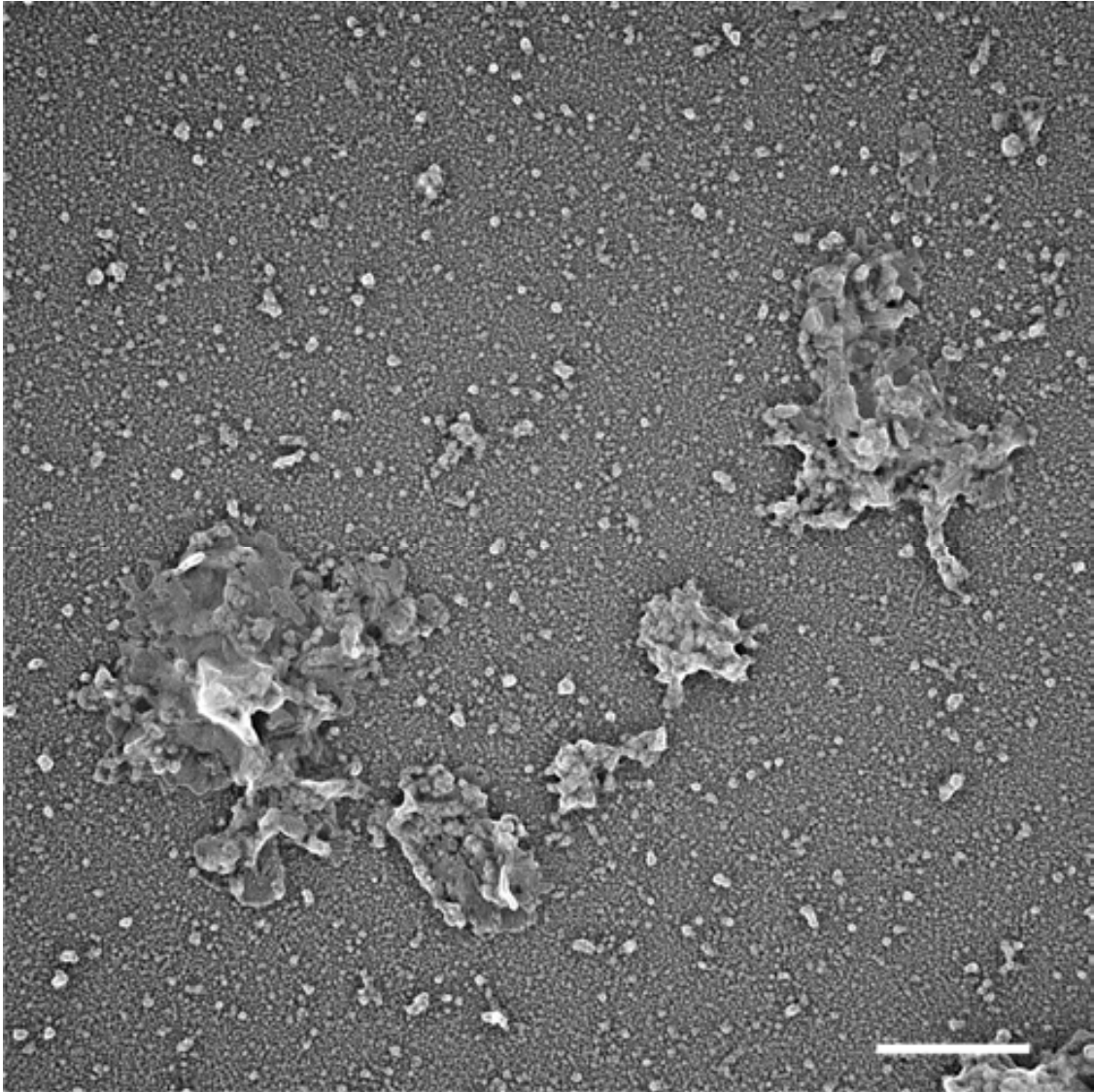


Figura 3.55. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 25°C durant 3 h. La barra equival a 500 nm.

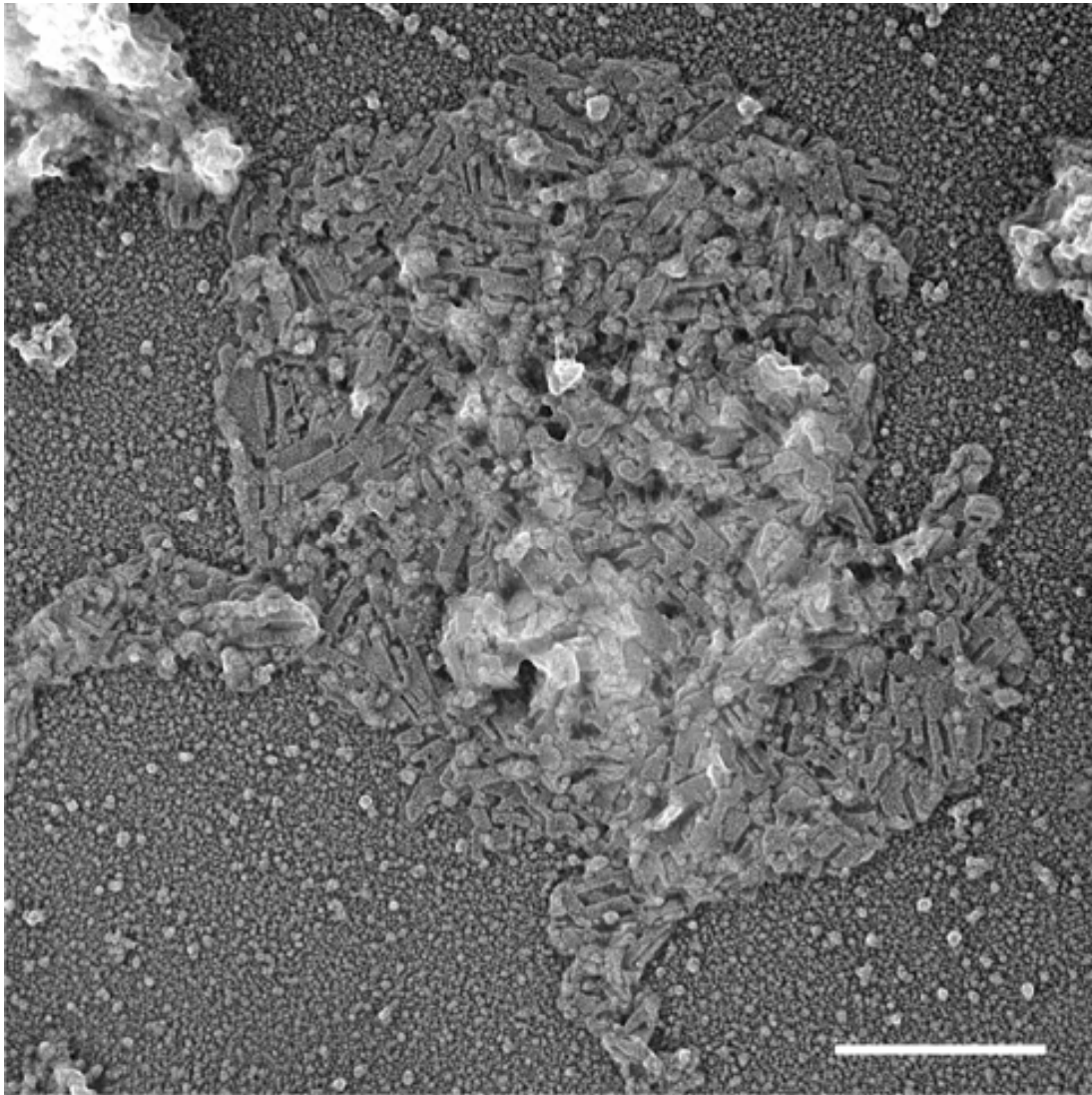


Figura 3.56. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ a 25°C durant 5 h. La barra equival a 500 nm.

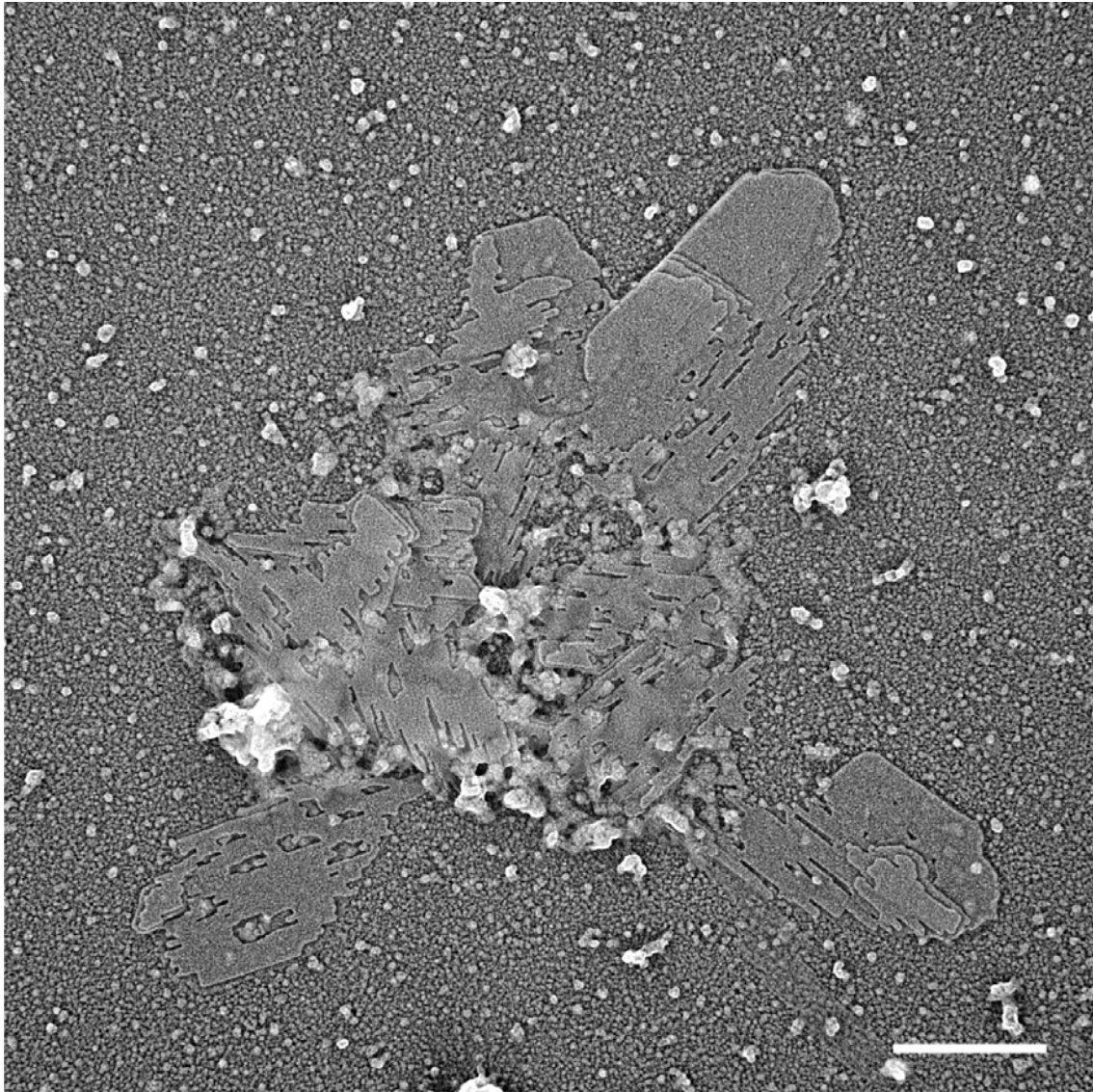


Figura 3.57. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 25°C durant 7 h. La barra equival a 500 nm.

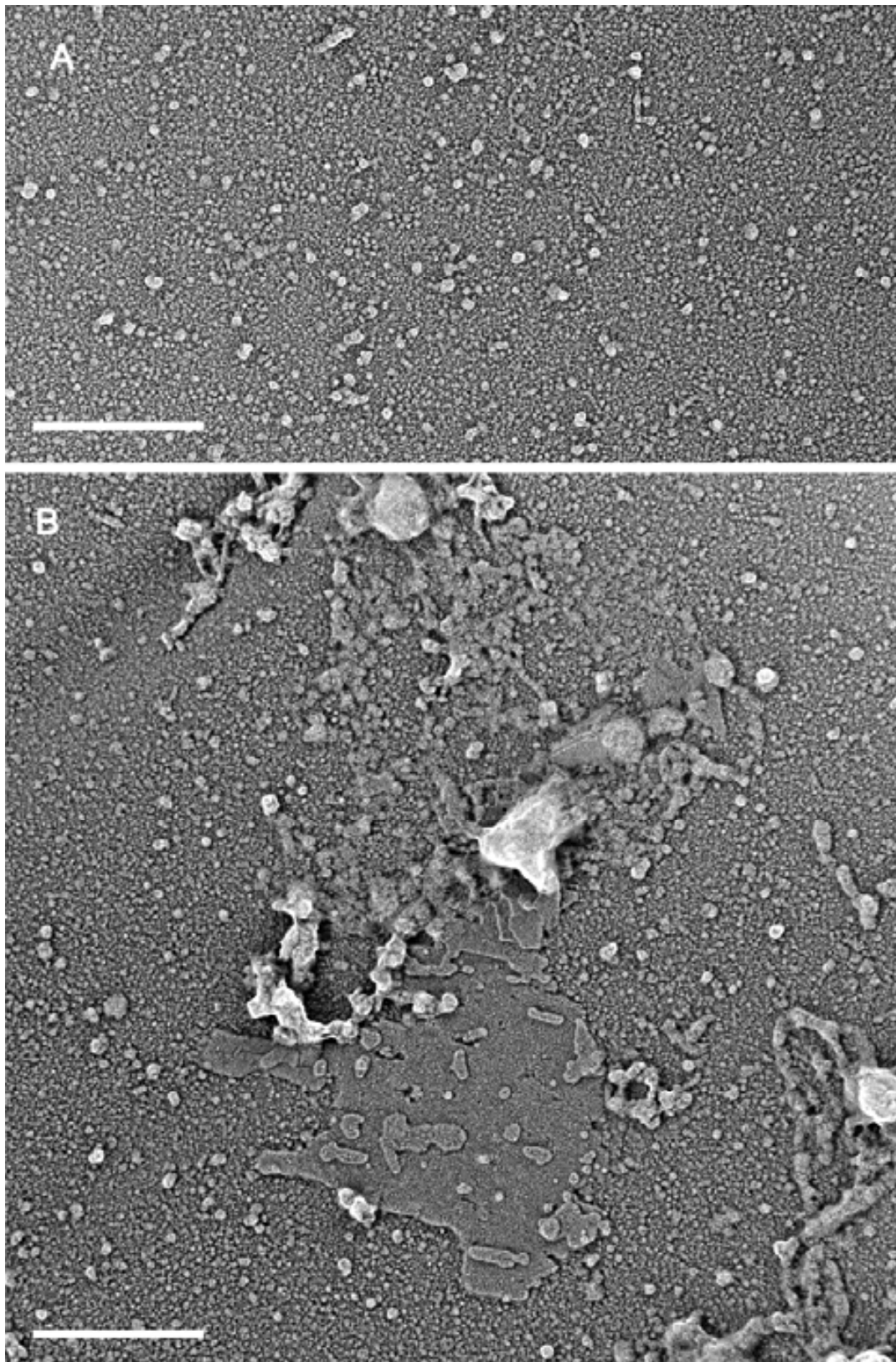


Figura 3.58. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 37°C durant (A) 0 h, (B) 1 h. La barra equival a 500 nm.

