

## **RESTRICCIONS FÍSQUES PER A LA FORMACIÓ D'ESTRUCTURES AMB ELEVADA CONCENTRACIÓ LOCAL DE DNA EN ELS CROMOSOMES METAFÀSICS**

JOAN-RAMON DABAN

*Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.*

Adreça per a la correspondència: Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Facultat de Ciències (Edifici Cs). Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona). Adreça electrònica: [joanramon.daban@uab.es](mailto:joanramon.daban@uab.es).

*Paraules clau: Cromatina, cromosomes, DNA.*

*Keywords: Chromatin, chromosomes, DNA.*

### **RESUM**

El nostre coneixement actual de les bases físiques que permeten la condensació del DNA en els cromosomes és molt limitat. Les longituds de les molècules de DNA dels genomes eucariòtics són molt més grans que les dimensions dels cromosomes metafàsics on estan contingudes durant la mitosi. A partir d'aquesta observació s'ha assumit generalment que la raó d'empaquetament lineal del DNA és una mesura adequada del grau de compactació del DNA. En aquest capítol es consideren diverses proves que indiquen que la concentració local de DNA és més apropiada que el la raó d'empaquetament lineal per a estudiar la condensació de la cromatina. La concentració local de DNA als cromosomes metafàsics imposa una restricció física general que cal considerar per a la validació dels models d'estructura de la cromatina.

### **SUMMARY**

Our present knowledge of the physical principles that allow the condensation of DNA into the chromosomes is very limited. The lengths of the DNA molecules of eukaryotic genomes are much greater than the dimensions of the metaphase chromosomes in which

they are contained during mitosis. From this observation it has been generally assumed that the linear packing ratio of DNA is an adequate measure of the degree of DNA compaction. In this chapter I consider different evidences indicating that the local concentration of DNA is more appropriate than the linear packing ratio for the study of chromatin condensation. The local concentration of DNA in metaphase chromosomes place a general physical constraint that must be considered for the validation of structural models for chromatin.

## CONDENSACIÓ DEL DNA ALS CROMOSOMES METAFÀSICS

La condensació de la cromatina per a formar els cromosomes visibles durant la mitosi va ser descrita en 1882 per Walther Flemming (Gall, 1996). Encara avui dia, però, els aspectes físics més bàsics de l'empaquetament del DNA dins els cromosomes són en gran part desconeguts. Coneixem amb elevada resolució l'estructura de la part central (partícula nucli) del nucleosoma (Luger *et al.*, 1997). El nucleosoma (format per histones associades al DNA) és tan sols la subunitat estructural fonamental de la cromatina (Wolffe, 1998). No estan resoltes les estructures de la resta de nivells estructurals que, en últim terme, permeten la condensació del DNA en el cromosoma metafàsic. Es tracta de complexos relativament irregulars, i d'una enorme massa molecular, per als quals han estat proposats diversos models de plegament (vegeu Daban, 1998; Roca, 1998; Woodcock i Dimitrov, 2001). En aquest capítol es presenta un estudi sobre restriccions físiques bàsiques que cal tenir en compte per a la validació dels diversos models proposats per a l'estructura de cromatina. Gran part del material que es presenta ha estat extret d'una publicació recent de l'autor d'aquest capítol (Daban, 2000).

## MESURA DEL GRAU DE COMPACTACIÓ DEL DNA

Molts autors fan servir la raó d'empaquetament lineal, definida com la relació entre la longitud del DNA estès i la longitud de l'estructura que conté aquest DNA, per a quantificar el nivell de compactació del DNA (Du-Praw, 1970; Wolffe, 1998; Lewin, 2000). Com que la longitud de les molècules de DNA que hi ha dins els cromosomes metafàsics és molt gran en comparació amb la longitud d'aquestes estructures biològiques, els valors trobats per a la raó d'empaquetament lineal són molt elevats. Per exemple, a la figura 1 es pot veure com en cadascun dels nivells de plegament considerats per Pienta i Coffey (1984) hi ha un gran augment de la raó d'empaquetament lineal. A la cromàtide corresponent al cromosoma metafàsic final, el valor absolut és superior a  $10^4$ .

Probablement, aquests valors tan elevats trobats per a la raó d'empaquetament lineal del DNA han fet que no es tractés adequadament el tema dels límits físics que tenen les estructures cromatíniques proposades pels diversos autors per a arribar a formar els cromosomes metafàsics. Tal com es veurà en els propers apartats, aquests límits físics es palesen clarament quan en lloc de considerar la raó d'empaquetament lineal es té en compte la concentració local de DNA en les estructures estudiades. La concentració local de DNA es defineix com la massa de DNA per unitat de volum de l'estructura biològica que conté aquest DNA.

