



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

“Organización y estructura del cromosoma eucariota durante mitosis”

Alumna: Cristina García Merino

Julio, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN BIOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

“Organización y estructura del cromosoma eucariota durante mitosis”

Alumna: **Cristina García Merino**



Cristina García Merino

Julio, 2020

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL CROMOSOMA DURANTE MITOSIS	10
2.1. Primeros estudios, finales del siglo XX y comienzos del siglo XXI	
10	
2.1.1. Modelos de plegamiento cromosómico	15
2.2. Finales 2000 hasta la actualidad.....	17
3. EUCARIOTAS	23
3.1. Simples	23
3.2. Superiores	24
4. CONCLUSIÓN Y VISIÓN FUTURA	26
5. BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

El estudio del cromosoma mitótico ha sido un constante a lo largo de los años. La falta de medios y controversias que aparecían en diferentes investigaciones han impedido aclarar los niveles de plegamiento cromosómico durante la mitosis. En este trabajo se revisa, desde una perspectiva histórica, cómo ha ido progresando el entendimiento del cromosoma en organismos eucariotas desde los estudios clásicos hasta la actualidad, tras el desarrollo de la tecnología y el uso de técnicas nuevas que han tenido un impacto directo sobre la comprensión de la condensación cromosómica. Además, también se lleva a cabo una comparativa entre organismos eucariotas para analizar el grado de conservación evolutiva de este proceso.

Palabras clave: “cromosoma”, “mitosis”, “ciclo celular”, “plegamiento cromosómico”.

ABSTRACT

The research of the mitotic chromosome has been constant through the years. Due to the lack of means and controversies that arose after different studies it has been difficult to explain the higher-order levels of the chromosome folding during mitosis. In this project it is reviewed, from an historical perspective, how the chromosome understanding in eukaryotic has progressed since the classical studies to nowadays, after the technology outbreak and the use of the new methods that have had a direct impact on our knowledge in chromosomal condensation, wrapping up with a small comparative between eukaryotic organisms from a conservative evolutionary perspective.

1. INTRODUCCIÓN

El ciclo celular es un proceso mediante el cual, para poder dividirse y obtener dos hijas que porten su material genético, las células crecen, se desarrollan y pasan por diferentes procesos de regulación. Las fases de este ciclo son G1, S, G2 y M; las tres primeras se agrupan en la llamada interfase, correspondiendo así la M a mitosis (Schafer, 1998). Conforme el ciclo celular avanza y se aproxima a la fase M, el material genético dispuesto en forma de cromatina se reorganiza e inicia un proceso de condensación para dar lugar a unas estructuras más compactas, denominadas cromosomas, con función esencial para mantener la estabilidad genómica durante la división celular mitótica (Yusuf *et al.*, 2019).

Como resumen breve del ciclo celular, cabe mencionar que durante la fase G1 o GAP-1 la célula se prepara para la síntesis o replicación del ADN que tiene lugar durante la fase S posterior (Schafer, 1998). Esta preparación consiste en un crecimiento celular en el que se sintetizan macromoléculas como proteínas, RNA y diferentes membranas (Poon, 2016) que son fundamentales para el proceso de replicación de ADN en la fase siguiente (Harashima *et al.*, 2013). En fase G2 o GAP-2, la célula se vuelve a preparar, en este caso, para la mitosis. En la mitosis tiene lugar la segregación de cromátidas hermanas para formar dos células hijas nuevas (Harashima *et al.*, 2013). También hay una quinta fase, llamada G0, en la que la célula no está activamente en el ciclo (Schafer, 1998).

El ciclo celular está altamente regulado principalmente por la actividad conjunta de proteínas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (*Ciclyn-Dependent-Kinases*, CDKs) (Malumbres, 2014). Estas últimas son proteínas quinasas de serina/treonina y son muy importantes porque su actividad de fosforilación coordinada sobre un conjunto de proteínas diana regula positiva o negativamente la mitosis. Son cinco las CDKs que participan activamente en el ciclo celular (Vermeulen, 2003), como se ve ilustrado en la Figura 1. A su vez, estas CDKs están reguladas por el estado de fosforilación o desfosforilación en el que se encuentren sus residuos de treonina y tirosina (Malumbres, 2014).