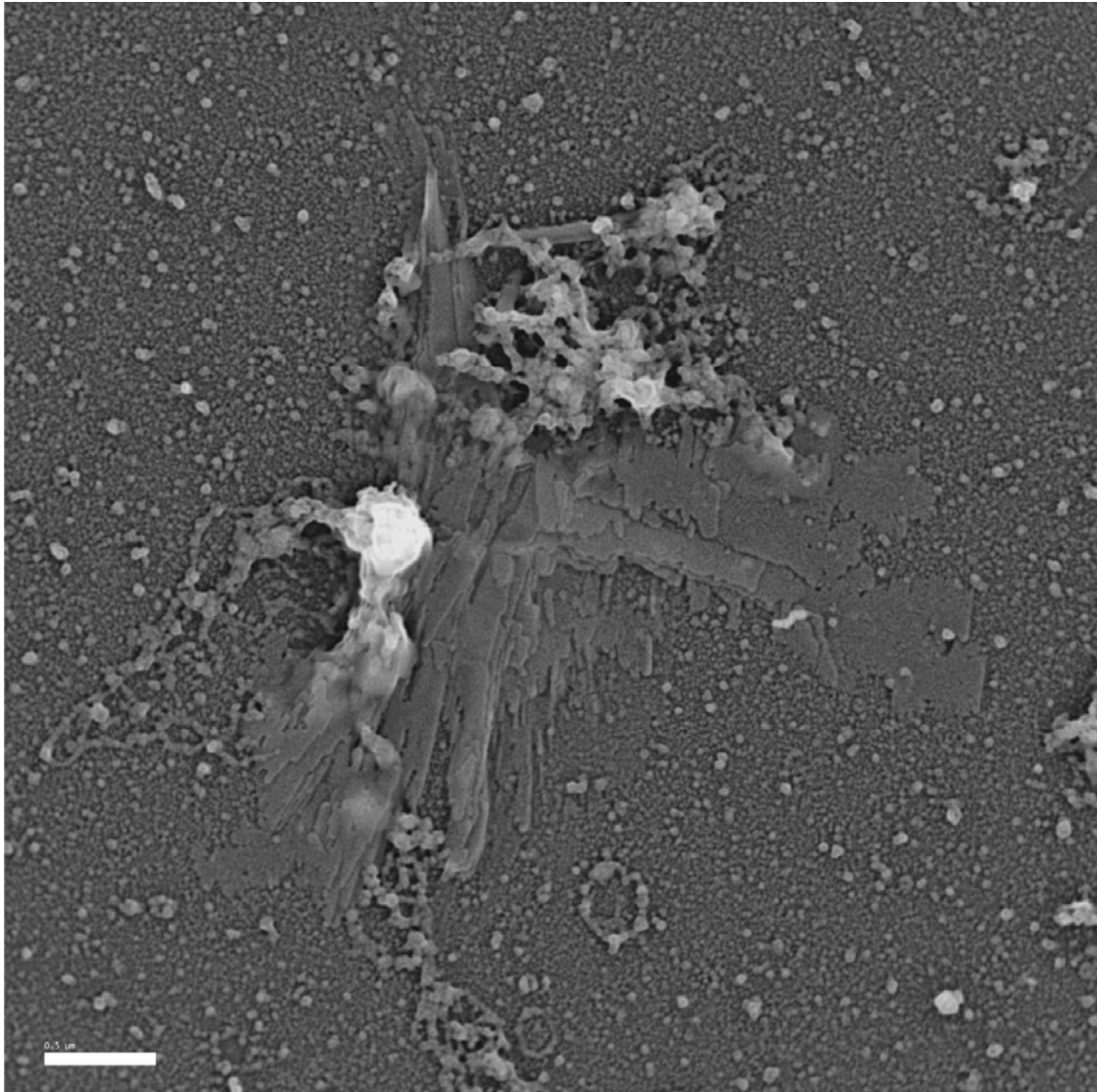


Figura 3.59. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 37°C durant 3 h. La barra equival a 500 nm.

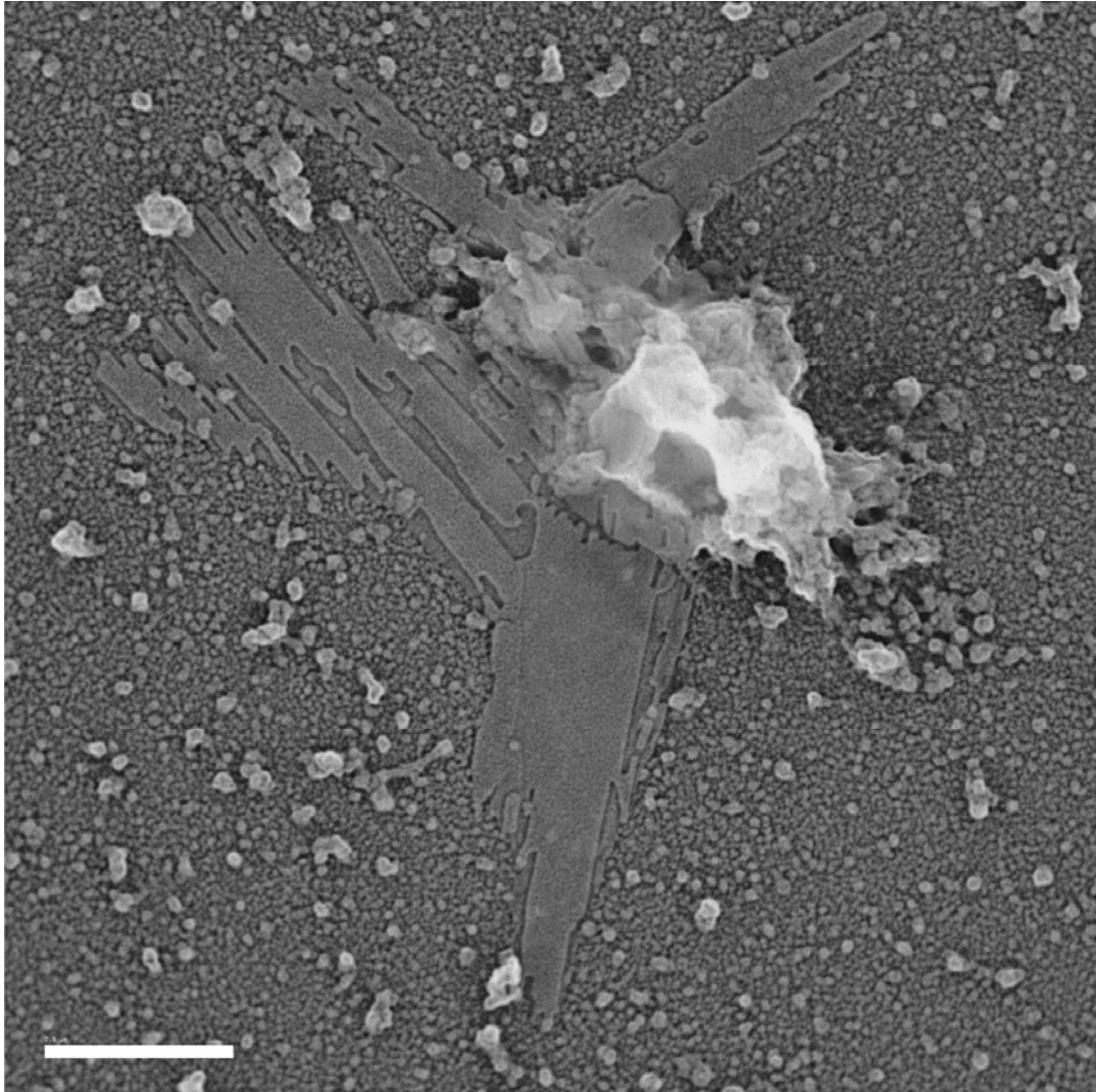


Figura 3.60. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 37°C durant 5 h. La barra equival a 500 nm.

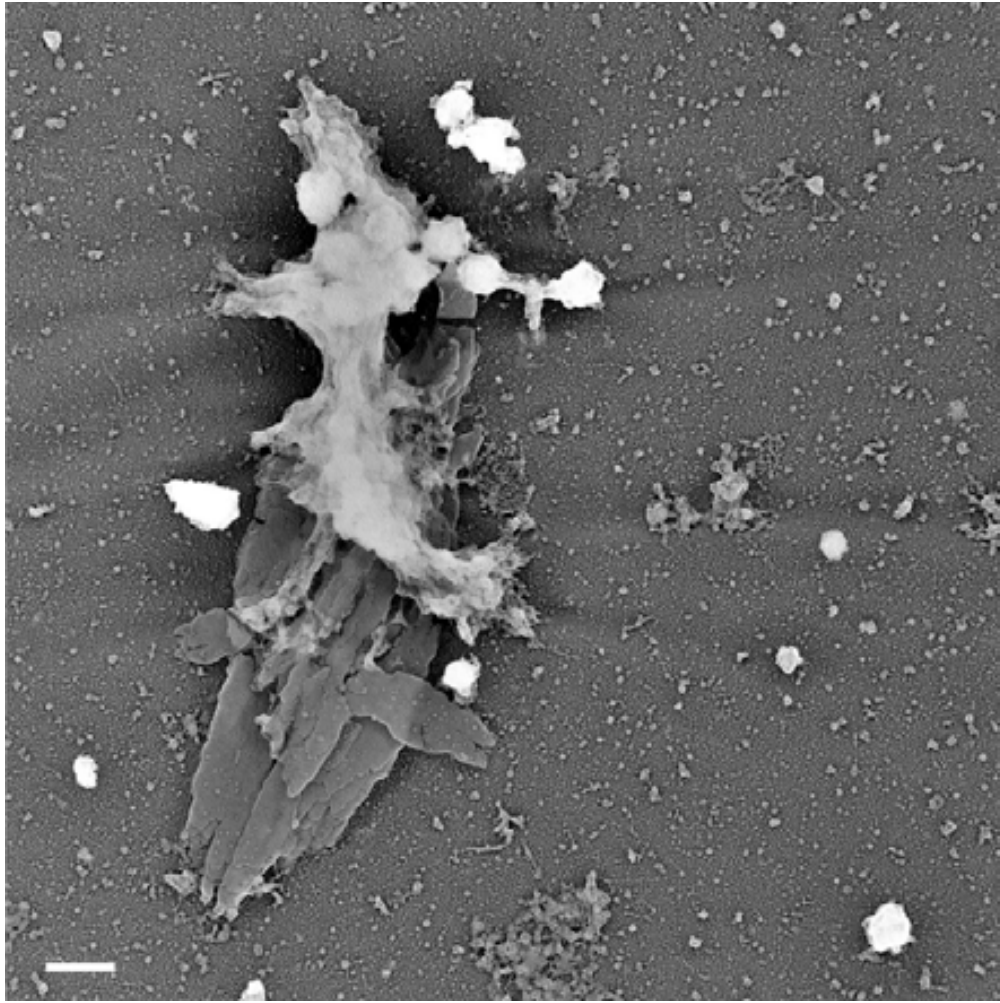


Figura 3.61. Fragments de cromatina sotmesos a una diàlisi amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ a 37°C durant 7 h. La barra equival a 500 nm.

3.3.6. Estudi de les característiques de les plaques formades per autoassociació: distribució d'alçades.

A partir de mostres platinades unidireccionalment (figura 3.62), es va determinar l'alçada de les plaques tal com s'ha descrit a l'apartat 2.13.