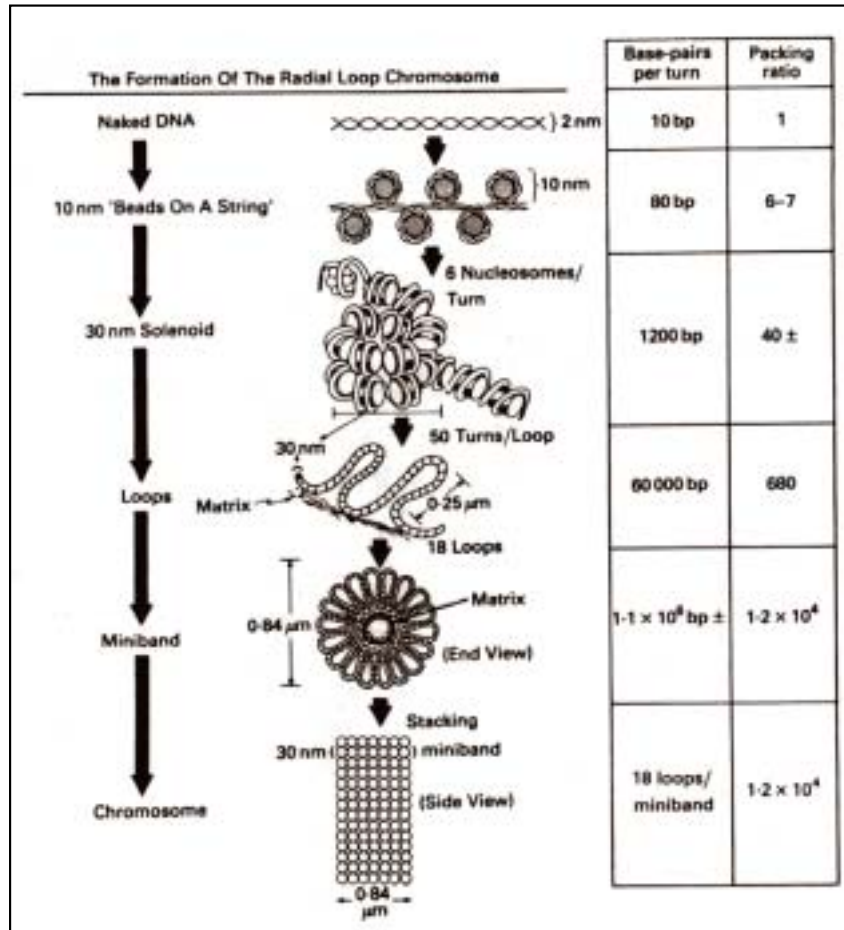


FIGURA 1. Model estructural per al cromosoma metafàsic proposat per Pienta i Coffey (1984). Es pot apreciar com cadascuna de les estructures cromatíniques successives considerades pels autors (nucleosomes/fibra de 30 nm solenoïdal/llaçades/cromàtide amb minibandes) produeix un notable augment de la raó d'empaquetament lineal del DNA (*packing ratio*). Reproducció autoritzada de Pienta i Coffey (1984), © 1984 The Company of Biologists Ltd.

### CONCENTRACIÓ LOCAL DEL DNA ALS CROMOSOMES DE DIVERSES ESPÈCIES

Tal com es pot veure a la taula 1, la concentració de DNA als nuclis de les cèl·lules eucariotes a la interfase és superior a la que es troba als nucleoides bacterians. El diàmetre dels nuclis és molt variable, però a les cèl·lules de nucli petit (~ 5 μm de diàmetre) la concentració de DNA pot arribar a ser

0,10 g/ml (equivalent a 0,10 pg/μm<sup>3</sup>). La concentració local de DNA als cromosomes metafàsics ha estat determinada per diversos tipus de cèl·lules en diversos laboratoris, fent servir diverses tècniques de microscòpia (Bennett *et al.*, 1983; Bohrmann *et al.*, 1993; Heslop-Harrison *et al.*, 1989; Fritzsche i Henderson, 1996). La mitjana dels valors obtinguts és 0,17 g/ml (Daban, 2000). Aquest valor és més elevat que l'observat als nuclis interfàsics, però resulta molt infe-

| Estructura                   | DNA<br>(g/ml) |
|------------------------------|---------------|
| Nucleoide bacterià (1)       | 0,02          |
| Nucli interfàsic (2,3)       | 0,10          |
| Cromosomes metafàsics        |               |
| fibroblasts humans (4,5)     | 0,16          |
| limfòcits humans (6)         | 0,12          |
| plantes monocotiledònies (4) | 0,18          |
| plantes dicotiledònies (4)   | 0,18          |
| <i>Euglena</i> (7)           | 0,20          |
| Espermatozoides              |               |
| <i>S. purpuratus</i> (8)     | 0,19          |
| ratolí (9)                   | 0,85          |
| Bacteriòfags (1,7)           | 0,80          |

TAULA 1. Concentració local de DNA en diverses estructures biològiques

(1) Kellenberger *et al.* (1986); (2) Lewin (2000); (3) Manuelidis i Chen (1990); (4) Bennett *et al.* (1983); (5) Heslop-Harrison *et al.* (1989); (6) Fritzsch i Henderson (1996); (7) Bohrmann *et al.* (1993); (8) Green i Poccia (1985); (9) Pogany *et al.* (1981). En el cas dels cromosomes humans, la concentració de DNA ha estat calculada considerant 3,5 pg (3.2·10<sup>9</sup> pb) de DNA per genoma haploide (Morton, 1991; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Per a més detalls vegeu Daban (2000).

rrior a la concentració de DNA que es troba als caps dels bacteriòfags. En diverses espècies estudiades (ratolins i alguns insectes) la concentració local de DNA en els nuclis espermàtics és tan elevada com en els bacteriòfags (Pogany *et al.*, 1981; Suzuki i Wakabayashi, 1988). Hi ha, però, una excepció coneguda: els caps dels espermatozoides de l'eriç de mar *Strongylocentrotus purpuratus* tenen una concentració local de DNA similar a la dels cromosomes metafàsics (Green i Poccia, 1985).