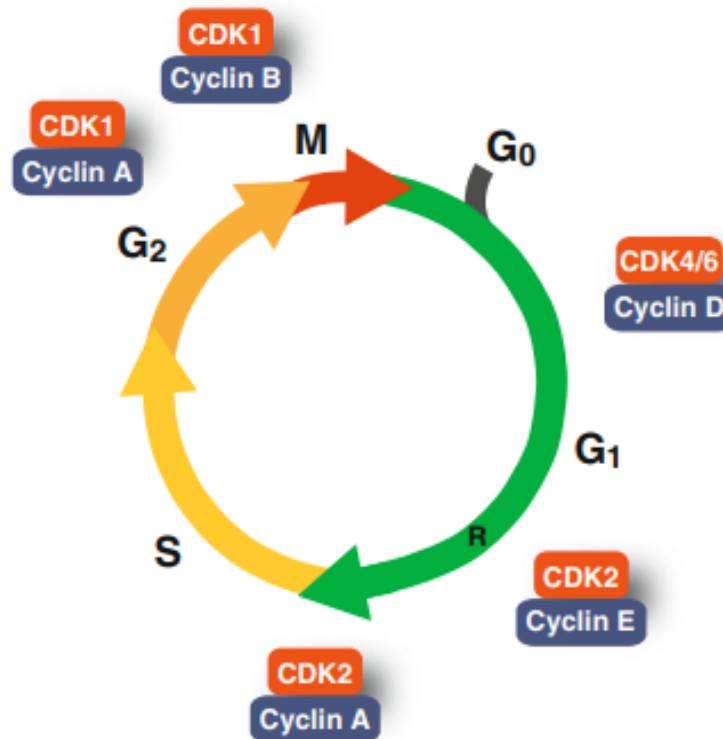


Figura 1. Esquema del ciclo celular y sus diferentes fases junto a las ciclinas que actúan en cada una de ellas. Imagen obtenida de (Poon, 2016).

Hay que señalar tres puntos de regulación o restricción importantes en la progresión del ciclo celular. Éstos se dan al final de G₁, al final de G₂ y dentro de la fase fase M, justo antes de iniciarse la anafase (Schafer, 1998). El primer punto de restricción también está llamado punto de no retorno (Vermeulen, 2003) y está relacionado con los factores de crecimiento; al principio de la fase G₁ si hay algún error con estos factores, la célula vuelve a la fase G₀, pero si la célula ya ha pasado el punto de regulación, la ausencia de los factores de crecimiento no influye en el ciclo y la célula entra en fase S con normalidad. Está regulado principalmente por el gen pRb (proteína del retinoblastoma) (Lindqvist *et al.*, 2009).

El segundo punto de regulación se produce a raíz del daño en el ADN. Para evitar que las mutaciones producidas por este daño sean propagadas, la propia célula en G₂ es capaz de parar el ciclo celular antes de entrar en mitosis (Schafer, 1998). Tras la reparación del ADN, el ciclo celular comienza de nuevo, aunque debido a las modificaciones causadas en el ADN, tanto la actividad como

los niveles proteicos que desencadenan la entrada a mitosis son diferentes a los que tendría la célula si no hubiera sufrido ninguna modificación (Lindqvist *et al.*, 2009).

El último punto de regulación está en la metafase. El ciclo celular se detiene si el alineamiento cromosómico es erróneo, evitándose así la aparición de aneuploidías e inestabilidad genómica (Vermeulen, 2003).

La mitosis es la última fase del ciclo celular, divide el mismo material genético en dos células hijas idénticas. Este proceso se divide en cinco fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Hay una sexta fase llamada citocinesis que se solapa parcialmente con la mitosis, pero realmente está fuera del ciclo celular (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

La mayor condensación que hay durante la mitosis con respecto a la interfase se debe a que esto facilita tanto el alineamiento de los cromosomas, su movimiento por el huso acromático y la segregación de las cromátidas (Nagano *et al.*, 2017). La división celular es un proceso altamente regulado al ser, por una parte, fundamental para la supervivencia del organismo como, por otra parte, muy propenso a tener errores que pueden ser letales (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

La primera fase de la división nuclear es la profase. En ella, la condensación de la cromatina vuelve visibles los