Es van analitzar aquelles plaques que presentaven una superfície uniforme i que estaven en contacte amb el film de carbó, per veure si l'alçada dels agregats laminars era similar a la de les plaques emanades de cromosomes parcialment desnaturalitzats. Els resultats presentats a la figura 3.63, indiquen que l'alçada de les plaques monocapa típiques observades en els experiments

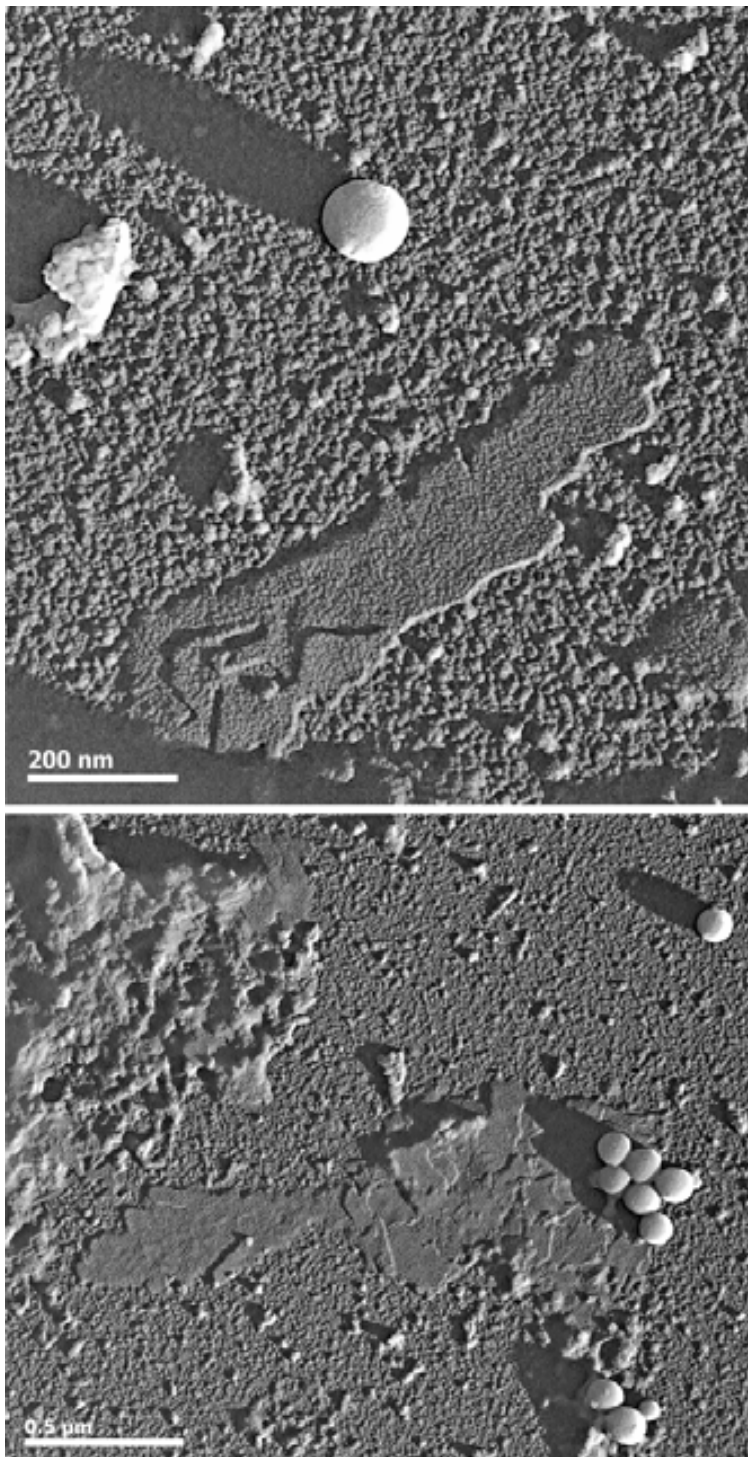
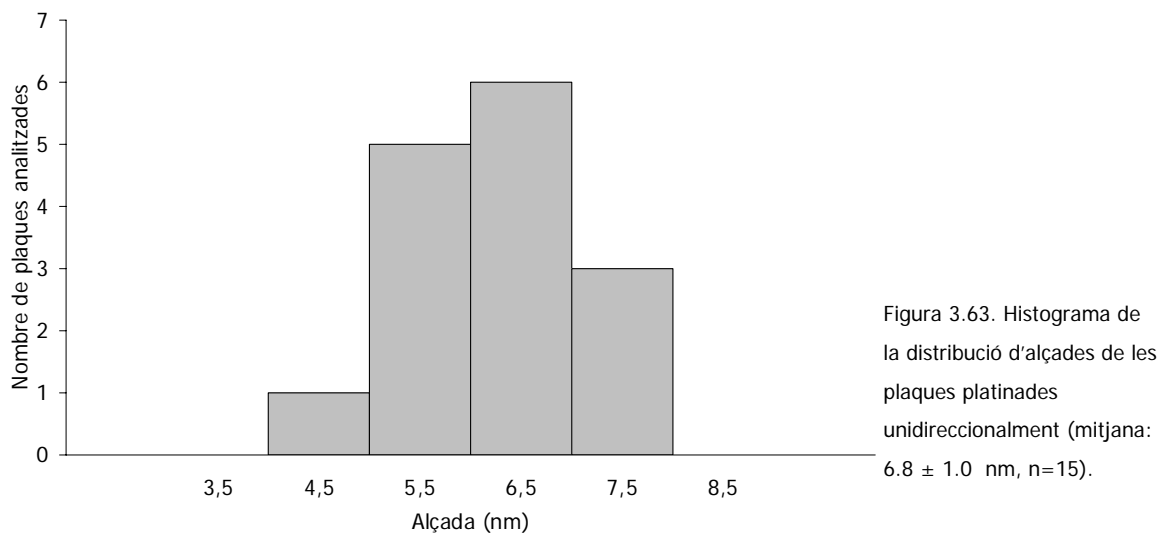


Figura 3.62.

Exemples de plaques platinades unidireccionalment. El material prové de l'associació de fragments de cromatina procedents de cromosomes metafàsics digerits amb nucleasa micrococcal purificats amb gels d'agarosa no desnaturalitzants i dialitzats durant 7 h amb 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM $MgCl_2$ amb el sistema Slide-A-Lyzer. Les boles de làtex es van emprar com a referència interna per determinar l'angle de platinació.

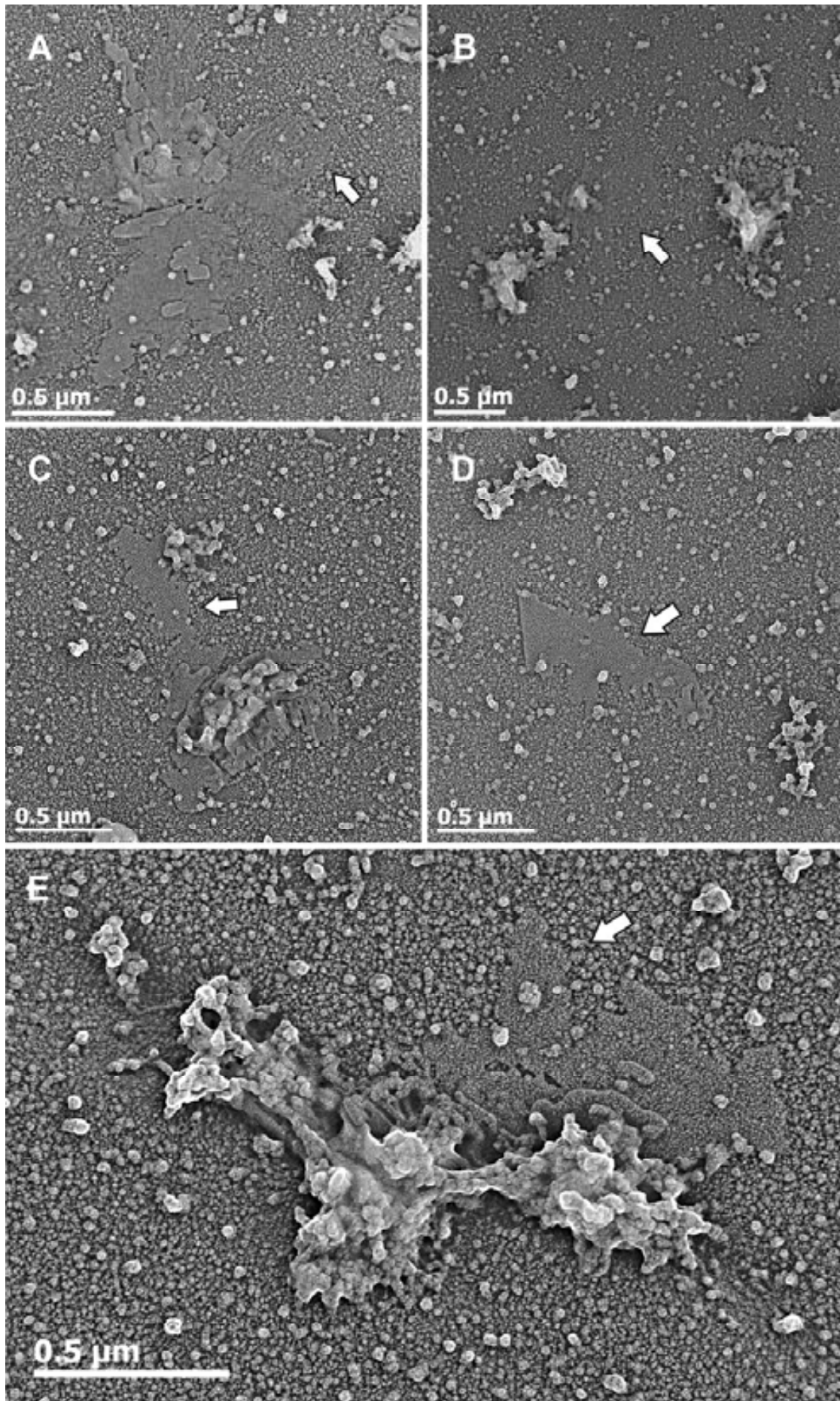
d'autoassociació és de 6.8 nm. Aquests resultats coincideixen amb els valors trobats anteriorment al nostre grup en la mesura d'alçades de plaques emanades directament de cromosomes (Caravaca, 2004; Gállego et al., 2009).



3.3.7. Estudi de plaques de gruix inferior.

Tal com s'ha indicat a l'apartat 3.3.5, es van observar plaques poc estructurades de gruix inferior a l'habitual que produeixen molt poca acumulació de platí en els seus marges. A la figura 3.64 es poden observar exemples d'aquestes estructures laminars.

Figura 3.64. (a la pàgina següent). Plaques més primes que les típiques (assenyalades amb fletxes blanques). Mostra obtinguda després de la diàlisi dels fragments de cromatina metafàsica en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 37°C durant 3 h (A i B) i 5 h (C – E).



Es va fer una anàlisi de la distribució de les alçades d'aquestes làmines a partir de mostres platinades unidireccionalment. Gràcies a la platinació unidireccional d'angle baix s'han pogut contrastar els marges d'aquest tipus de plaques de forma evident. A la figura 3.65, es poden observar exemples de plaques més primes que les típiques obtingudes a partir de l'associació de fragments de cromatina. L'alçada d'aquest tipus de placa és de 2.7 ± 0.9 nm ($n=6$). Aquest valor, que està molt per sota de l'alçada típica de les plaques, probablement és degut a que es tracta de làmines no completament estructurades, que estan enfonsades parcialment amb la cromatina de fons que hi ha a les preparacions.

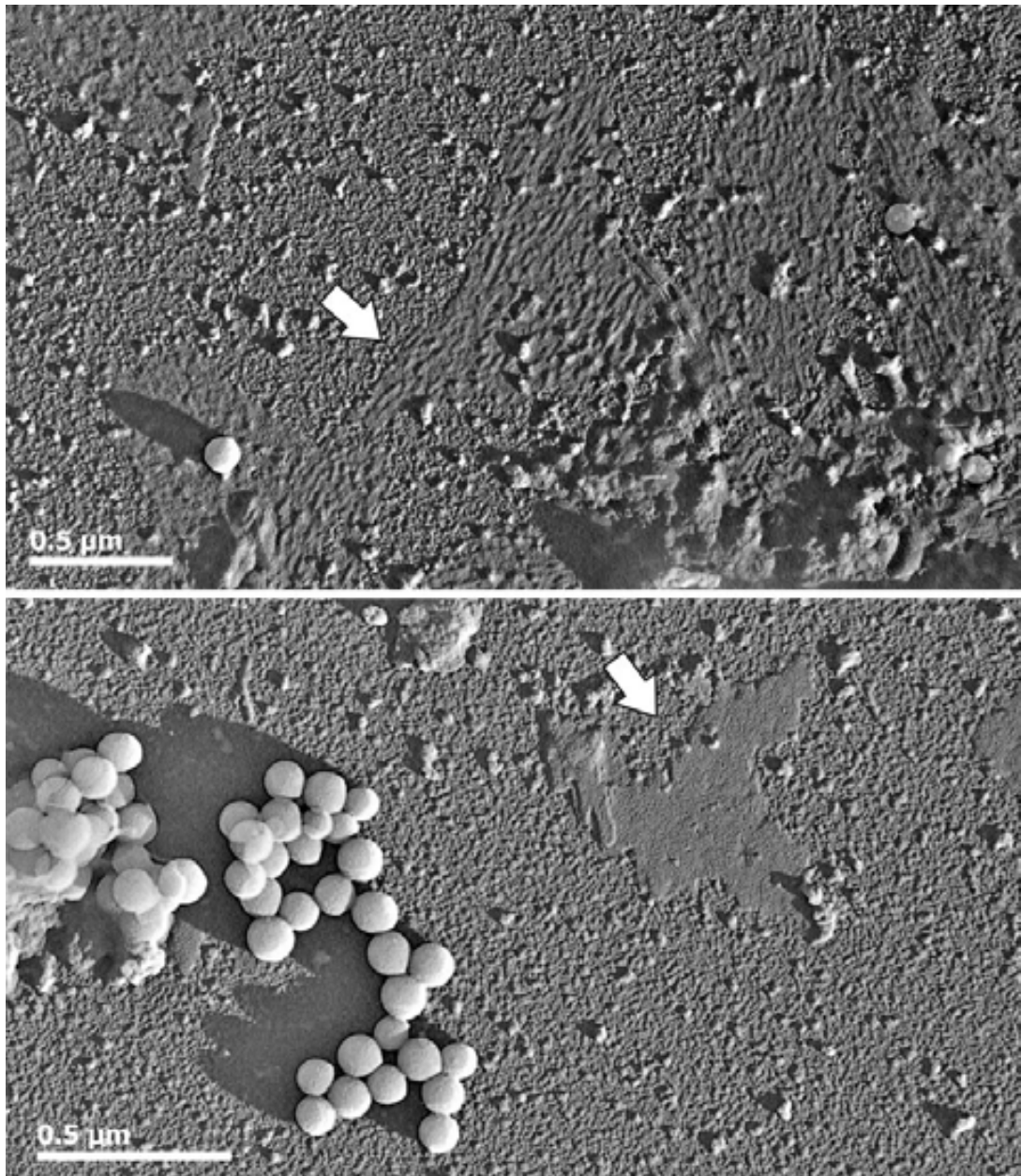


Figura 3.65. Plaques més primes que les típiques (indicades amb fletxes blanques). Mostra obtinguda després de la diàlisi dels fragments de cromatina metafàsica en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ a 37°C durant 7 h. L'addició de boles de làtex s'ha realitzat segons el protocol descrit a 2.13.2. Platinat unidireccional.

3.3.8. Estudi de plaques de gruix superior.

En alguns experiments (veure apartat 3.3.5) es van visualitzar plaques molt denses diferents a les típiques (figures 3.66 i 3.67). A part de diferir en la seva densitat, aquestes plaques presenten un gruix superior a l'habitual.