## LÍMITS FÍSICS PER A LA CONCENTRACIÓ LOCAL DE DNA ALS NUCLEOSOMES

Per què la concentració de DNA dels cromosomes metafàsics i del nucli espermàtic de *S. purpuratus* és tan petita en relació a la que s'observa als bacteriòfags o als espermatozoides de diverses espècies? La resposta a aquesta pregunta es troba en el fet que els cromosomes eucariòtics i els espermatozoides de *S. purpuratus* tenen el DNA associat a histones, i això, tal com veurem, limita notablement la concentració local assolible. En canvi, als bacteriòfags el DNA pot arribar a formar cristalls líquids amb una elevada concentració local (Lepault *et al.*, 1987), i als nuclis espermàtics de diverses espècies el DNA forma un complex amb protamines o altres proteïnes bàsiques no-histones que no impedeixen un empaquetament d'elevada densitat (Pogany *et al.*, 1981; Suzuki i Wakabayashi, 1988; Del Valle *et al.*, 1998).

A la partícula nucli del nucleosoma el DNA està enrotllat sobre l'octàmer d'histones i, en conseqüència, tan sols ocupa la part externa de l'estructura (figura 2a). Això fa que la concentració local de DNA estimada per a aquestes estructures sigui baixa (0,29 g/ml). Fins i tot quan es considera el nucleosoma completat amb el DNA d'unió, la concentració local de DNA és relativament baixa, uns 0,32-0,39 g/ml per nucleosomes amb 20-80 pb de DNA d'unió (Daban, 2000). La conclusió és, doncs, que, en contrast amb el que s'observa en el cas dels empaquetaments de DNA sense histones, l'estructura del nucleosoma fa que una part molt important del volum d'aquesta partícula no pugui ésser ocupada pel DNA.

Si els nucleosomes no canvien significativament les dimensions quan formen part d'estructures cromatíniques més comple-

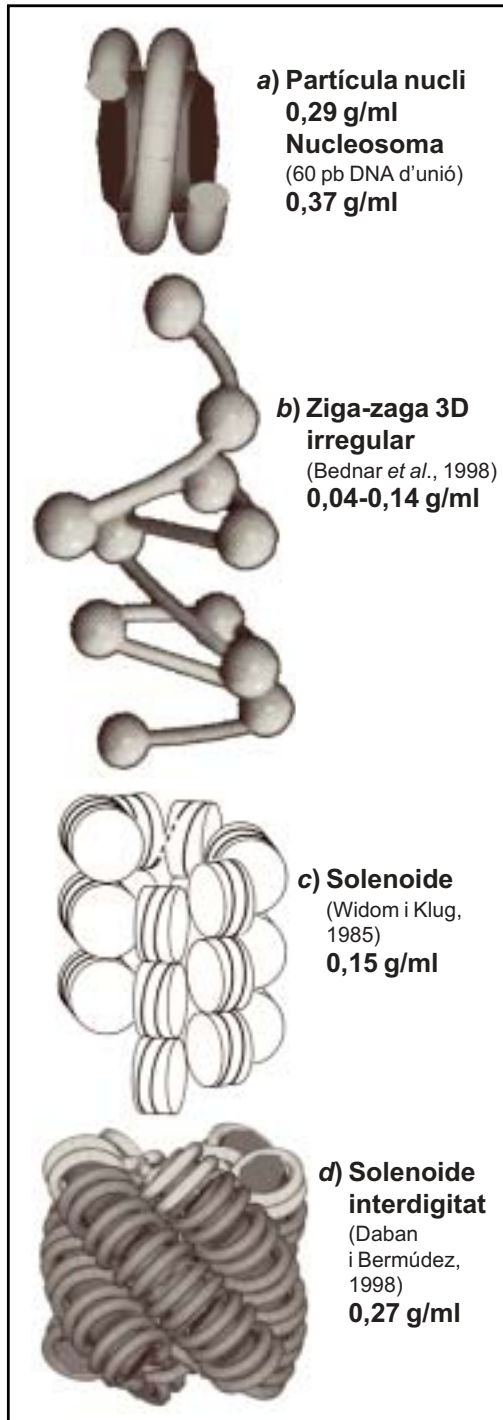


FIGURA 2. Estimació de la concentració local de DNA en els nucleosomes i en diversos models estructurals proposats per a les fibres de cromatina de 30-40 nm. *a*) Partícula nucli: DNA de 146 pb en un disc de 11 nm de diàmetre i 5,7 nm d'alçada (Luger *et al.*, 1997); nucleosoma: partícula nucli més 60 pb de DNA d'unió. *b*) Fibra de ~ 33 nm de diàmetre que conté, segons les condicions iòniques, entre 1,6 i 5,9 nucleosomes per 11 nm (Bednar *et al.*, 1998). *c*) Sis nucleosomes per 11 nm en una fibra de 32 nm de diàmetre (Widom i Klug, 1985). *d*) 13,6 nucleosomes per 11 nm en una fibra de 36 nm de diàmetre (Daban i Bermúdez, 1998). En *b*, *c* i *d* la concentració local de DNA ha estat estimada considerant que les fibres de cromatina són cilindres que tenen les dimensions i el nombre de nucleosomes indicats; en els càlculs s'ha considerat que tots els nucleosomes tenen 60 pb de DNA d'unió. Aquesta figura ha estat preparada a partir de reproduccions autoritzades de Bednar *et al.*, 1998 (*b*, © 1988 National Academy of Sciences, USA), Widom i Klug, 1985 (*c*, © 1985 Elsevier Science) i Daban i Bermúdez, 1998 (*a* i *d*, © 1998 American Chemical Society).