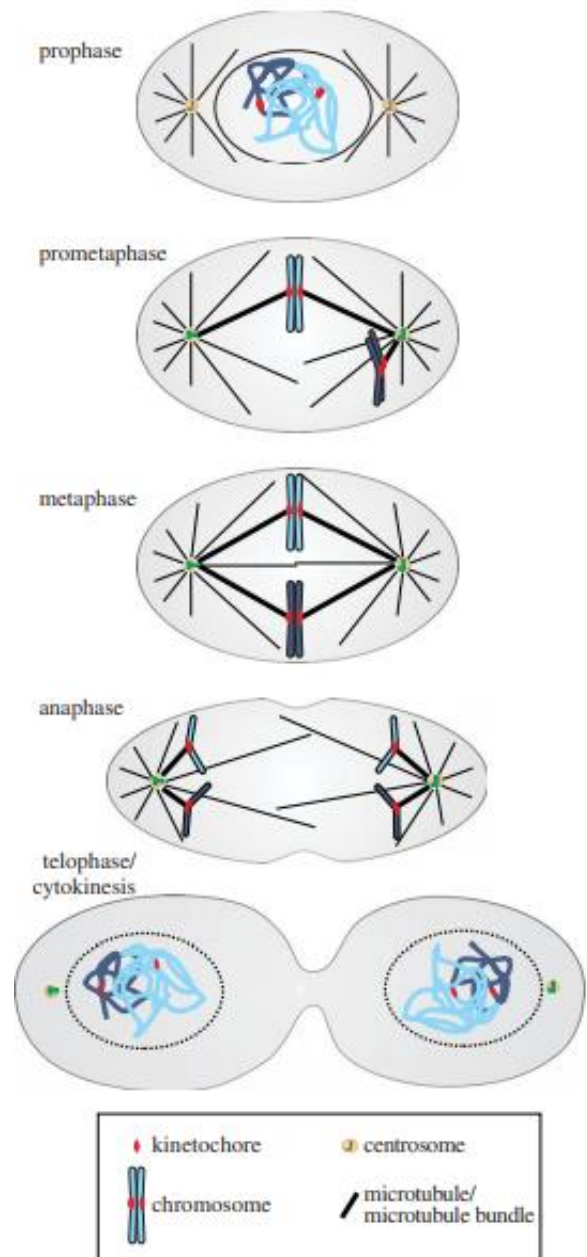


Figura 2. Las cinco fases de la mitosis. Imagen obtenida de (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

cromosomas, formados por dos cromátidas hermanas (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014). A medida que las fibras de ADN que forman la condensina se van compactando, la longitud de los cromosomas va disminuyendo, al igual que, por el contrario, su grosor aumenta (Mcintosh, 2016). Los microtúbulos cambian de conformación: pasan de ser más largos y relativamente estáticos durante la interfase a tener una longitud corta y un alto dinamismo. Los centrosomas se separan durante la profase hacia los polos opuestos y son los encargados de organizar los microtúbulos en la mayoría de las células de origen animal. A raíz de esta conformación, el huso mitótico está formado y listo para ejecutar su función, una vez que la membrana nuclear se desintegre (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

Hay una fase entre la profase y la metafase llamada prometafase, la cual da comienzo tras la rotura de la envoltura nuclear de la célula. Durante la formación del huso mitótico, los microtúbulos van sufriendo una polimerización y despolimerización alterna al anclarse en el cinetocoro de cada cromosoma. El cinetocoro es una estructura proteica especializada en reforzar la unión entre el cromosoma y el microtúbulo (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014). El cinetocoro tiene actividad quinasa, permitiéndole formar parte de un punto de control capaz de impedir el inicio de la anafase hasta que todos los cromosomas están unidos al huso acromático (Mcintosh, 2016). Otro nombre para este cinetocoro y la estructura que forma es *k-fibre* debido a que se suele unir en la mayoría de los organismos a más de un microtúbulo, formando así una red. Primero hay una unión monotélica, en la que se une el microtúbulo solamente al cinetocoro de una cromátida hermana. Después se convierte en anfitélica, en la que ambos cinetocoros están unidos a microtúbulos de diferentes polos de la célula y ya se desplaza el cromosoma hacia el ecuador del huso acromático; esto puede ocurrir al revés, el desplazamiento al ecuador primero y después la unión anfitélica (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

La metafase está caracterizada por la formación de la placa metafásica, que es el alineamiento de los cromosomas en el ecuador. Una vez se completa el alineamiento, las cromátidas hermanas comienzan a separarse hacia los distintos polos del huso mitótico, dando comienzo así la anafase. Para ello debe

ocurrir la eliminación de la zona del centrómero del complejo cohesina, un complejo multiprotéico que se ha encargado de mantener unidas ambas cromátidas hermanas justo hasta este momento (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

Este proceso ocurre en la siguiente fase, la anafase. En ella, ambas cromátidas hermanas pueden ser llamadas cromosomas individuales al haber sido separados. Esta anafase se divide en dos etapas. En la anafase A, disminuye la distancia de cada cromosoma del polo celular hacia el que está orientado (Mcintosh, 2016) gracias a la acción de los microtúbulos de origen cinetocórico, que tiran del cromosoma hacia el polo (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014). En la anafase B son los propios centrosomas los que se separan y ayudan al distanciamiento cromosómico (Mcintosh, 2016). En la mayoría de los organismos, ambas fases tienen un solapamiento temporal (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