A la figura 3.68, s'observen estructures laminars d'aquest tipus platinades unidireccionalment per tal d'analitzar les seves alçades. Aquestes estructures laminars presenten un gruix que pot ésser molt superior al de les típiques. Tal com es pot veure a la taula 3.1, les alçades tenen una distribució molt heterogènia.

Rang d'alçades (nm)	Nombre de plaques mesurades
15-25	3
25-35	2
35-45	5
45-55	1
55-65	1
65-75	0
75-85	1
85-95	1

Taula 3.1. Taula de la distribució d'alçades de les plaques denses, obtingudes amb mostres platinades unidireccionalment.

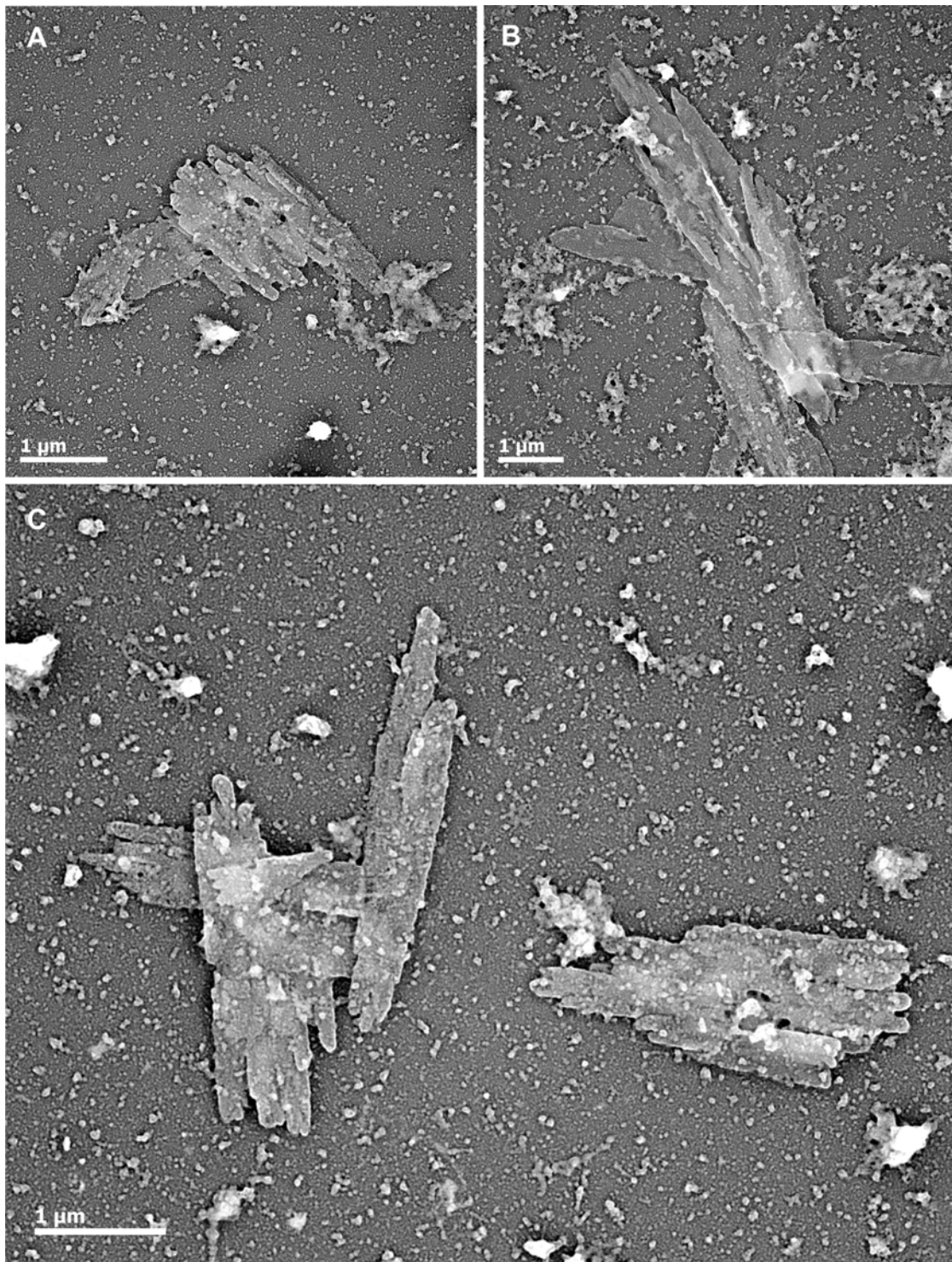


Figura 3.66. Plaques denses de gruix superior al de les plaques típiques. Mostra obtinguda a partir de la diàlisi de fragments de cromatina amb de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ durant 24 h a 37°C (B) i 25°C (A i C).

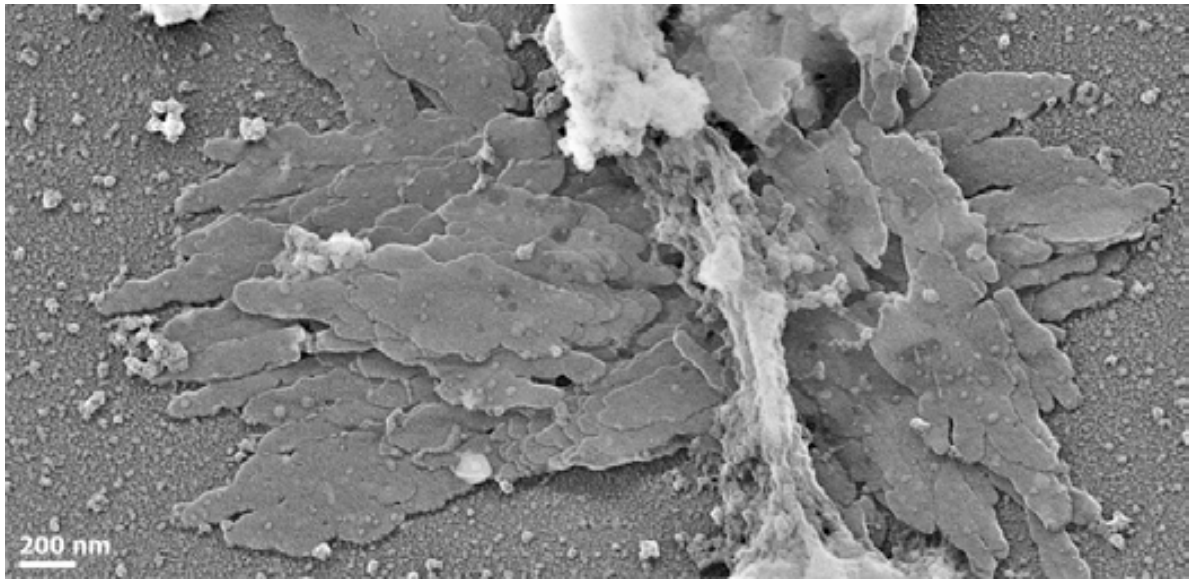


Figura 3.67. Plaques denses de gruix superior al de les plaques típiques. Mostra obtinguda a partir de la diàlisi de fragments de cromatina amb de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ durant 7 h a 37°C.

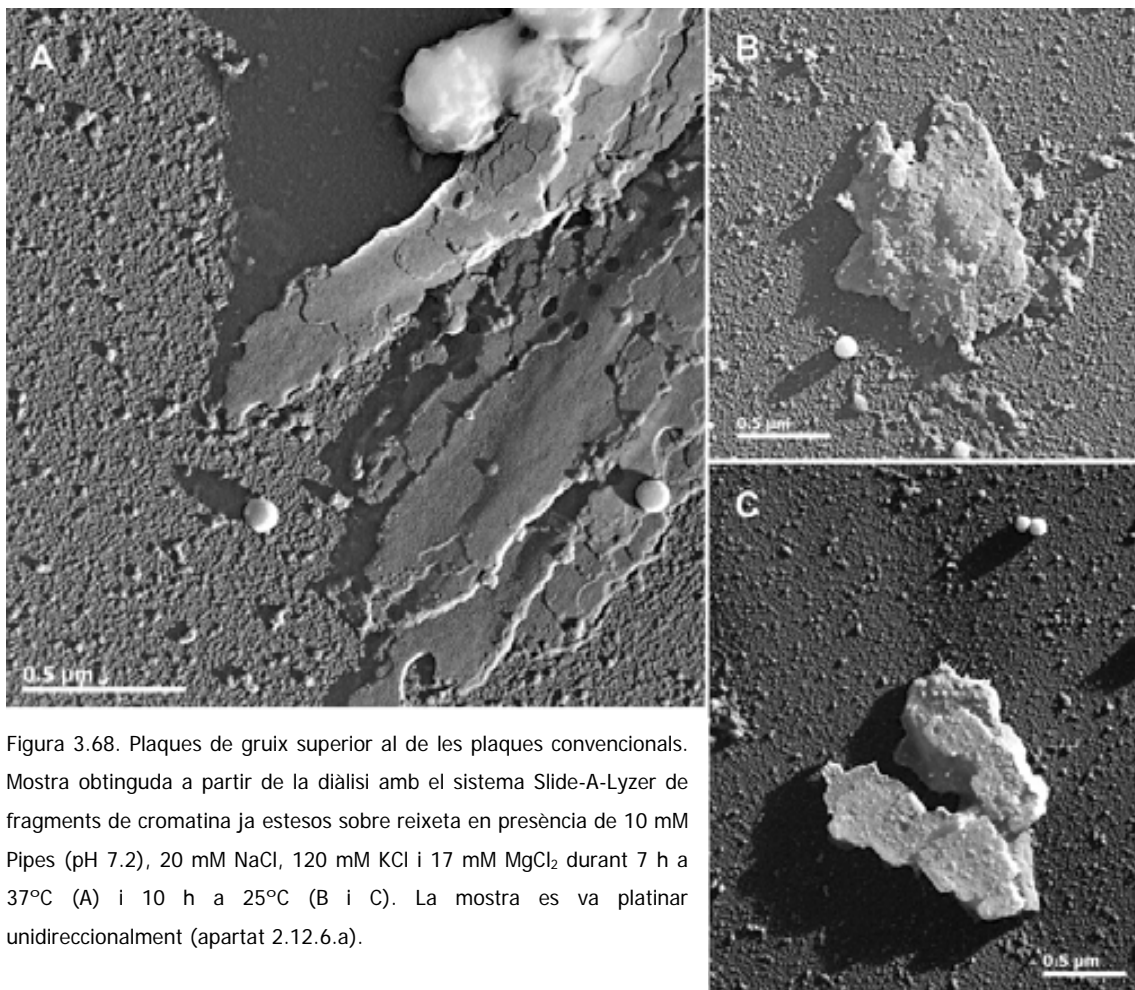


Figura 3.68. Plaques de gruix superior al de les plaques convencionals. Mostra obtinguda a partir de la diàlisi amb el sistema Slide-A-Lyzer de fragments de cromatina ja estesos sobre reixeta en presència de 10 mM Pipes (pH 7.2), 20 mM NaCl, 120 mM KCl i 17 mM MgCl₂ durant 7 h a 37°C (A) i 10 h a 25°C (B i C). La mostra es va platinar unidireccionalment (apartat 2.12.6.a).

3.3.9. Extensió de l'estudi d'autoassociació realitzat en aquesta tesi.

Les taules 3.2.a-3.2.e presenten un recull de totes les condicions en les quals s'han observat plaques formades per autoassociació dels fragments de cromatina obtinguts per digestió de cromosomes metafàsics amb nucleasa micrococcal. S'indiquen els tractaments previs de la mostra i els resultats que s'han obtingut en cada experiment. Cadascun dels experiments es va fer amb cromosomes frescos preparats a partir d'un nou cultiu de cèl·lules. El gran nombre de plaques trobades en moltes de les condicions assajades demostra inequívocament que la cromatina metafàsica s'organitza espontàniament formant estructures multilaminars.

Exp	Tractaments previs		Condicions iòniques finals	Incubació		Altres	Resultat
	Digestió MNasa	Preparacions prèvies		Temps (°C)	Diallisi		
1	15 min, diluïó 1:100	Diluïó 1/10	5 mM MgCl ₂ , 10 mM Pipes	1 h TA	TA	Fixació en dissolució	Plaques (-)
2	15 min, diluïó 1:100		5 mM MgCl ₂ , 10 mM Pipes	6 h TA	Sac convencional		Plaques en agregats
			15 mM MgCl ₂ , 10 mM Pipes	6 h TA	Sac convencional		Plaques en agregats
3	15 min, diluïó 1:100	Diluïó 1/2	Metafàsiques ^a	30 min	37°C		Plaques en agregats i aïllades
					4°C		Agregats amb petites plaques
4	15 min, diluïó 1:100		Metafàsiques	5 h 4°C	Sac convencional		Plaques en agregats
5	15 min, diluïó 1:100		Metafàsiques	6 h 4°C	Sac convencional		Plaques (++)
6	15 min, diluïó 1:200		Metafàsiques	5 h 4°C	Sac convencional		Plaques amb agregats
7	15 min, diluïó 1:200		Metafàsiques	5 h 4°C	Sac convencional		Plaques (+), cossos de 30 nm abundants
				ON 4°C	Sac convencional	Rentat en filtres	Cossos de 30 nm
							Plaques (+)

Taula 3.2.a. Experiments en els quals s'han observat plaques a partir de l'autoassociació. (a) correspon a 10 mM Pipes, 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 17 mM MgCl₂. (-) Poc abundants. (+) Abundants. (++) Molt abundants.

Exp	Tractaments previs		Condicions iòniques	Incubació			Altres	Resultat
	Digestió MNasa	Preparacions prèvies		Temps	T (°C)	Diàlisi		
8	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques	5 h	4°C	Sac convencional	Concentrat	Plaques (+)	
				ON	Sac convencional	Concentrat	Cossos de 30 nm	
9	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques	6 h	4°C	Sac porus gran	Concentrat	Plaques (++)	
10	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques	6 h	4°C	Sac convencional	Platinació unidireccional	Plaques	
11	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques	6 h	4°C	Sac porus gran	Concentrat	Plaques (++)	
12	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques	6 h	4°C	Sac convencional	Sediment resuspès en ^(*) .	Plaques (++)	
13	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques, 0 – 25 mM CaCl ₂	6 h	4°C	Sac convencional		Plaques en agregats	
14	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques, 1 – 5 mM MgCl ₂	6 h	4°C	Sac convencional		Plaques	
15	15 min, dilució 1:100	10 mM Pipes, 0 – 2 mM MgCl ₂	6 h	4°C	Sac convencional		Plaques (excepte a 0 mM MgCl ₂)	
16	15 min, dilució 1:100	Metafàsiques	1 h				Plaques primes	
			3 h				Plaques	
			5 h	4°C	Slide-A-Lyzer		Plaques (++)	
			7 h				Plaques (++)	

Taula 3.2.b.(continuació). (*) correspon a 10 mM Pipes, 120 mM KCl, 20 mM NaCl i 17 mM MgCl₂.