xes, les consideracions fetes en aquest apartat porten a una restricció física més general: en totes les estructures que es constitueixen a partir de nucleosomes la concentració local de DNA està limitada a un valor màxim de 0,3-0,4 g/ml.

#### CONCENTRACIÓ LOCAL DE DNA A LES FIBRES DE CROMATINA DE 30-40 nm

En el segon nivell de plegament de la cromatina, els nucleosomes formen una fibra que té un diàmetre de 30-40 nm (Daban, 1998). La concentració local de DNA estimada per a tres models representatius proposats per a aquestes fibres es presenta a la figura 2. En el model de plegament irregular de Bednar *et al.* (1998), els nucleosomes formen una ziga-zaga tridimensional que té el DNA d'unió estès a l'interior de la fibra (figura 2b). Aquest model està basat en estudis recents de criomicroscòpia electrònica que permeten detectar la posició dels nucleosomes individuals en fibres que tenen un baix nivell de compactació. En conseqüència, la

concentració local de DNA en aquest model és molt baixa (0,04 g/ml), però en condicions de força iònica intermèdia arriba a tenir una densitat de DNA superior (0,14 g/ml). Altres autors, a partir d'estudis de reconstrucció d'imatges de microscòpia electrònica (Subirana *et al.*, 1985), de dispersió de raigs X de sincrotró (Bordas *et al.*, 1986; Koch, 1989) i de microscòpia de força atòmica (Leuba *et al.*, 1994), han proposat models de plegament irregular amb el DNA d'unió estès que tenen concentracions locals de DNA compreses entre 0,06 i 0,15 g/ml. En el model del solenoide (Widom i Klug, 1985) el DNA d'unió es plega i els nucleosomes formen una hèlix senzilla (figura 2c). Aquest model està basat en estudis de microscòpia electrònica de transmissió i de difracció de raigs X i té una concentració local de DNA de 0,15 g/ml. El model més dens descrit fins ara és el del solenoide interdigitat compacte (0,27 g de DNA/ml). Aquest model, basat en estudis de petits fragments de cromatina mitjançant electroforesi no

desnaturalitzant en presència de  $Mg^{2+}$  i microscòpia electrònica de transmissió, considera que els successius pisos d'una hèlix primària de nucleosomes s'interdigiten i formen hèlixs secundàries que estan estabilitzades gràcies a la interacció lateral dels nucleosomes (figura 2d; Daban i Bermúdez, 1998).

Es pot veure, doncs, que la concentració de DNA està limitada per la disposició a l'espai dels nucleosomes en cadascun dels models de la fibra de cromatina. En tots els models proposats la concentració local de DNA a les fibres de 30-40 nm és inferior a la corresponent als nucleosomes isolats amb la mateixa longitud de DNA d'unió (figura 2, compareu *b*, *c* i *d* amb *a*). Les estimacions efectuades indiquen que fins i tot en el cas del model del solenoide interdigitat (Daban i Bermúdez, 1998), que és el més compacte, hi ha una part molt important del volum de la fibra (~ 27%) que no és ocupat pels nucleosomes. En el model del solenoide normal, i en altres models que tenen aproxima-

| MODELS                     | Nivells de plegament per sobre de la fibra de 30-40 nm |                               |           | Disminució de la concentració de DNA (%) |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------|------------------------------------------|
|                            | Primer                                                 | Segon                         | Tercer    |                                          |
| Amb llaçades (1-7)         | Llaçades                                               | Fibra intermèdia (200-300 nm) | Cromàtide | 21-37                                    |
| Helicoïdal múltiple (8-10) | Fibra intermèdia (200-400 nm)                          | Cromàtide                     |           | 53-77                                    |
| Irregular (11-12)          | Fibra intermèdia (60-80 nm)                            | Fibra intermèdia (100-130 nm) | Cromàtide | 25                                       |

TAULA 2. Nivells de plegament en diversos models estructurals proposats pels cromosomes metafàsics: estimació de la concentració local de DNA a l'estructura condensada final.