Finalmente, en la telofase, la descondensación cromosómica comienza junto a la síntesis de la envoltura nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas en sus respectivos polos. De esta manera obtenemos dos células hijas que han abandonado la telofase y pasan a estar en interfase. Como ya se ha mencionado anteriormente, la citocinesis debe completarse simultáneamente para que la división mitótica sea completa, para lo que debe crearse un anillo contráctil formado por actina y miosina y que estrangula por el ecuador a la célula, dividiéndola así en dos células hijas independientes (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

La segregación de las cromátidas hermanas depende de las interacciones entre los microtúbulos del huso acromático y los cromosomas. La mitosis también ha atraído a científicos fuera del área de la biología, como físicos y matemáticos, interesados por el dinamismo y las fuerzas implicadas en la mitosis. Estos cálculos matemáticos y modelos cuantitativos han sido muy útiles a la hora de poder comprender el proceso mitótico; gracias a ellos se han podido entender en la actualidad aspectos más específicos, además de lo previamente conocido,

como por ejemplo la motilidad de los cromosomas en el huso acromático durante la metafase y la anafase (Civelekoglu-Scholey & Cimini, 2014).

2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL CROMOSOMA DURANTE MITOSIS

2.1. Primeros estudios, finales del siglo XX y comienzos del siglo XXI

La estructura cromosómica durante la mitosis fue de las primeras estructuras celulares observadas en el siglo XIX (revisado Swedlow, & Hirano, 2003). El primer científico en describir el cromosoma fue Carl Wilhelm von Nägeli, un botánico suizo, que describió los cromosomas como “citoblastos transitorios” en torno a 1840. Posteriormente, fue en 1888 cuando se originó el término “cromosoma”, que significa cuerpo que se tiñe (del griego *chromos*, que significa color, y *soma*, cuerpo), después de que unas tinciones a mano realizadas por Waldeyer permitieran distinguirlos mejor (revisado Kannan & Zilfalil, 2009). Los cromosomas condensados se creían similares a la heterocromatina visible durante la interfase. Posteriormente, se pudo comprobar que esta estructura cromosómica aglomerada durante la mitosis está condensada y es completamente diferente a la estructura existente durante la interfase (Swedlow, & Hirano, 2003).

Morfológicamente, pronto se observó que los cromosomas tienen diferentes dominios funcionales. El centrómero o constricción primaria es la región donde se organiza el cinetocoro, siendo éste fundamental como sitio de anclaje entre el huso mitótico y el cromosoma y permitir así el movimiento durante la mitosis (Ohta *et al.*, 2011). Existen dos tipos de cromosomas según la organización del centrómero. Los holocéntricos, en los que el centrómero está situado a lo largo del cromosoma, y metacéntricos, en los que el centrómero está en una región específica actuando como constrictor en el cromosoma (Belmont, 2006).

Otro dominio son los telómeros, situados en los extremos de cada brazo cromosómico, protegen al cromosoma y evitan fusiones aberrantes (Ohta *et al.*, 2011). Por otra parte, la superficie cromosómica está protegida por la capa

pericromosomal, que contiene proteínas cuyas con funciones muy diversas. Algunas de estas proteínas son simplemente estructurales y otras participan en procesos celulares importantes, como la síntesis de ARNm o el mantenimiento de los telómeros. (Van Hooser *et al.*, 2006).

El mecanismo regulador que determina la formación del cromosoma metafásico ha fascinado desde un primer momento a la comunidad científica y, a la vez, no termina de estar totalmente comprendido (Hirano, 1995). Este proceso se conoce con el nombre general de “condensación cromosómica”, y se refiere al proceso en el que la cromatina de la célula en interfase pasa a convertirse en estructuras con forma de bastón visibles al microscopio óptico durante la mitosis (Swedlow, & Hirano, 2003).

El conocimiento sobre el proceso de condensación cromosómica y la estructura intrínseca de los mismos ha estado ligado y comenzó a entenderse a partir de estudios bioquímicos encaminados a identificar los elementos estructurales mayoritarios de los cromosomas (Hirano, 1995).

Para poder llevar a cabo este estudio de los cromosomas en mitosis, un aspecto fundamental era conseguir aislarlos del resto de componentes celulares, algo muy complejo dado su frágil estructura, la dificultad para separarlos de proteínas citoesqueléticas y el necesitar obtenerlos de manera “pura” (Hirano, 1995). Por lo tanto, para analizar *in vitro* los cromosomas de los mamíferos, intentaron diferentes estrategias con respecto a la observación cromosómica, como jugar con la solubilidad de algunas proteínas para eliminarlas del mismo o el uso de protocolos que provocaban una desorganización del cromosoma (Swedlow, & Hirano, 2003). Los cromosomas se extraían durante la metafase ya que se encuentran lo más compacto posible y el aislarlos en ese estado es un proceso sencillo. Mediante un inhibidor mitótico que rompe el huso y una solución hipotónica que aumenta el volumen celular, la muestra se fijaba para conservar mejor el cromosoma. El problema es que dicha fijación causaba una desnaturalización parcial y la precipitación de algunas proteínas (Ohta *et al.*, 2011).