Exp	Trataments previs		Condicions iòniques	Incubació		Altres	Resultat
	Digestió MNasa	Preparacions prèvies		Temps	T (°C)		
17	15 min, dilució 1:100	Extensió en reixeta	Metafàsiques	1 h	25°C	Slide-A-Lyzer	Plaques en agregats
				3 h			Plaques
				5 h			Plaques (++)
				7 h			Plaques de mida gran
				24 h			Plaques de mida gran
18	15 min, dilució 1:100	Extensió en reixeta	Metafàsiques	1 h	37°C	Slide-A-Lyzer	Plaques
				3 h			Plaques (+)
				5 h			Plaques (++)
				7 h			Plaques de mida gran
				24 h			Plaques de mida gran
19	5 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa.	Metafàsiques	6 h	4°C	Slide-A-Lyzer	Plaques de mida petita (-)
20	5 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa.	Metafàsiques	5 h	4°C	Sac convencional	Plaques en formació
21	5 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa; concentrat.	Metafàsiques	7 h	4°C	Sac convencional	Plaques petites i plaques de mida gran

Taula 3.2.c.(continuació).

Exp	Tractaments previs		Condicions iòniques	Incubació		Altres	Resultat
	Digestió MNasa	Preparacions prèvies		Temps (°C)	Diàlisi		
22	5 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa; concentrat.	Combinades 10 mM Pipes, 10 mM EDTA	1 h	4°C	Sac convencional	Plaques (+)
				6 h			
23	5 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa; concentrat.	Combinades 10 mM Pipes, 10 mM EDTA	1 h	4°C	Sac convencional	Plaques (++)
				6 h			
24	5 min, dilució 1:100	Extensió en reixeta.	Metafàsiques	10 h	25°C		Plaques de mida gran
				10 h	37°C	Slide-A-Lyzer	
				24 h	25°C		
				24 h	37°C		
25	5 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa; fragments grossos; concentrat.	Combinada 10 mM Pipes, 10 mM EDTA	1 h	4°C	Sac convencional	Plaques en formació (++)
				6 h			
26	10 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa; concentrat.	Combinada 10 mM Pipes, 10 mM EDTA	1 h	4°C	Sac convencional	Plaques en formació (++)
				6 h			
27	6 min, dilució 1:100	Electroforesi preparativa; fragments petits; concentrat.	Combinada 10 mM Pipes, 10 mM EDTA	1 h	4°C	Sac convencional	Plaques en formació
				6 h			

Taula 3.2.d.f (continuació).

Exp	Tractaments previs		Condicions iòniques	Incubació		Altres	Resultat
	Digestió MNasa	Preparació prèvia		Temps	T (°C)		
28	5 min, diluïó 1:100		Metafàsiques	7 h	4°C	Sac convencional	Plaques (+)
29	9 min, diluïó 1:100	Electroforesi preparativa, fragments grossos; concentrat.	Combinada	1 h	4°C	Sac convencional	Plaques
				6 h			
30	7 min, diluïó 1:100	Electroforesi preparativa, fragments petits; concentrat.	Combinada	1.5 h	4°C	Sac convencional	Plaques amb cossos circulars a sobre (++)
				5.5 h			

Taula 3.2.e.(continuació).

4. DISCUSSIÓ GENERAL

4.1. Estudi de l'estructura interna del cromosoma metafàsic mitjançant microscòpia de polarització.

Diversos estudis (Livolant, 1978 i 1984) han demostrat que els cromosomes politènics de les glàndules salivals de certs insectes, els caps d'espermatozoides de forma elongada i els cromosomes de dinoflagel·lats, presenten una estructura anisotròpica, és a dir, al ser observats en el microscopi de polarització en posició d'extinció es veuen il·luminats. En canvi, es va trobar (Livolant, 1978) que els cromosomes metafàsics fixats en medi orgànic no són birefringents.

Posteriorment (Leforestier et al., 1999) van veure que les partícules nucli aïllades es podien agrupar formant columnes amb propietats de cristall líquids anisotròpics (veure figura 1.8). A més, aquests autors també van veure que les propietats òptiques dels nucleosomes depenen de l'orientació de les cadenes de DNA en relació a la llum polaritzada. Per altra banda, McDowall i col·laboradors (1986) van suggerir que en els cromosomes la cromatina formava cristalls líquids per apilament de nucleosomes. Tenint en compte aquests precedents, en el present treball es va decidir estudiar cromosomes metafàsics procedents de cèl·lules animals en medi aquós mitjançant microscòpia de polarització.

S'han analitzat cromosomes tractats amb medis estructurants: poliamines, PNa-5 mM $MgCl_2$ i PNa-20 mM $MgCl_2$. Els resultats han estat idèntics en els tres casos: els cromosomes metafàsics no es veuen il·luminats al microscopi de polarització en posició d'extinció. Per tant, els nostres resultats demostren que els cromosomes metafàsics condensats són isotròpics en medi aquós.

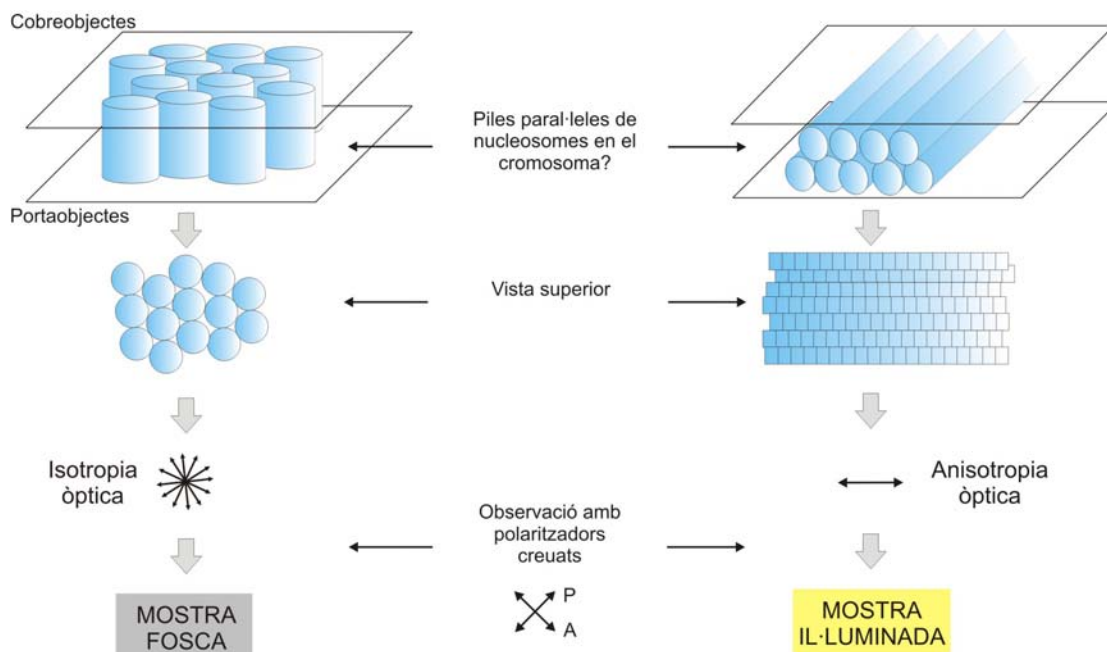


Figura 4.1. Com que els cromosomes observats no estan fixats i adopten totes les orientacions possibles a l'espai (apartat 3.2.1), el fet que en totes les condicions estudiades es vegin com a objectes no il·luminats (apartat 3.2.3) indica que no contenen piles paral·leles de nucleosomes en el seu interior.

A la figura 4.1 es mostren esquemàticament dues ordenacions senzilles de piles de nucleosomes a l'interior dels cromosomes. Si, tal com s'ha demostrat en aquest treball, els cromosomes estan col·locats en totes les orientacions possibles a l'interior dels sacs cel·lulars, i es donés algun dels casos de la figura, s'hauria d'esperar veure algun cromosoma il·luminat dins el sac cel·lular en observar la mostra en posició d'extinció. Com que no s'observa cap mena d'il·luminació quan es treballa amb polaritzadors creuats, es pot concloure que els cromosomes metafàsics condensats en medi aquós dins els sacs cel·lulars són estructures òpticament isotròpiques. Aquest resultat permet concloure també que els cromosomes metafàsics no estan formats per piles paral·leles de nucleosomes. Això implica que l'estructura interna dels cromosomes té una ordenació més complexa que l'esperada a partir d'estudis fets amb nucleosomes purificats i permet descartar la possibilitat d'una ordenació senzilla dels nucleosomes a l'interior de les cromàtides.

L'orientació irregular dels nucleosomes no exclou, però, la possibilitat d'una associació entre cares laterals de nucleosomes adjacents. Els estudis de microscopia de polarització mostren que els cromosomes condensats no són birrefringents i que el fenomen descrit no és compatible amb l'existència de columnes paral·leles de nucleosomes dins els cromosomes (figura 4.2.B). Malgrat tot, els nucleosomes orientats de forma irregular (figura 4.2.C) podrien associar-se formant piles amb diferents orientacions. D'aquesta manera, hi hauria moltes orientacions possibles d'aquestes piles i la mostra tampoc seria birrefringent. A més, aquesta hipòtesi referma les conclusions obtingudes anteriorment per Castro-Hartmann (2009) fent servir diverses tècniques de microscòpia electrònica.

Les dades de microscòpia electrònica convencional, criomicroscòpia electrònica i tomografia electrònica indiquen que els nucleosomes no estan posats plans a les plaques de cromatina, i que la distància entre els nucleosomes als marges de les plaques és superior a la distància que correspondria a piles regulars de nucleosomes (5.7 nm). A més, tenint en compte que l'alçada del nucleosoma és de d'aproximadament 11 nm, es proposa que hi ha interdigitació dels nucleosomes de les successives capes de cromatina per poder justificar el gruix de les plaques (aproximadament 6 nm) determinat en aquesta tesi i en altres estudis previs (Gállego et al., 2009; Castro-Hartmann, 2009).

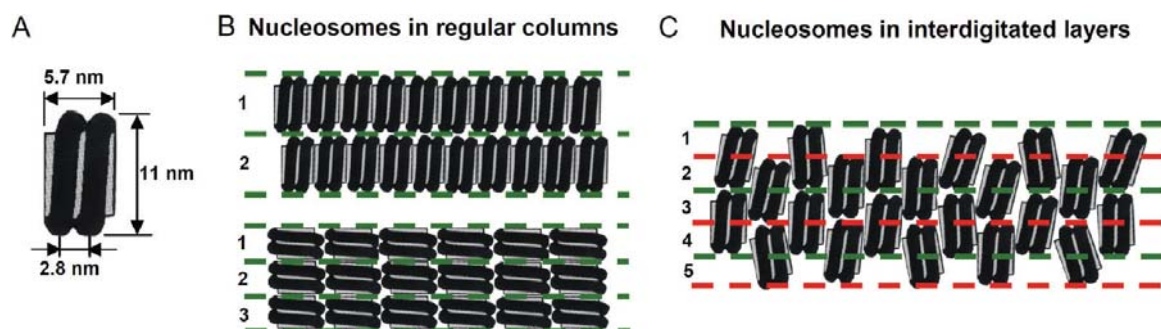


Figura 4.2. Vista lateral de les possibles orientacions dels nucleosomes a l'interior de les plaques metafàsiques. Els resultats de microscòpia de polarització descarten una ordenació en columnes paral·leles (B). Les mides aproximades per un nucleosoma es representen a A. Tenint en compte les dimensions del nucleosoma (A) i les alçades de les plaques obtingudes per TEM, AFM i tomografia electrònica, l'orientació irregular i la interdigitació dels nucleosomes en diversos estrats (C) pot justificar el gruix de les plaques, així com els resultats obtinguts mitjançant microscòpia de polarització.

4.2. Autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics.

4.2.1. Condensació dels fragments de cromatina: formació de cossos circulars compactes.

S'ha fet un estudi molt extens i detallat sobre l'estructura i les propietats autoassociatives dels fragments de cromatina procedents de cromosomes metafàsics de cèl·lules humanes a diferents concentracions, tractats amb diverses condicions iòniques, a diferents temps i temperatures. En aquests estudis, únicament s'han visualitzat fibres esteses de cromatina amb els nucleosomes separats en condicions de molt baixa força iònica (figura 3.18).

A partir de l'anàlisi de diferents condicions (veure apartat 2.7.2 i taula 2.3), s'ha observat que a l'augmentar la força iònica del medi fins a concentracions iòniques properes a la metafase (veure apartats 2.7.1; Strick et al., 2001; Alberts et al., 2002) les fibres esteses es compacten donant lloc a cossos circulars compactes de 30 nm, en els quals no es poden veure els nucleosomes com elements independents (veure figura 3.33). A més, aquests cossos apareixen en pràcticament totes les condicions estudiades, especialment en concentracions baixes de cations divalents (Mg^{2+} i Ca^{2+}).

L'observació de fibres esteses de cromatina està en controvèrsia amb els models proposats anteriorment per altres investigadors (Williams et al., 1986; Woodcock i Horowitz, 1995), que consideren les fibres amb el DNA d'unió creuat (en zig-zag) com a element bàsic de la cromatina. Cal tenir en compte que aquests models van ser obtinguts a partir de l'anàlisi de fragments de cromatina en absència de cations divalents.

L'observació de cossos circulars compactes pot interpretar-se amb el model del solenoide interdigitat compacte proposat anteriorment al nostre grup (Daban i Bermúdez, 1998) pel plegament de la fibra de 30 nm (veure apartat 1.4.2.d.1) i és coherent amb el model d'hèlix interdigitada compacta de Robinson i col·laboradors (2006), proposat a partir d'estudis amb nucleosomes reconstituïts amb seqüències de DNA posicionadores de nucleosomes. Aquests models tenen una elevada concentració local de DNA (veure apartats 1.1.1 i 1.4.2.d) que, en principi, és compatible amb l'elevada concentració local de DNA observada en els cromosomes metafàsics (Daban, 2000).