(1) Paulson i Laemmli (1977); (2) Boy de la Tour i Laemmli (1988); (3) Saitoh i Laemmli (1994); (4) Pienta i Coffey (1984); (5) Rattner i Lin (1985); (6) Manuelidis i Chen (1990); (7) Filipinski *et al.* (1990); (8) Bak *et al.* (1977); (9) Sedat i Manuelidis (1978); (10) Taniguchi i Takayama (1986); (11) Belmont *et al.* (1987); (12) Belmont i Bruce (1994). La disminució de concentració local de DNA, respecte a la fibra de 30-40 nm, ha estat calculada assumint un empaquetament hexagonal compacte de les fibres en cadascun dels nivells de plegament, i tenint en compte els forats centrals de les fibres únicament en els casos en els quals els autors dels treballs originals ho han indicat explícitament. Per a més detalls vegeu Daban (2000).



dament 0,15 g de DNA/ml, la fracció de volum no ocupada pels nucleosomes és propèra al 60 %. Aquestes observacions generen dubtes sobre la possibilitat de formar cromosomes condensats amb nucleosomes continguts en estructures que tenen una eficiència molt limitada per a aconseguir concentracions elevades de DNA.

### CONCENTRACIÓ LOCAL DE DNA ALS NIVELLS DE PLEGAMENT SUPERIORS A LES FIBRES DE 30-40 nm

Els models estructurals proposats per als cromosomes metafàsics consideren una sèrie progressiva de nivells de plegament que comencen en la fibra de 30-40 nm. A la taula 2 es pot veure que en el model de llaçades/bastida (*loops/scaffold*) proposat per Laemmli i col·laboradors (Paulson i Laemmli, 1977; Boy de la Tour i Laemmli, 1988; Saitoh i Laemmli, 1994), i en altres models que inclouen llaçades (Pienta i Coffey, 1984; Rattner i Lin, 1985; Manuelidis i Chen, 1990; Filipinski *et al.*, 1990), el primer nivell d'empaquetament per sobre de la fibra de 30-40 nm consisteix en el plegament d'aquesta fibra amb la formació d'unitats estructurals que contenen 50-100 kb de DNA. En aquests models la llaçada formada en el primer nivell dóna lloc a fibres intermèdies de 200-300 nm que constitueixen el segon nivell. Finalment, en el tercer nivell, les fibres intermèdies es pleguen helicoidalment i formen la cromàtide del cromosoma metafàsic. Hi ha altres autors que han proposat models amb un plegament helicoidal successiu sense llaçades inicials (Bak *et al.*, 1977; Sedat i Manuelidis, 1978; Taniguchi i Takayama, 1986). En aquests models tan sols hi ha dos nivells de plegament per sobre de la fibra de 30-40 nm: una fibra intermèdia de 200-400 nm i la cromàtide final. També s'ha proposat un model irregular (Belmont *et al.*, 1987; Bel-

mont i Bruce, 1994) en el qual hi ha tres nivells de plegament superiors a la fibra de 30-40 nm.

Almenys hi ha dos elements estructurals que poden reduir la concentració local de DNA als diversos nivells de plegament considerats a la taula 2. Primer, cal tenir en compte que en estructures condensades, com els cristalls, les molècules que s'empaqueten no poden ocupar tot l'espai. Per exemple, en el cas dels cristalls de proteïna, les molècules de proteïna tan sols ocupen aproximadament el 75 % del volum total (Schulz i Schirmer, 1979). Els cossos de forma aproximadament cilíndrica com el DNA s'empaqueten hexagonalment en els cristalls i en fibres parcialment ordenades (Lerman *et al.*, 1976; Cantor i Schimmel, 1980). L'empaquetament hexagonal és molt compacte, però la fracció de volum ocupat per les fibres és tan sols, aproximadament, el 91 %. En segon lloc, cal tenir en compte que moltes estructures biològiques de forma cilíndrica amb components helicoidals (microtúbuls, flagels i pili bacterians, virus de càpside helicoidal) tenen un forat al llarg de tot l'eix central (Alberts *et al.*, 1994). De fet, en diversos models per a l'estructura del cromosoma considerats a la taula 2, els autors indiquen explícitament l'existència de forats centrals en diversos nivells de plegament. Aquests forats també representen una pèrdua d'eficiència pel que fa a l'ocupació de l'espai per part de les fibres de cromatina.

Per exemple, en el cas del model de tipus llaçada/fibra intermèdia/cromàtide de Manuelidis i Chen (1990), es pot calcular que la disminució de concentració local de DNA que es deu als forats centrals és aproximadament del 12 %. Si a més es tenen en compte les pèrdues de concentració provocades per l'empaquetament helicoidal de les fibres dels tres nivells de plegament, el càlcul global indica que la concentració fi-