Estos análisis se basan en estudios previos del grupo de Laemmli de finales de los 70 y los 80 basados en la purificación de los cromosomas en medios hipersalino (Paulson and Laemmli, 1977) y/o hipotónicos (Earnshaw and Laemmli, 1983). Estos estudios revelaron una estructura axial o un eje cromatídico, con lazos de ADN (Paulson and Laemmli, 1977) que solamente era visible en las fases finales de la mitosis, una vez que la condensación cromosómica era máxima (Swedlow, & Hirano, 2003).

Esta estructura axial evolucionó al concepto “scaffold” como la estructura principal de los cromosomas cuando estaban desprovistos de histonas (Adolph *et al.*, 1977). Se definió como una estructura proteica que seguía siendo insoluble aún después del aislamiento al que se sometía el cromosoma y el tratamiento con nucleasas (Hirano, 1995).

Asociada a esta estructura, el primer componente que se encontró fue la enzima Topoisomerasa II (Topo II), denominada en un principio como Sc1 (*Scaffold component-1*) (Swedlow & Hirano, 2003). Concretamente, Topo II aparece en el “scaffold” asociada a unas regiones llamadas SARs (*Scaffold-Associated Regions*) (Hirano, 1995).

Topo II es una enzima ATP-dependiente con la capacidad de inducir roturas transitorias en una hebra del ADN para permitir el paso, a través de la misma, de una segunda hebra de ADN, dejando sellada la rotura a continuación (Swedlow & Hirano, 2003). De esta manera, parece ser fundamental para asegurar la correcta condensación de la cromatina (Hirano, 1995).

Otros componentes no histónicos también definidos por Laemmli que estaban asociados al “scaffold” son la KIF4A y las condensinas (revisado en MacGregor *et al.*, 2019). KIF4A es una proteína también conocida como Sc3 que se asocia a los cromosomas durante la mitosis. En humanos, esta proteína tiene varias funciones pudiendo destacar la participación en la condensación cromosómica, la organización del huso y el alineamiento cromosómico.

Las condensinas se identificaron originalmente como Sc2, aunque no se sabía su papel relacionado con la organización cromosómica (Hirano, 1995). Se trata

de un complejo proteico formado por cinco subunidades y con un dímero en forma de V en su núcleo que pertenece a la familia de ATPasas SMC (*Structural Maintenance Chromosomes*) (Hirano, 2016). Las condensinas son uno de los componentes más abundantes en los cromosomas mitóticos, ya que son esenciales para que se lleve a cabo la mitosis (Hudson *et al.*, 2009). Sus dos subunidades principales son SMC4 y SMC2 (Swedlow & Hirano, 2003).

Hay dos complejos condensina diferentes. Ambas son necesarias para que la mitosis se lleve a cabo, pero están localizadas en lugares diferentes a lo largo del ciclo celular (Hudson *et al.*, 2009). La condensina I y la condensina II se diferencian en sus tres subunidades que no pertenecen a la familia SMC. La condensina I contiene CAPG, CAPH y CAPD2, uniéndose las tres a las cabezas de las subunidades SMC2 y SMC4. La condensina II, además de ambas SMC, por otro lado, tiene CAPG2, CAPH2 y CAPD3 (Moser & Swedlow, 2011).