4.2.2. Associació de fragments de cromatina: formació d'estructures laminars.

A l'augmentar la força iònica del medi fins a condicions iòniques properes a la metafase (Strick et al., 2001), apareixien plaques de dimensions considerables formades per autoassociació de fragments de cromatina de cromosomes metafàsics (veure apartat 3.3.2). Les plaques observades són compactes i generalment presenten diversos estrats ben definits. Aquests resultats poden relacionar-se amb els obtinguts anteriorment al grup d'investigació (Caravaca, 2004; Caravaca et al., 2005; Caño, 2007; Castro-Hartmann, 2009; Gállego et al., 2009; Gállego, 2010) a partir de l'estudi mitjançant microscòpia electrònica de transmissió, tomografia electrònica, criomicroscòpia i microscòpia de força atòmica de plaques procedents de cromosomes metafàsics de cèl·lules humanes. En aquests estudis, fent servir diversos procediments suaus de desnaturalització, en presència de poliamines i/o de cations divalents, s'observava l'emanació de plaques a la perifèria dels cromosomes. També es van estudiar les propietats mecàniques de les plaques emanades de cromosomes (Gállego et al., 2011). Les plaques obtingudes per autoassociació de fragments de cromatina procedents de cromosomes

humans digerits amb nucleasa micrococcal que han estat estudiades al present treball presenten les mateixes característiques morfològiques que les plaques emanades de cromosomes metafàsics. En particular, els resultats obtinguts mitjançant el platinat unidireccional, indiquen que les plaques formades per autoassociació presenten la mateixa alçada que les plaques emanades directament de cromosomes parcialment desnaturalitzats.

En la majoria dels casos, les plaques formades per autoassociació presenten una superfície llisa i compacta, sense evidències d'estructures regulars o repetitives al seu interior. En alguns experiments, a més, es va observar la presència d'estriacions a la superfície de plaques de grans dimensions (veure figures 3.29-3.30). L'aparició d'aquestes estriacions, juntament amb l'observació de plaques d'alçada inferior a l'habitual (veure apartat 3.3.7), fa pensar en una possible relació d'aquestes estructures amb el procés d'associació de la cromatina. Possiblement, es tracta de nucleosomes que formen estructures intermediàries poc compactes sobre plaques ben formades o sobre la cromatina dipositada al fons de la reixeta).

La presència de molts cossos circulars compactes de 30 nm al voltant de les plaques formades per autoassociació (veure figura 3.33) i a sobre de les plaques (en el procés de ser absorbits; veure figures 3.34-3.35), fa pensar en un equilibri entre aquests dos tipus d'estructures. Per altra banda, s'ha observat que apareixien cossos circulars compactes d'aproximadament 13 nm sobre la superfície d'algunes plaques (veure figures 3.47-3.49). La presència d'aquestes estructures, de mida inferior als cossos circulars compactes de 30 nm, podria estar relacionada amb el procés d'incorporació dels fragments de cromatina a l'interior de les plaques. Aquestes observacions suggereixen que les estructures laminars estan formades per l'associació lateral de cossos circulars.

Els resultats de Dubochet i Noll (1978), Leforestier i col·laboradors (1999) i altres autors (Daban, 2011), indiquen que les partícules nucli tenen una gran tendència a interaccionar a través de les seves cares laterals. La interdigitació de les successives làmines a les plaques permetria l'establiment d'interaccions entre les cares laterals de molts nucleosomes i donaria estabilitat a una estructura final multilaminar i de gran extensió. L'aparició de plaques molt gruixudes i aparentment molt denses en experiments fets amb temps d'incubació llargs a 25 i 37°C (veure apartats 3.3.6 i 3.3.8), indica que les làmines tenen una gran tendència a l'apilament i reforça la idea que la interdigitació, que permet la interacció entre les cares laterals dels nucleosomes de les successives capes, és fonamental per l'empaquetament de la cromatina als cromosomes metafàsics.

4.3. Implicacions estructurals i funcionals del model de plaques primes de cromatina.

Els resultats obtinguts en el present treball experimental, refermen el model de plaques primes proposat al grup on s'ha realitzat l'estudi (veure apartat 1.5.4.d). Per una banda, gràcies als estudis de microscòpia de polarització de l'estructura interna del cromosoma, s'ha descartat una ordenació senzilla dels nucleosomes a les plaques de cromatina. Aquesta observació és compatible amb l'aparent orientació irregular dels nucleosomes a l'interior de les cromàtides observada per Eltsov i col·laboradors (2008). Aquests investigadors van analitzar l'estructura de la cromatina a partir de criotalls de cèl·lules mitòtiques i van detectar que la cromatina està ordenada irregularment a l'interior

dels cromosomes. Tal com s'ha discutit en apartats precedents, l'orientació irregular dels nucleosomes a les plaques de cromatina permet la interdigitació entre les successives capes de les plaques que formarien les cromàtides. A més, la interdigitació entre les diverses capes podria explicar l'elevada concentració de DNA local observada en els cromosomes metafàsics (Daban, 2000).

L'estudi de les propietats autoassociatives dels fragments de cromatina de cromosomes metafàsics ha mostrat la gran tendència que aquests tenen de formar plaques en una àmplia varietat de condicions iòniques, majoritàriament properes a les observades durant la metafase (Strick et al., 2001). En contrast amb les condicions experimentals emprades en aquesta tesi, en la majoria dels estudis experimentals en els quals es basen els models fibril·lars per al cromosoma, les condicions iòniques emprades disten molt de les que es troben a l'interior de la cèl·lula durant la divisió cel·lular.

La tendència de la cromatina en condicions metafàsiques per estructurar-se de forma laminar, juntament amb el fet que no s'hagin observat fibres de cromatina en cap de les condicions estructurants estudiades, permet descartar aquells models estructurals basats en la fibra de 30 nm i referma el model basat en plaques primes.

Finalment, tenint en compte l'estabilitat que presenten les plaques, es pot suggerir que aquesta estructura laminar proposada recentment és necessària pel correcte emmagatzematge del DNA a la cromàtide durant la mitosi.

5. CONCLUSIONS

5.1. Els resultats obtinguts mitjançant microscòpia de polarització indiquen que, en totes les condicions assajades, els cromosomes metafàsics, en medi aquós dins els sacs cel·lulars són estructures òpticament isotròpiques.

5.2. L'isotropia observada permet concloure que els cromosomes metafàsics no estan formats per piles paral·leles de nucleosomes. Aquesta possibilitat no exclou però l'associació de les cares laterals dels nucleosomes, que podrien donar lloc a piles amb diferents orientacions.

5.3. En els estudis realitzats amb microscòpia electrònica de transmissió amb fragments de cromatina obtinguts mitjançant digestió amb nucleasa micrococcal de cromosomes metafàsics de cèl·lules humanes, s'ha observat que aquests fragments únicament adopten una conformació estesa quan la concentració iònica del medi és molt baixa (10 mM Pipes, 10 mM EDTA). A l'augmentar la força iònica del medi, afegint cations com Mg^{2+} a concentracions creixents (a partir de 1 mM Mg^{2+}), apareixen cossos circulars compactes de 30 nm de diàmetre.

5.4. Els fragments de cromatina de cromosomes metafàsics de cèl·lules humanes en condicions iòniques properes a la metafase (10 mM Pipes, 120 mM K^+ , 20 mM Na^+ , 17 mM Mg^{2+}) tenen la capacitat intrínseca de formar estructures laminars per autoassociació. En aquestes condicions no s'observen fibres de cromatina.

5.5. Les plaques formades per autoassociació presenten les mateixes característiques que les emanades directament de cromosomes metafàsics observades en estudis previs del nostre grup d'investigació. Són estructures compactes, de superfície llisa i multilaminars.

5.6. L'alçada de les plaques formades per autoassociació de fragments de cromatina metafàsica determinada a partir de mostres platinades unidireccionalment és de 6.8 ± 1.0 nm per cada làmina. Aquest valor coincideix amb l'alçada de les plaques emanades de cromosomes parcialment desnaturalitzants.

5.7. La gran quantitat de cossos circulars compactes de 30 nm observats en molts experiments als voltants de les plaques autoassociades, i la presència d'aquests cossos i altres estructures circulars més petites sobre les plaques, suggereix que els cossos de 30 nm són estructures intermediàries durant el procés de formació de plaques.

5.8. Fent servir temps llargs d'incubació a 25 i 37°C es formen plaques molt gruixudes i aparentment molt denses. Aquests resultats indiquen que les làmines de cromatina tenen molta tendència a apilar-se per formar estructures de moltes capes.

5.9. Tenint en compte les conclusions 5.1 i 5.2 dels experiments de microscòpia de polarització i que l'alçada de les làmines (conclusió 5.6) que componen les plaques és inferior al diàmetre dels nucleosomes (11 nm), es pot suggerir que a les plaques els nucleosomes estan orientats

irregularment però permeten la interdigitació entre les làmines successives. Aquesta interdigitació afavoreix la interacció entre les cares laterals dels nucleosomes i dona estabilitat a les plaques.

5.10. L'existència d'una gran tendència a l'autoassociació de fragments de cromatina metafàsica per formar estructures multilaminars molt estables demostrades en aquesta tesi, suggereix fortament que les cromàtides contenen cromatina plegada en una forma laminar al seu interior. Aquest plegament és més dens que el que es pot obtenir mitjançant fibres esteses de cromatina i pot donar protecció al DNA durant la divisió cel·lular.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alba, F.J., Bartolomé, S., Bermúdez, A., Daban, J.R. (2009). Fluorescent labelling of proteins and its application to SDS-PAGE and western blotting. *Methods Mol Biol*, 536:407-16.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 5th ed.
- Almagro, S., Rivelino, D., Hirano, T., Houchmandzadeh, B., 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): 5118-5126.
- Arents, G., 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): 11170-11174.
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C.H., Mechtler, K., Nasmyth, K. (2003). ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol*, 13(22): 1941-1953.
- Avilés, F.J., Chapman, G.E., Kneale, G.G., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M. (1978). The conformation of histone H5. Isolation and characterisation of the globular segment. *Eur J Biochem*, 88(2): 363-371.
- Bartolomé, S., Bermúdez, A., Daban, J.R. (1995). Electrophoresis of chromatin on nondenaturing agarose gels containing Mg²⁺. Self-assembly of small chromatin fragments and folding of the 30-nm fiber. *J Biol Chem*, 270(38): 22514-22521.
- Bartolomé, S., Bermúdez, A., Daban, J.R. (1994). Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. *J Cell Sci*, 107 (11): 2983-2992.
- Bartolomé, S. (1994). *Estudio de la auto-organización y estructura de pequeños fragmentos de cromatina*. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., 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): 14173-14178.
- Belmont, A.S., Bruce, K. (1994). Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of 82 interphase chromatid structure. *J Cell Biol*, 127(2): 287-302.
- Bermúdez, A., Bartolomé, S., Daban, J.R. (1998). Partial denaturation of small chromatin fragments: direct evidence for the radial distribution of nucleosomes in folded chromatin fibers. *J Cell Sci*, 111(12): 1707-1715.
- Bianchi, M.E., Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 15(5): 496-506.
- Bordas, J., Perez-Grau, L., Koch, M.H., Vega, M.C., 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: 175-185.
- Bradbury, E.M., Baldwin, J.P. (1986). Neutron scatter and diffraction techniques applied to nucleosome and chromatin structure. *Cell Biophys*, 9(1-2): 35-66.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 26(3): 152-153.

- Caño, S. (2007). *Estructura de la cromatina condensada*. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Caño, S., Caravaca, J.M., Martín, M., 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., Caño, S., Gállego, I., Daban, J.R. (2005). Structural elements of bulk chromatin within metaphase chromosomes. *Chromosome Res*, 13(6): 725-743.
- Caravaca, J.M. (2004). *Elementos estructurales de la cromatina en los cromosomas mitóticos*. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- 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., Daban, J.R. (2010). Irregular orientation of nucleosomes in the well-defined chromatin plates of metaphase chromosomes. *Biochemistry*, 49(19): 4043-4050.
- Caterino, T.L., Hayes, J.J. (2007). Chromatin structure depends on what's in the nucleosome's pocket. *Nat Struct Mol Biol*, 14(11): 1056-1058.
- Catez, F., Hock, R. (2010). Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochim Biophys Acta*, 1799(1-2): 15-27.
- Chakravarthy, S., Park, Y.J., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R.S., Luger, K. (2005). Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett*, 579(4): 895-898.
- Christensen, M.O., Larsen, M.K., Barthelmes, H.U., Hock, R., Andersen, C.L., Kjeldsen, E., Knudsen, B.R., Westergaard, O., Boege, F., Mielke, C. (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol*, 157(1): 31-44.
- Comings, D.E. (1968). The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet*, 20(5): 440-460.
- Compton, J.L., Bellard, M., Chambon, P. (1976). Biochemical evidence of variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(12): 4382-4386.
- Craig, J. (1999). *Chromosome structural analysis. A practical approach*, capítol: Isolation of vertebrate metaphase chromosomes and their analysis by FISH (protocol 3); pàgines 59 - 80. WA Wickmore, editor. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Crane-Robinson, C. (1997). Where is the globular domain of linker histone located on the nucleosome? *Trends Biochem Sci*, 22(3): 75-77.
- Cremer, T., Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2(4): 292-301.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B. (1967). Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 242(7): 1541-7.
- Daban, J.R. (2011). Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and