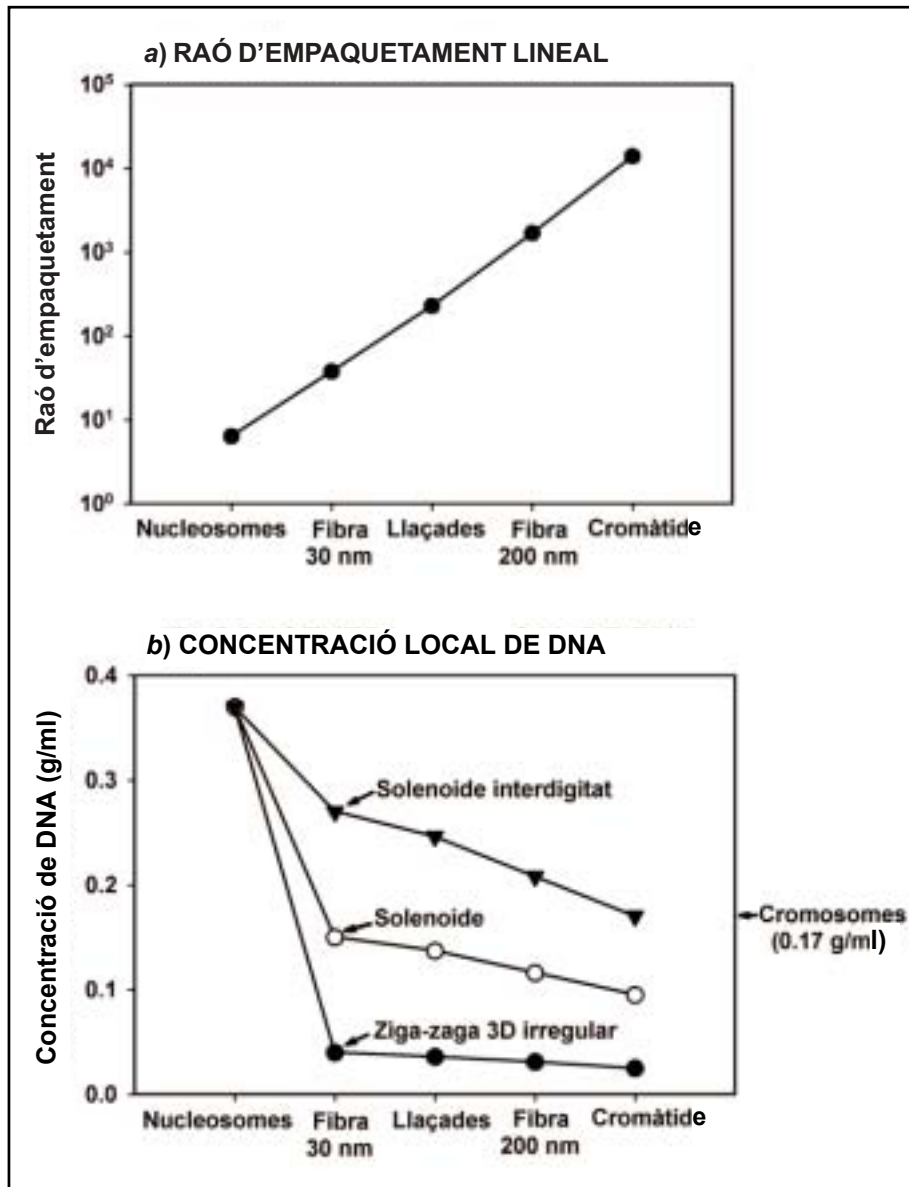


FIGURA 3. a) Augment de la raó d'empaquetament lineal en els successius nivells de plegament dels cromosomes metafàsics. b) Disminució de la concentració local de DNA en els diversos nivells de plegament dels cromosomes metafàsics. En ambdues figures els càlculs han estat fets considerant el model per al cromosoma metafàsic proposat per Manuelidis i Chen (1990). A la figura a, el model de fibra de cromatina de 30-40 nm que s'ha tingut en compte és el solenoide normal (figura 2c). Per a obtenir les tres corbes de la figura b, s'han considerat les concentracions locals de DNA corresponents als tres models per a la fibra de 30-40 nm presentats a la figura 2 b i d.



nal de DNA, en aquest model concret, és aproximadament un 37 % inferior que a la fibra de 30-40 nm. Les estimacions fetes a la taula 2 corresponen a les disminucions mínimes de concentració local de DNA corresponents als diversos models considerats. Els valors obtinguts indiquen que hi ha una notable disminució de la concentració local de DNA quan les fibres de cromatina de 30-40 nm es pleguen per a formar les cromàtides condensades del cromosoma metafàsic. La mitjana dels valors obtinguts pels diversos models considerats correspon a una disminució de concentració del 40 % (Daban, 2000).

#### LA RAÓ D'EMPAQUETAMENT LINEAL NO ÉS ADEQUADA PER A LA VALIDACIÓ DE MODELS ESTRUCTURALS DE LA CROMATINA

El conjunt d'observacions fetes als apartats anteriors indiquen que en cadascun dels nivells de plegament del DNA, que porten des dels nucleosomes fins als cromosomes metafàsics, hi ha una disminució significativa de la concentració local de DNA. La concentració relativament alta de DNA en el nucleosoma (~ 0,37 g/ml; figura 2a) es redueix molt quan aquestes partícules formen la fibra de cromatina de 30-40 nm (0,04-0,27 g/ml; figura 2b-d), i després encara es redueix un 40 % més al final de la sèrie de plegaments que es consideren en els diferents models proposats pels cromosomes metafàsics (taula 2).