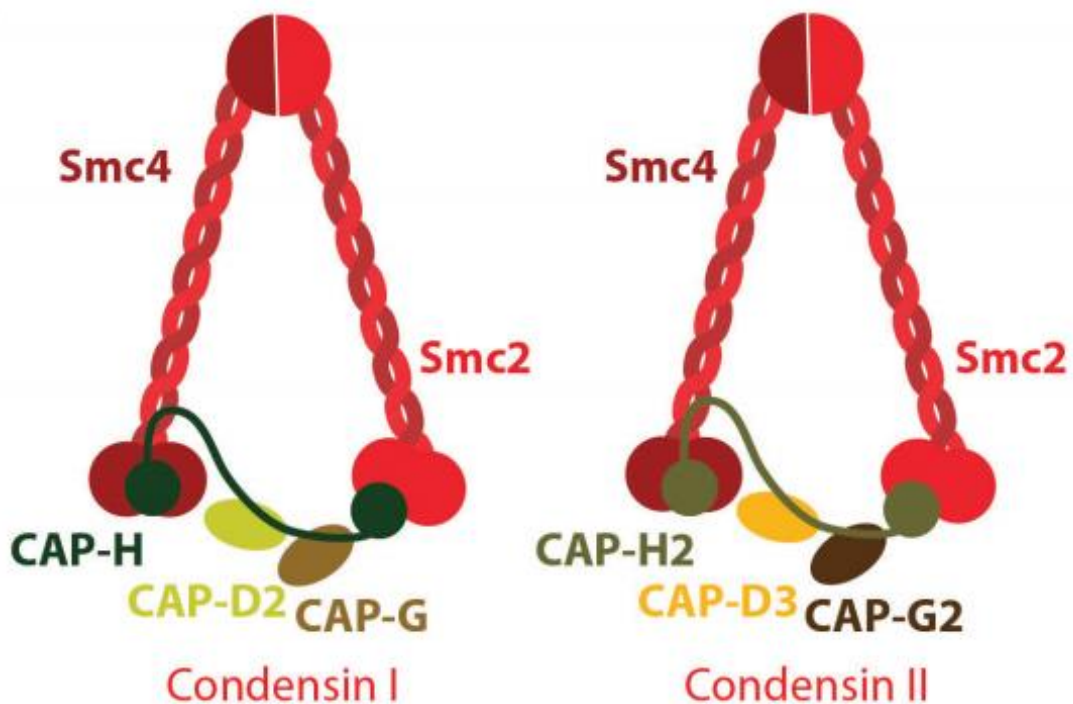


Figura 3. Dos tipos de complejos condensina. Imagen sacada de (Piskadlo & Oliveira, 2016).

El complejo condensina se sitúa a lo largo de los brazos cromosómicos (Ohta *et al.*, 2011), aunque su otra característica que diferencia a ambos complejos es su

localización durante el ciclo celular. La condensina I permanece en el citoplasma durante la interfase, y solamente interactúa con la cromatina tras la rotura de la envoltura nuclear (Moser & Swedlow, 2011), liberándose más tarde al final de la telofase (Hudson *et al.*, 2009). Por otro lado, la condensina II permanece en el núcleo durante la interfase pero hasta la mitosis no interactúa con la cromatina, hasta que termina la telofase (Hudson *et al.*, 2009).

La condensina I se une a regiones de la cromatina específicas, alternándose con la condensina II; se ha observado a la condensina I uniéndose a histonas H1 y H3, mientras que la condensina II se une a la H4 (Moser & Swedlow, 2011). Se especula que una de las funciones de la condensina I es asegurar la acción de la condensina II al condensar las fibras de cromatina que esta se haya dejado (Antonin & Neumann, 2016).

Gracias a los estudios genéticos y bioquímicos que se llevaron a cabo durante estos años, se pudo saber que las ya mencionadas proteínas SMC tenían una función esencial durante la condensación de los cromosomas mitóticos, aunque su manera de actuar no estaba clara más allá de su capacidad de “compactación” y la continua necesidad de su presencia para mantener la estructura cromosómica (Hirano, 1995).

Otro complejo con proteínas de la familia SMC es la cohesina, encargada de mantener unidas las cromátidas hermanas tras la replicación (Moser & Swedlow, 2011). Este complejo está formado por dos proteínas SMC (SMC1 y SMC2) y proteínas que no pertenecen a esta familia, SCC1 (*Sister Chromatid Cohesion protein 1*) y SCC3 (*Sister Chromatid Cohesion protein 3*) (Moser & Swedlow, 2011).

Esta familia de proteínas SMC fue descubierta mediante investigaciones *in vitro* y, tras varios experimentos de disrupción génica, se pudo saber que los miembros de esta familia de proteínas tenían un papel muy importante en el crecimiento mitótico (Hirano, 1995).

Así, identificar los complejos de condensinas y Topo II como los principales componentes del scaffold cromosómico, fue un primer gran paso para empezar a entender mejor los factores que regulaban, y sentó las bases para las teorías sobre niveles de plegamiento de los cromosomas mitóticos (Hirano, 1995).

2.1.1. Modelos de plegamiento cromosómico

Además de identificar los componentes estructurales de los cromosomas, otra cuestión principal es entender cómo se organiza y pliega la cromatina en su interior, teniendo en cuenta que se deben alcanzar niveles de compactación de 10.000-20.000 órdenes de magnitud (en comparación con la molécula de ADN en estado lineal) (revisado en Swedlow y Hirano, 2003).