- metaphase chromosome structure. *Micron*, 42(8): 733-750.
- Daban, J.R. (2003). High concentration of DNA in condensed chromatin. *Biochem Cell Biol*, 81(3): 91-99.
- Daban, J.R. (2000). Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochemistry*, 39(14): 3861-3866.
- Daban, J.R., Bermúdez, A. (1998). Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry*, 37(13) 4299-4304.
- Daban, J.R., 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., Cantor, C.R. (1982b). Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 156(4): 749-769.
- De Piccoli, G., Torres-Rosell, J., Aragon, L. (2009). The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6? *Chromosome Res*, 17(2): 251-263.
- Depken, M., Schiessel, H. (2009). Nucleosome shape dictates chromatin fiber structure. *Biophys J*, 96(3): 777-784.
- Dubochet, J., Noll, M. (1978). Nucleosome arcs and helices. *Science*, 202(4365): 280-286.
- El-Alfy, M., 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.
- Finch, J.T., Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(6): 1897-1901.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M., Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 269(5623): 29-36.
- Gallagher, S.R. (1994). Quantification of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Chichester (UK).
- Gallego, F. (1994). *Dinàmica nucleosomal durant l'etapa d'elongació de la transcripció in vitro de cromatina*. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències.
- Gállego, I., Castro-Hartmann, P., Caravaca, J.M., Caño, S., Daban, J.R. (2009). Dense chromatin plates in metaphase chromosomes. *Eur Biophys J*, 38(4): 503-522.
- Gállego, I. (2010). *Estructura y propiedades de las placas de cromatina de los cromosomas metafásicos: Estudio mediante técnicas de microscopía TEM, AFM y Espectroscopía de Fuerza Atómica*. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Gállego, I., Oncins, G., Sisquella, X., Fernandez-Busquets, X., Daban, J.R. (2010). Nanotribology results show that DNA forms a mechanically resistant 2D network in metaphase chromatin plates. *Biophys J*, 99(12): 3951-3958.
- Goodwin, G.H., Sanders, C., Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem*, 38(1): 14-19.
- Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., Schlick, T. (2009). Evidence for

- heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(32): 13317-13322.
- Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E., Bunick, G.J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Cryst D*, 56(12): 1513-1534.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5): 311-322.
- Hirano, T. (2000). Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu Rev Biochem*, 69: 115-144.
- Horowitz, R.A., Koster, A.J., Walz, J., Woodcock, C.L. (1997). Automated electron microscope tomography of frozen-hydrated chromatin: the irregular three-dimensional zigzag architecture persists in compact, isolated fibers. *J Struct Biol*, 120(3): 353-362.
- Houchmandzadeh, B., Dimitrov, S. (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J Cell Biol*, 145(2): 215-223.
- Kawamura, R., Pope, L.H., Christensen, M.O., Sun, M., Terekhova, K., Boege, F., Mielke, C., Andersen, A.H., Marko, J.F. (2010). Mitotic chromosomes are constrained by topoisomerase II-sensitive DNA entanglements. *J Cell Biol*, 188(5): 653-663.
- Kepper, N., Foethke, D., Stehr, R., Wedemann, G., Rippe, K. (2008). Nucleosome geometry and internucleosomal interactions control the chromatin fiber conformation. *Biophys J*, 95(8): 3692-3705.
- Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T., Belmont, A.S. (2004). Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol*, 166(6): 775-785.
- Kornberg, R.D., Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3): 285-294.
- Kurze, A., Michie, K.A., Dixon, S.E., Mishra, A., Itoh, T., Khalid, S., Strmecki, L., Shirahige, K., Haering, C.H., Lowe, J., Nasmyth, K. (2011). A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion. *EMBO J*, 30(2): 364-378.
- Leforestier, A., Dubochet, J., Livolant, F. (2001). Bilayers of nucleosome core particles. *Biophys J*, 81(4): 2414-2421.
- Leforestier, A., Fudaley, S., Livolant, F. (1999). Spermidine-induced aggregation of nucleosome core particles: evidence for multiple liquid crystalline phases. *J Mol Biol*, 290(2): 481-494.
- Leuba, S.H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K., Zlatanova, J., 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): 11621-11625.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S., Dekker, J. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326(5950): 289-293.
- Livolant F. (1978). Positive and negative birefringence in chromosomes. *Chromosoma*, 1: 45-58.

- Livolant F. (1984). Cholesteric organization of DNA in the stallion sperm head. *Tissue Cell*, 4: 535-555.
- Luger, K., Hansen, J.C. (2005). Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol*, 15(2): 188-196.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997a). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251-260.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., Flaus, A.J., Wayne, M.M., Richmond, T.J. (1997b). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*, 272(3): 301-311.
- Maeshima, K., Laemmli, U.K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell*, 4(4): 467-480.
- Mangenot, S., Leforestier, A., Durand, D., Livolant, F. (2003). Phase diagram of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 333(5): 907-916.
- Marsden, M.P., Laemmli, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, 17(4): 849-858.
- McClendon, A.K., Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity and cancer. *Mutat res*, 35(18): 1670-80.
- McDowall, A.W., Smith, J.M., Dubochet, J. (1986). Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *EMBO J*, 6: 1395-1402.
- McGhee, J.D., Nickol, J.M., Felsenfeld, G., 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): 831-841.
- Mendelsohn J., Moore D.E., Salzman, N.P. (1968). Separation of isolated chinese hamster metaphase chromosomes into three size-groups. *J Mol Biol*, 1: 101-112.
- Mora, L. (2007). *Organización de los cromosomas en el núcleo interfásico de primates*. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències.
- Murray, J.M., Carr, A.M. (2008). SMC5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2): 177-182.
- Noll, M., Kornberg, R.D. (1977). Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J Mol Biol*, 109(3): 393-404.
- Parada, L., Misteli, T. (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*, 12(9): 425-432.
- Park, Y.J., Luger, K. (2008). Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr Opin Struct Biol*, 18(3): 282-289.
- Park, Y.J., Luger, K. (2006). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol*, 84(4): 549-558.
- Paulson, J.R., Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3): 817-828.
- Perkins, D., Henke, K.V. (2002). La polarización de la luz y el microscopio polarizante. En: *Minerales en Lámina Delgada*. Madrid: Prentice Hall.
- Peterson, C.L., Herskowitz, I. (1992). Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell*, 68(3): 573-583.

- Pienta, K.J., 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: 123-135.
- Poirier, M.G., Marko, J.F. (2002). Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(24): 15393-15397.
- Raghuram, N., Carrero, G., Th'ng, J., Hendzel, M.J. (2009). Molecular dynamics of histone H1. *Biochem. Cell Biol*, 87(1): 189-206.
- Rhodes, D. (1997). Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up. *Nature*, 389(6648): 231, 233.
- Richmond, T.J., Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936): 145-150.
- Robinson, P.J., Fairall, L., Huynh, V.A., 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(107): 6506-6511.
- Roca, J. (2009). Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic Acids Res*, 37(3): 721-730.
- Saitoh, Y., Laemmli, U.K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, 76(4): 609-622.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, 436(7047): 138-141.
- Scipioni, A., Turchetti, G., Morosetti, S., De Santis, P. (2010). Geometrical, conformational and topological restraints in regular nucleosome compaction in chromatin. *Biophys Chem*, 148(1-3): 56-67.
- Sone, T., Iwano, M., Kobayashi, S., Ishihara, T., Hori, N., Takata, H., Ushiki, T., Uchiyama, S., Fukui, K. (2002). Changes in chromosomal surface structure by different isolation conditions. *Arch Histol Cytol*, 5: 445-455.
- Stack, S.M., Anderson, L.K. (2001). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res*, 9(3): 175-198.
- Stehr, R., Schöpflin, R., Ettig, R., Kepper, N., Rippe, K., Wedemann, G. (2010). Exploring the conformational space of chromatin fibers and their stability by numerical dynamic phase diagrams. *Biophys J*, 98(6): 1028-1037.
- Strick, R., Strissel, P.L., Gavrillov, K., 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., Baldwin, J.P. (1979). Higher-order structures of chromatin in solution. *Eur J Biochem*, 97(2): 593-602.
- Sumner, A.T. (2003). *Chromosomes organization and function*. Blackwell Publishing, Oxford (UK).
- Sumner AT. 1989. Chromosome banding. En Lacey AJ, ed. *Light Microscopy in Biology. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, pp 279-311.
- Taniguchi, T., Takayama, S. (1986). High-order structure of metaphase chromosomes: evidence for a multiple coiling model. *Chromosoma*, 93(6): 511-514.

- Tatchell, K., Van Holde, K.E. (1978). Compact oligomers and nucleosome phasing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(8): 3583-3587.
- Tate, V.E., Philipson, L. (1979). Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells. *Nucleic Acids Res*, 6(8): 2769-85.
- Tavormina, P.A., Come, M.G., Hudson, J.R., Mo, Y.Y., Beck, W.T., Gorbsky, G.J. (2002). Rapid exchange of mammalian topoisomerase II alpha at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J Cell Biol*, 158(1): 23-29.
- Thoma, F., Koller, T., Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, 83(2): 403-427.
- Thomas, J.O., Kornberg, R.D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72(7): 2626-2630.
- Uberbacher, E.C., Bunick, G.J. (1985). X-ray structure of the nucleosome core particle. *J Biomol Struct Dyn*, 2(6): 1033-1055.
- Uchiyama, S., Kobayashi, S., Takata, H., Ishihara, T., Hori, N., Higashi, T., Hayashihara, K., Sone, T., Higo, D., Nirasawa, T., Takao, T., Matsunaga, S., Fukui, K. (2005). Proteome analysis of human metaphase chromosomes. *J Biol Chem*, 280(17): 16994-17004.
- Van Holde, K., Zlatanova, J. (2007). Chromatin fiber structure: Where is the problem now? *Semin Cell Dev Biol*, 18(5): 651-658.
- Van Holde, K., Zlatanova, J. (1999). The nucleosome core particle: does it have structural and physiologic relevance? *Bioessays*, 21(9): 776-780.
- Van Holde, K., Zlatanova, J. (1996). What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(20): 10548-10555.
- Van Holde, K.E. (1989). *Chromatin*. Springer Verlag, New York (USA).
- Wang, J.C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 65: 635-692.
- Wanner, G., Formanek, H. (2000). A new chromosome model. *J Struct Biol*, 132(2): 147-161.
- Watson, J.D., Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356): 737-738.
- White, C.L., Suto, R.K., Luger, K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J*, 20(18): 5207-5218.
- Widom, J. (1986). Physicochemical studies of the folding of the 100 Å nucleosome filament into the 300 Å filament. Cation dependence. *J Mol Biol*, 190(3): 411-424.
- Widom, J., Klug, A. (1985). Structure of the 300Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, 43(1): 207-213.
- Williams, S.P., Athey, B.D., Muglia, L.J., Schappe, R.S., Gough, A.H., Langmore, J.P. (1986). Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J*, 49(1): 233-248.
- Wolffe, A. (1998). *Chromatin: Structure and function* (3rd edition). Academic Press, London.

- Wong, H., Victor, J.M., 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.
- Wood, A.J., Severson, A.F., Meyer, B.J. (2010). Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nat Rev Genet*, 11(6): 391-404.
- Woodcock, C.L., Frado, L.L., Rattner, J.B. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 1): 42-52.
- Woodcock, C.L., Grigoryev, S.A., Horowitz, R.A., Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(19): 9021-9025.
- Woodcock, C.L., Horowitz, R.A. (1995). Chromatin organization re-viewed. *Trends Cell Biol*, 5(7): 272-277.
- Worcel, A., Strogatz, S., Riley, D. (1981). Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(3): 1461-1465.
- Yabuki, H., Dattagupta, N., Crothers, D.M. (1982). Orientation of nucleosomes in the thirty-nanometer chromatin fiber. *Biochemistry*, 21(20): 5015-5020.
- Zhang, Q., Wang, Y. (2010). HMG modifications and nuclear function. *Biochim Biophys Acta*, 1799(1-2): 28-36.
- Zlatanova, J., Leuba, S.H. (2003). Chromatin fibers, one-at-a-time. *J Mol Biol*, 331(1): 1-19.
- Zlatanova, J., Leuba, S.H., van Holde, K. (1998). Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J*, 74(5): 2554-2566.
- Zlatanova, J., Leuba, S.H., Yang, G., Bustamante, C., van Holde, K. (1994). Linker DNA accessibility in chromatin fibers of different conformations: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(12): 5277-5280.
- Zlatanova, J., Seebart, C., Tomschik, M. (2007). Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills. *FASEB J*, 21 (7): 1294-1310.

ANNEX

I. Abreviatures utilitzades

Å	Angstrom
ADP	Adenosinadifosfat
AFM	Microscòpia de Força Atòmica
ATP	Adenosinatrifosfat
bp	Parell de bases
°C	Grau centígrad
cm	Centímetre
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
EDTA	Etilendinitriltetraacetat de sodi
EGTA	Àcid etilen glycol-bis [β -aminoetil eter]-N, N, N', N-tetraacètic
et al.	Et alter, i col·laboradors
FBS	Sèrum Fetal Boví
g	Gram
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
h	hora
Hoechst	BisBenzimida H 33258
IP	Iodur de propidi
kbp	Quilobases
kDa	Quilodàltons
kg	Quilogram
kHz	Quilohertz
kV	Quilovolt
l	Litre
m	Metre
M	Molar
mA	Mil·liamper
mbar	Mil·libar
mg	Mil·ligram
min	Minut
ml	Mil·lilitre
mm	Mil·límetre
mM	Mil·limolar
μ g	Microgram
μ l	Microlitre
μ m	Micròmetre
NCP	<i>Nucleosome Core Particle</i>
ng	Nanogram
NLS	Seqüència de localització nuclear
nm	Nanòmetre

NRL	<i>Nucleosome Repeat Length</i>
ON	<i>Over-night</i> , tota la nit
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PMSF	Fluorur fenilmetilsulfònic
PVC	Policlorur de vinil
p/v	Pes/volum
Rpm	Revolucions per minut
S	Segon
SARS	<i>Scaffold associated regions</i>
SDS	Dodecil sulfat sòdic
TA	Temperatura ambient
TEA	Trietanolamina
TEM	Microscòpia Electrònica de Transmissió
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) - aminometà
U	Unitat enzimàtica
UV	Ultraviolada
V	Volt
v/v	Volum/volum

Tampons utilitzats

PM	5 mM Pipes (pH 7.2), 5 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
PNa	5 mM Pipes (pH 7.2), 5 mM NaCl, 1 mM EGTA
PA	15 mM TEA-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EGTA (pH 7.4), 2 mM EDTA-KOH (pH 7.4), 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.2 mM espermina, 0.5 mM espermidina
Tampó àcid	0.1 M àcid cítric (pH variable), 0.2 M fosfato sòdic dibàsic, 0.1 M sacarosa, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂
Tampó estructurant	10 mM Pipes (pH 7.2), 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 17 MgCl ₂
Tampó hipotònic	75 mM KCl
TB	90 mM Tris, 90 mM àcid bòric
TBE	90 mM Tris, 90 mM àcid bòric, 1 mM EDTA

II. Publicacions científiques derivades de la tesi

Part del treball experimental de la present tesi ha contribuït a les següents publicacions científiques:

Articles científics

P.Castro-Hartmann, M.Milla i J.R.Daban (2010). Irregular Orientation of Nucleosomes in the Well-defined Chromatin Plates of Metaphase Chromosomes. *Biochemistry*, 49:4043-4050.