En contrast amb aquestes observacions fetes respecte a la concentració local de DNA, hi ha el conegut fet que la raó d'empaquetament lineal augmenta molt en tots els nivells de plegament que porten a la formació de les cromàtides dels cromosomes metafàsics. A l'apartat 2 s'han considerat el remarcable augment dels valors de la raó

d'empaquetament lineal corresponents al model de Pienta i Coffey (1984) presentat a la figura 1. Es troben resultats molt semblants (vegeu la figura 3a) quan els càlculs es fan amb el model de Manuelidis i Chen (1990). Aquests resultats són particularment representatius perquè aquest model es pot considerar com una síntesi dels models estructurals que inclouen llaçades i una fibra intermèdia abans d'arribar al nivell de cromàtide (taula 2). Es pot concloure doncs que existeix una aparent paradoxa entre la raó d'empaquetament lineal i la concentració local de DNA, de tal manera que l'augment de la primera magnitud va acompanyat d'una disminució de la concentració local de DNA que, *a priori*, era inesperada. De fet, quan tan sols es té en compte la raó d'empaquetament lineal, no es descobreixen les limitacions físiques que tenen els diversos nivells de plegament de la cromatina per a arribar a formar cromosomes condensats.

Aquestes observacions impliquen la necessitat de revalorar moltes consideracions prèvies sobre la possibilitat de formar cromosomes metafàsics amb els diversos models proposats per a l'estructura de les fibres de cromatina. La revaloració dels models de cromatina ha de tenir en compte dos factors: a) la restricció general imposada per les dades experimentals disponibles sobre la concentració local de DNA als cromosomes metafàsics (0,17 g/ml); b) les disminucions de concentració local de DNA que es produeixen en els successius nivells de plegament de la cromatina.

A la figura 3b es presenten els càlculs de concentració local de DNA efectuats amb els tres models d'estructura de la fibra de cromatina de 30-40 nm considerats a la figura 2b-2d. Es pot veure que el model irregular de baixa densitat dóna una concentració local de DNA a la cromàtide final que és molt més petita que la corresponent

als cromosomes metafàsics reals. Quan aquest tipus de model parteix d'una fibra més densa pot arribar a concentracions locals de DNA semblants a les trobades amb el model del solenoide normal. També en el cas del solenoide normal, però, la concentració de DNA a la cromàtide final és menor que la del cromosoma (amb aquest model tan sols s'arriba aproximadament al 50 % de la concentració de DNA necessària per a formar cromosomes). Únicament el model del solenoide interdigitat compacte té una concentració local de DNA prou elevada per a permetre que, després de tots els nivells de plegament, es formi una cromàtide amb una densitat de DNA propera als valors experimentals trobats per als cromosomes condensats.

## AGRAÏMENTS

Les figures per a aquest treball han estat preparades al Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona. Aquest treball ha estat subvencionat en part amb els ajuts PB98-0858 (Direcció General de Investigación) i 2000SGR65 (Generalitat de Catalunya).

## BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS, B.; D. BRAY; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS; J. D. WATSON (1994). *Molecular biology of the cell*. Nova York: Garland Publishing.
- BAK, A. L.; J. ZEUTHEN; F. H. C. CRICK (1977). «Higher-order structure of human mitotic chromosomes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 74, pàg. 1595-1599.
- BEDNAR, J.; R. A. HOROWITZ; S. A. GRIGORYEV; L. M. CARRUTHERS; J. C. HANSEN; A. J. KOSTER; C. L. WOODCOCK (1998). «Nucleosomes, linker DNA, and linker histones form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 95, pàg. 14173-14178.
- BELMONT, A. S.; K. BRUCE (1994). «Visualization of G1 chromosomes: A folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure». *J. Cell Biol.*, núm. 127, pàg. 287-302.
- BELMONT, A. S.; J. W. SEDAT; D. A. AGARD (1987). «A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: Evidence for a complex hierarchical organization». *J. Cell Biol.*, núm. 105, pàg. 77-92.
- BENNETT, M. D.; J. S. HESLOP-HARRISON; J. B. SMITH; J. P. WARD (1983). «DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals». *J. Cell Sci.*, núm. 63, pàg. 173-179.
- BOHRMANN, B.; M. HAIDER; E. KELLENBERGER (1993). «Concentration evaluation of chromatin in unstained resin-embedded sections by means of low-dose ratio-contrast imaging in STEM». *Ultramicroscopy*, núm. 49, pàg. 235-251.
- BORDAS, J.; L. PEREZ-GRAU; M. H. J. KOCH; M. C. VEGA; C. NAVE (1986). «The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. II. Theoretical analysis of the X-ray scattering patterns and model calculations». *Eur. Biophys. J.*, núm. 13, pàg. 175-185.
- BOY DE LA TOUR, E.; U. K. LAEMMLI (1988). «The metaphase scaffold is helically folded: Sister chromatids have predominantly opposite helical handedness». *Cell*, núm. 55, pàg. 937-944.
- CANTOR, C. R.; P. R. SCHIMMEL (1980). *Biophysical chemistry*. San Francisco: Freeman.
- DABAN, J.-R (1998). «Empaquetament funcional del DNA: El nucleosoma i les estructures d'ordre superior de la cromatina». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, núm. 48, pàg. 167-181.
- 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*, núm. 39, pàg. 3861-3866.
- DABAN, J.-R.; A. BERMÚDEZ (1998). «Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers». *Biochemistry*, núm. 37, pàg. 4299-4304.
- DEL VALLE, L.; P. GIMÉNEZ; N. SAPERAS; M. CHIVA (1998). «Empaquetament del DNA en els espermatozoides». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, núm. 48, pàg. 199-224.
- DUPRAW, E. J. (1970). *DNA and chromosomes*. Nova York: Holt, Rinehart and Winston, Inc.
- FILIPSKI, J.; J. LEBLANC; T. YOUNDALE; M. SIKORSKA; P. R. WALKER (1990). «Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures». *EMBO J.*, núm. 9, pàg. 1319-1327.
- FRITZSCHE, W.; E. HENDERSON (1996). «Volume determination of human metaphase chromosomes by scanning force microscopy». *Scanning Microsc.*, núm. 10, pàg. 103-110.
- GALL, J. G (1996). *Views of the cell*. Bethesda: The American Society for Cell Biology.