Una de las bases que ayudaron a empezar a entender el plegamiento de la cromatina fue descubrir su unidad básica, es decir, el nucleosoma. De esta manera se forma una estructura lineal de 6 o 7 plegamientos con la fibra de doble cadena del ADN, formando así el primer nivel de plegamiento cromosómico (revisado en Swedlow, & Hirano, 2003).

El siguiente nivel de plegamiento de la cromatina sería el que llamaban de “30 nm”. Esta estructura no está muy bien descrita, y hace referencia al enrollamiento de la cromatina sobre sí misma para formar el siguiente nivel de plegamiento cromosómico. A partir de este nivel de 30 nm se deben organizar otros superiores que permitan alcanzar los 10000/20000 órdenes de magnitud final que alcanza la condensación de los cromosomas en metafase. Se han propuesto diferentes nombres para esta estructura de 30 nm, como estructura solenoide, zigzag o de fibras cruzadas (revisado en Swedlow & Hirano, 2003).

Hay propuesto un tercer nivel de plegamiento superior que corresponde a la estructura solenoide enrollada helicoidalmente sobre sí misma, conformando una estructura de 400-700 nm (Swedlow & Hirano, 2003), que a su vez se sigue plegando hasta llegar a formar el cromosoma metafásico (Kireeva *et al.*, 2004).

De lo que no hay duda es la existencia del modelo de 30nm *in vitro*, pero *in vivo* seguía sin quedar firmemente demostrado, a la espera de hacerlo en los años posteriores (Ohta *et al.*, 2011).

A partir de aquí, para explicar el nivel de plegamiento más alto utilizando otro modelo, se volvieron a los estudios anteriormente mencionados sobre la existencia de un “scaffold” o armazón cromosómico que estaba unido a lazos de ADN (Paulson & Laemmli, 1977) y la morfología en forma de bastón para los cromosomas, ya que estaba demostrado que era el nivel más alto de condensación cromosómica al ser observados al final de la mitosis (Swedlow & Hirano, 2003). Según algunos autores, dicho “scaffold” debía considerarse como la estructura básica que representa el nivel de plegamiento de mayor magnitud del cromosoma (Hart & Laemmli, 1998).

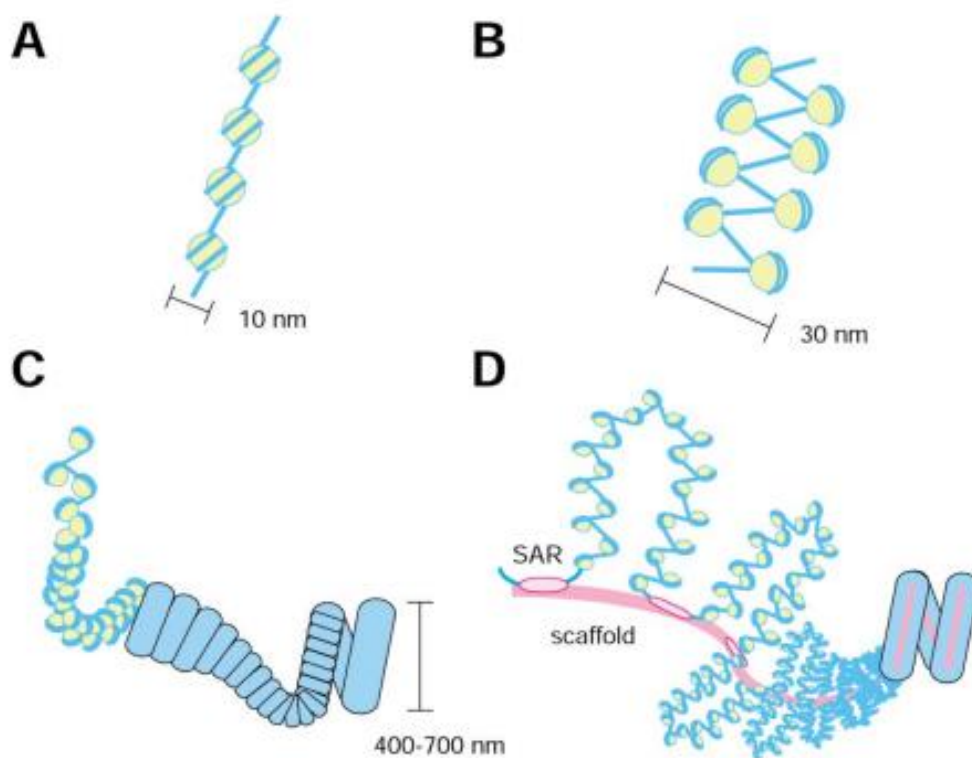


Figura 4. La cromatina y sus cuatro niveles de compactación estudiados. La figura A es el ADN enrollado en los nucleosomas. La B el modelo solenoide. La imagen C es súperenrollamiento. La imagen D es el modelo del "scaffold" con sus diferentes componentes. Imagen sacada de (Swedlow & Hirano, 2003).