M.Milla i J.R.Daban. Self-assembly of Thin Plates from Nuclease-digested Chromatin of Metaphase Chromosomes. En preparació.

Participacions en congressos

Autors: M. Milla y J.R. Daban.

Títol: Distribución isotrópica de los nucleosomas en los cromosomas metafásicos en medio acuoso en condiciones iónicas celulares.

Participació: Pòster.

Congrés: XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Lloc: Málaga. **Data:** 12 – 15 de setembre de 2007.

Autors: M. Milla, P. Castro-Hartmann, I. Gállego i J.R. Daban.

Títol: Orientació irregular dels nucleosomes en les plaques de cromatina dels cromosomes metafàsics.

Participació: Comunicació oral.

Congrés: XVII Jornades de Biología Molecular.

Lloc: Barcelona. **Data:** 25 i 26 de juny de 2009.

Autors: J.R. Daban, P. Castro-Hartmann, I. Gállego, M. Milla, S. Caño and J.M.Caravaca.

Títol: Stacked thin plates containing irregularly oriented nucleosomes in metaphase chromosomes.

Participació: Comunicació oral.

Congrés: Joint Meeting of the Spanish and Portuguese Microscopy Societies.

Lloc: Segovia. **Data:** 16 – 19 de juliol de 2009.

Autors: M. Milla, P. Castro-Hartmann, I. Gállego i J.R. Daban.

Títol: Estructura interna de les plaques de cromatina dels cromosomes metafàsics.

Participació: Comunicació oral.

Congrés: III Jornades de Biofísica.

Lloc: Barcelona. **Data:** 16 de setembre de 2009.

Autors: J.R. Daban, P. Castro-Hartmann, I. Gállego, M. Milla, S. Caño and J.M.Caravaca.

Títol: Metaphase chromosomes are formed by stacked thin plates containing irregularly oriented nucleosomes.

Participació: Comunicació oral.

Congrés: I Jornada de Cromatina i Epigenètica.

Lloc: Barcelona. **Data:** 5 de març de 2010.

Autors: M. Milla, P. Castro-Hartmann and J.R. Daban.

Títol: Internal Structure of Chromatin Plates of Metaphase Chromosomes.

Participació: Pòster.

Congrés: 17th International Microscopy Congress.

Lloc: Rio de Janeiro (Brasil). **Data:** 19 – 24 de setembre de 2010.

Autors: P.Castro-Hartmann, M.Milla and J.R.Daban.

Títol: TEM, electron tomography and polarizing microscopy study of metaphase chromosome plates.

Participació: Pòster.

Congrés: 6th International Congress on Electron Tomography.

Lloc: Heidelberg (Alemanya). **Data:** 5 – 8 de maig de 2011.

Autors: J.R.Daban, I.Gállego, P.Castro-Hartmann, M.Milla, G.Oncins, X.Sisquella and X.Fernàndez-Busquets.

Títol: Structure and nanomechanical properties of condensed chromatin in metaphase chromosomes.

Participació: Comunicació oral.

Congrés: BCNano11.

Lloc: Barcelona. **Data:** 19 – 23 de setembre de 2011.

III. Agraïments

Costa agrair aquesta tesi fent una llista (no paro de preguntar-me si em deixaré a algú o si li hauria de dedicar aquesta tesi a algú més...). Com un bon amic em va dir, la vida és com un tren, on la gent puja i baixa. Hi ha gent que encara no ha baixat i potser compartirà amb tu tot el viatge. D'altres, ja hauran baixat fa temps i casi ni els recordes. De tota la gent que ha passat pel meu tren, he intentat quedar-me amb una part, amb les seves vivències i maneres de fer. Ha passat molt temps des que vaig entrar al departament i des d'aleshores, gràcies a tota la gent amb la que he compartit aquesta aventura, puc dir que he crescut, que m'he fet gran aquí. Realment la tesi feta en un altre lloc i en un altre moment no hauria estat el mateix i per això vull donar les gràcies a tots aquells que heu aportat una estona de desconnexió dins i fora del laboratori.

En primer lloc, agrair al Joan-Ramon l'oportunitat que m'ha donat al deixar-me fer la tesi doctoral al seu grup. També per les xerrades "fora ciència" que tenim de tant en tant. I per altra banda, la paciència per qualsevol pas que calia fer durant la tesi i la confiança que ha dipositat en mi tot aquest temps.

Al Servei de Tractament i Anàlisi d'imatges del Centre de Visió per Computador, concretament al Joan Masoliver, per l'assessorament i l'assistència amb el microscopi de polarització. Al Dr. Roger Villanueva (Institut de Ciències del Mar, CSIC-CMIMA), per ajudar-me amb l'anatomia del calamar. Al Jaume Ques (del laboratori de Làmines Primes, dept. Geologia, UAB), per ajudar-me a pulveritzar la calcita correctament.

Al Servei de Microscòpia Electrònica (UAB), per l'assessorament i l'assistència amb els microscopis electrònics. Gràcies a tot els seus membres per tractar-me com una més cada cop que baixava amb reixetes.

Al Servei de Cultius Cel·lulars del MRB (UAB), per cedir-me cèl·lules i espai per treballar amb les línies cel·lulars.

Al Ministerio de Educación y Ciencia (ara ja, Ministerio de Ciencia e Innovación), per concedir-me una beca FPU. A la UAB, per concedir-me una beca PIF.

Als meus companys de grup. He vist passar més d'una generació de cromatínics i només puc dir que gràcies per fer una mica més fàcil el treball amb les reixetes o amb els cultius. Gràcies al Juanma, per inciar-me en el món dels cromosomes. A la Silvia, per fer el mateix amb la cromatina (i amb el "buen hacer" del laboratori). Al Pablo, per ensenyar-me a fer anar els microscopis i mil i un programes de pc. A l'Isaac, per compartir el laboratori durant gran part de la tesi amb ell. A la Maria, perquè tot i que ara està fora i que no vam coincidir durant molt temps per aquí, m'ho vaig passar molt i molt bé al laboratori amb ella! (Alcian Blue...vull activar però no puc!). També gràcies a l'Andrea, per aportar una mica d'aire fresc al grup i per apuntar-se a qualsevol "sarao" (què gran la competència!)...ànims amb les reixetes! I gràcies per patir-me i fer-me de "personal assistant" el últimíssims dies de tesi!

Als companys de departament. Sou moltíssims els que he anat coneixent i amb els que he tingut l'enorme plaer de compartir cafès, dinars, celebracions i inclús mals moments al laboratori. Gràcies per les estones passades a can Planta amb el Jordi (bé, ara a Uppsala), la Mar i la Laia. Als PF

(Gyo, Marta i Bernat), per ser uns immillorables veïns (visca la 4^a!). A tota la família kinàsica (Edu, Franc, Ton, Jordi, Fanni, Núria i Albert), per les pedalades, sou molt però molt grans! Als llevats (Eva, Edu), per acollir-me abans de marxar a anglès algun que altre dia. També al Dídac, el llevat honorífic! A Carlos, por enseñarnos Málaga, por esos partidillos de básquet en el Saf, y por esos magníficos 15 días que pasaste por aquí. A tota la família d'ADHs amb els que he tingut el gust de coincidir (Agrin, Sergio, Xavi, Julio, Esther, Armando, Emma), per les mil i una xerrades, les hores chanantes, pels vídeos APM i de tesis i pels cotilleos a l'hora del cafè. Als DNAs (Núria, Alicia i Rita), per compartir histones i el truc del microones! Als Pros (Virginia, Alba, Irantzu, Carla, Anna, Natalia, Núria C, i molts més!), pels berenars, per distreure'm a la segona planta entre centrífugues i per alguna que altra estona a Can Salva. Als Ribos (Mohammed, Marc, David, Susanna,...), per les estones de passadís que he compartit amb vosaltres. Als RMNs (Rose, Ana Paula, Rui,...), per les receptes i els dinars compartits al seminari. Al Salva, per deixar-nos fer de lloques al seu xiringu, per ser dels pocs amb qui puc parlar de curses sense que s'endugui les mans al cap i pensi que estic boja, pels consells de curses, itineraris (no em vaig perdre buscant Barcelona desde la Uab!), i per les taronges! A les millors antigues del món: a l'Helena, per ser com ets, per treure'ns sempre un somriure i per animar-nos a tots a lluitar pel que volem; i a la Chari, per ser una gran mare i una encara millor persona.

Als companys de l'IBB. La veritat és que gràcies a vosaltres, l'excursió de pujar a cuidar les cèl·lules era una delícia! (us he trobat a faltar quan escribia!). Gràcies al Fran, per les estones de cultius, per les excursions, els concerts,... encara recordo aquell tulipà groc! A l'Araís (guapa!), per rebre'm sempre amb un somriure a la boca, inclús a primera hora a l'autobus. Al Roger, per demanar-me pastissos (jejeje). A la Capi, pel Poparb, pels vermutos, pels dinars, per les festes, per ensenyar-me la Ràpita, per descobrir-me el Justo...i el que queda! Al sector Pro de l'IBB, que de seguida m'han acollit a fer vídeos! I a tots, per deixar-me colar cada any a la vostra fondue!

I, per sort, no tot acaba dins la UAB... Gràcies a la Berta, pels anys que fa que tinc el privilegi de tenir-la d'amiga i d'aguantar-me tesis, roses, caminos, macarrons, sopars i mil històries més! Per no tenir mai un no i estar sempre aquí. A la Lúdia, la Cata, la Mireia i l'Ster, les meves nenes. Pels mil i un cafès que fem, per les estones passades i per deixar-me desconectar del laboratori en segons. A la Mariona, per ser aquí després de tants anys (ànims amb els de Vueling!). Gràcies a la Clara i el Kristian, perquè van estar als inicis d'aquesta aventura (quins temps aquells, els del master...casi res!) i per estar allà sense demanar-ho, ja sigui fent Dolce Vita o recopilant premis al Morrosko. Gràcies al Raimon, per descobrir-me Barcelona, els festivals i els concerts barats! Al Marc, per les estones de muntanya i les mil una converses de material i curses (gràcies a tu sé que és pronador i supinador!). A l'Ivan, per haver patit aquesta tesi durant molt temps. A Eric (tu eres Darks!), por ayudarme con la banda sonora de mi tesis, por distraerme estos últimos días de tesis, por animarme con las carreras, por entenderme cuando hablo en APM y por las mil una risas gañanas que nos hemos pegado, gracias de verdad!

A la Mar, la Laia, la Núria i la Bet, pel Saf, per les excursions i viatges i les mil i una aventures dins i fora del departament. A l'Eva, per deixar-me ser la seva font d'inspiració (millor no ho facis...),

per haver-me deixat ser de la ja mítica “Comissió Lúdico-Festiva Crosas-Milla” (tot un honor!). A la Sílvia, per les hores d’anglès, els consells de dins i fora del laboratori, festes, concerts, i mil aventures que espero anar repetint! A l’Agrin, pels Frappuccinos al nostre sofà del carrer Comtal o de qualsevol Starbucks (en vull més, e!), per ajudar-me a creure en mi. A Carli (y a Marta també!) por los Soul Train, el ave fusil y hacer de groupies de Manos de Topo...cosa completamente necesaria al final de la tesis para no perder la cordura! No os debo un baile...os debo por lo menos un tiramisú!

Als companys IH (Quelot, Luis, Eli, David, Laura, Olivia)...quants dilluns i dimecres compartint condicionals i paraules rares...però amb vosaltres sempre ha estat fàcil i m’heu ajudat a desconnectar de tot quan arribava corrent de la uni! Thanks! A la Gemma i la Bego...mai dues hores de gimnàs seran iguals! Gràcies per fer-me desconnectar cada migdia!

Als companys de camí que he tingut: a Fernando por hacerme sentir como en casa cuando estaba colgada en medio de los Pirineos, a Raquel y Alberto por la espontaneidad y por enseñarme las canciones de la Jurado (lo siento mi amooooooooor), als 4 magnífics (Pauli, Josep, Salvador i Andrés) per deixar-me compartit moments amb ells després de tants anys (ja van...??). Al Pauli, per les pipes i birres; per fer-me pensar i caminar (separadament, clar).

Als GMAO, amb els que he compartit moltes estones durant els últims mesos (Marcos, Mine, Xavi, Dani R, Dani E, Josemi, Jordi, Albà, Jota, Manolo, Pauli, Josep, Kiko i espero no deixar-me a ningú!). Sou un exemple de lluita i superació i penso que moltíssima gent hauria d’aprendre de vosaltres. Gràcies per guiar-me vosaltres a mi. Us seguiré fent pastissos! (i és una amenaça!). Al Josep, per les curses i estones viscudes.

A la meva família. Perquè encara que pensi que fer mil i un dinars i sopars familiars és un pal, em considero molt afortunada d’haver nascut on ho he fet. A les meves àvies, per mostrar-me que he de lluitar pel que m’agrada i pel que vull i per haver-me criat com ho han fet. Per ensenyar-me a cuinar i perquè m’encanta poder escoltar de boca seva part de la seva vida. Als meus tiets, per malcriar-me i tractar-me com una filla. Als meus cosins, per acollir-me sempre que ho he necessitat i haver-me permès gaudir de la seva companyia en qualsevol moment. Als que ja no hi són, perquè sempre han estat al meu cap.

A la Laura, per ser més que una germana. Perquè encara recordo quan la vaig veure per primer cop fa ja més de 20 anys, per les vacances a Calafell amb els avis, per les estones amb les mil i una mascotes que hem tingut a Castellar (encara ric quan penso amb l’ànec...), per voler jugar amb mi quan eres petita, per fer algun que altre sopar de germanes ja de grans, per confiar en mi...t’estimo peque!

I finalment, als meus pares, per estar sempre allà i estar orgullosos del que faig. Sense ells, segurament no hauria arribat a enlloc! Per haver-me donat infinit suport amb la tesi i amb les mil i una aventures que he viscut durant aquesta. Per ajudar-me a aixecar-me quan he caigut. Per ensenyar-me que per fer les coses, primer cal raonar-les i pensar-les bé. Per ser amics i pares a la vegada. A ells dedico aquesta tesi.