- GREEN, G. R.; D. L. POCCIA (1985). «Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation». *Dev. Biol.*, núm. 108, pàg. 235-245.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; A. R. LEITCH; T. SCHWARZACHER; J. B. SMITH; M. D. ATKINSON; M. D. BENNETT (1989). «The volumes and morphology of human chromosomes in mitotic reconstructions». *Hum. Genet.*, núm. 84, pàg. 27-34.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). «Initial sequencing and analysis of the human genome». *Nature*, núm. 409, pàg. 860-921.
- KELLENBERGER, E.; E. CARLEMALM; J. SECHAUD; A. RYTER; G. DE HALLER (1986). «Considerations on the condensation and degree of compactness in non-eukaryotic DNA-containing plasmas». A: Gualerzi, C. O.; Pon, C. L. *Bacterial chromatin*. Berlin: Springer-Verlag, pàg. 11-25.
- KOCH, M. H. J. (1989). «Structure and condensation of chromatin». A: Saenger, W.; Heinemann, U. *Protein-nucleic acid interaction*. London: McMillan Press, pàg. 163-204.
- LEPAULT, J.; J. DUBOCHET; W. BASCHONG; E. KELLENBERGER (1987). «Organization of double-stranded DNA in bacteriophages: A study by cryo-electron microscopy of vitrified samples». *EMBO J.*, núm. 6, pàg. 1507-1512.
- LERMAN, L. S.; L. S. WILKERSON; J. H. VENABLE; B. H. ROBINSON (1976). «DNA packing in single crystals inferred from freeze-fracture-etch replicas». *J. Mol. Biol.*, núm. 108, pàg. 271-293.
- LEUBA, S. H.; G. YANG; C. ROBERT; B. SAMORI; K. VAN HOLDE; J. ZLATANOVA; C. BUSTAMANTE (1994). «Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 11621-11625.
- LEWIN, B. (2000). *Genes VII*. Oxford: Oxford University Press.
- LUGER, K.; A. W. MÄDER; R. K. RICHMOND; D. F. SARGENT; T. J. RICHMOND (1997). «Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution». *Nature*, núm. 389, pàg. 251-260.
- MANUELIDIS, L.; T. L. CHEN (1990). «A unified model of eukaryotic chromosomes». *Cytometry*, núm. 11, pàg. 8-25.
- MORTON, N. E. (1991). «Parameters of the human genome». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 7474-7476.
- PAULSON, J. R.; U. K. LAEMMLI (1977). «The structure of histone-depleted metaphase chromosomes». *Cell*, núm. 12, pàg. 817-828.
- PIENTA, K. J.; D. S. COFFEY (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.*, núm. 1, pàg. 123-135.
- POGANY, G. C.; M. CORZETT; S. WESTON; R. BALHORN (1981). «DNA and protein content of mouse sperm». *Exp. Cell Res.*, núm. 136, pàg. 127-136.
- RATTNER, J. B.; C. C. LIN (1985). «Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes». *Cell*, núm. 42, pàg. 291-296.
- ROCA, J. (1998). «Dinàmica del DNA en el cromosoma». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, núm. 48, pàg. 183-197.
- SAITOH, Y.; U. K. LAEMMLI (1994). «Metaphase chromosome structure: Bands arise from differential folding path of the highly AT-rich scaffold». *Cell*, núm. 76, pàg. 609-622.
- SCHULZ, G. E.; R. H. SCHIRMER (1979). *Principles of protein structure*. Nova York: Springer-Verlag.
- SEDAT, J.; L. MANUELIDIS (1978). «A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes». *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, núm. 42, pàg. 331-350.
- SUBIRANA, J. A.; S. MUÑOZ-GUERRA; J. AYMAMÍ; M. RADERMACHER; J. FRANK (1985). «The layered organization of nucleosomes in 30 nm chromatin fibers». *Chromosoma*, núm. 91, pàg. 377-390.
- SUZUKI, M.; T. WAKABAYASHI (1988). «Packaging of DNA in cricket sperm. A compact mode of DNA packaging». *J. Mol. Biol.*, núm. 204, pàg. 653-661.
- TANIGUCHI, T.; S. TAKAYAMA (1986). «Higher-order structure of metaphase chromosomes: Evidence for a multiple coiling model». *Chromosoma*, núm. 93, pàg. 511-514.
- WIDOM, J.; A. KLUG (1985). «Structure of the 300 Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples». *Cell*, núm. 43, pàg. 207-213.
- WOLFFE, A. (1998). *Chromatin structure and function*. Londres: Academic Press.
- WOODCOCK, C. L.; S. DIMITROV (2001). «Higher-order structure of chromatin and chromosomes». *Curr. Opin. Gen. Dev.*, núm. 11, pàg. 130-135.