Desde un principio, diferentes estudios apuntaban a que esta estructura axial estaba compuesta de ADN y/o proteínas y funcionaba como el esqueleto del

cromosoma. En concreto, el “scaffold” está asociado a las regiones SAR (*Scaffold Attachment Region*), compuestas por secuencias ricas en AT, encargadas de unir físicamente el ADN al dicho “scaffold” en forma de lazos (Swedlow & Hirano, 2003).

A su vez, las regiones SAR ricas en AT podrían servir como punto de unión para la Topo II, volviéndose así otro componente importante del armazón cromosómico. La identificación de las regiones SAR a lo largo del cromosoma fue posible gracias al uso de fluorescencia específica para secuencias ricas en AT. Esta visualización daba lugar a un patrón de plegamiento alterno que explicaba el patrón de bandas observado en las tinciones cromosómicas (Swedlow & Hirano, 2003).

2.2. Finales 2000 hasta la actualidad

A pesar de los avances realizados, al inicio del siglo XXI seguía sin haber consenso acerca de cómo está la cromatina plegada en el interior del cromosoma mitótico, incluso se han creado controversias debido a la utilización de nuevas técnicas de análisis (Ohta *et al.*, 2011).

En concreto, el modelo solenoide propuesto en los estudios clásicos no había avanzado mucho. Se asumió que los niveles de plegamiento de mayor magnitud del cromosoma mitótico consistían en una masa de cromatina plegada en fibras. Esta organización se confirmó con estudios *in vivo* con muestras de levaduras, viéndose que la cromatina se pliega según este modelo (Ohta *et al.*, 2011). A su vez, un estudio reciente de esa misma época basado en criomicroscopía electrónica no consiguió demostrar la existencia de este nivel de compactación del modelo solenoide en cromosomas aislados. Los autores concluyeron que, debido a la alta compactación de la cromatina, las interacciones con otros elementos (como nucleosomas) desestabilizarían dicha estructura solenoide (Ohta *et al.*, 2011). Años después, aún no se ha podido demostrar su existencia *in vivo*, por lo que la controversia sigue presente (Piskadlo & Oliveira, 2016).

Un gran avance en este campo fue el desarrollo de técnicas basadas en el uso de la genómica que permitían indagar en la conformación cromosómica

basándose en el grado de asociación o proximidad física que muestran las secuencias de ADN que conforman el cromosoma (Van Berkum *et al.*, 2010).

Un primer paso era la metodología 3C (*Chromosome Conformation Capture*) (Van Berkum *et al.*, 2010), se utiliza para identificar la frecuencia con la que interactúan dos fragmentos concretos del genoma. Como esta técnica solamente se puede utilizar analizando parejas de fragmentos, estos están limitados a regiones genómicas pequeñas (de 10kb a 1 Mb) (Barutcu *et al.*, 2015).

Un siguiente paso fue poder comparar las interacciones de un fragmento con el resto del genoma, surgiendo así este método 4C. Hay diferentes técnicas paralelas cuyos procedimientos son similares (*Circular Chromosome Conformation Capture, Chromosome Conformation Capture on ChIP, Open-ended Chromosome Conformation Capture Techniques*). En esta técnica, los fragmentos de ADN que están ligados a otro fragmento utilizado como cebo son amplificados y detectadas sus interacciones mediante microarrays o secuenciación (Barutcu *et al.*, 2015).

La técnica 5C (*Chromosome Conformation Capture Carbon Copy*) apareció poco después, mediante la cual una región genómica interactúa con muchos fragmentos genómicos. La base de esta técnica es la utilización de oligos y una librería de fragmentos del genoma. Esta serie de oligos están diseñados para abarcar regiones genómicas grandes, de modo que van a ser capaces de reconocer las interacciones entre todos los fragmentos de restricción de la librería de fragmentos. Sin embargo, sigue sin ser una técnica que abarque todo el genoma y necesita fragmentos ya conocidos previamente (Barutcu *et al.*, 2015).

Por último, se utilizó 3C como base para el desarrollo de la metodología Hi-C, que es capaz de detectar interacciones en un rango más grande, esto es, escala genómica (Van Berkum *et al.*, 2010). Además de esta ventaja, también es capaz de detectar interacciones a distancias mucho más grandes que las técnicas anteriores (Barutcu *et al.*, 2015). La base de esta técnica es el uso de formaldehído para fijar las células, que da lugar a que las secuencias de ADN

que están físicamente próximas o interactuando entre sí quedan unidas mediante enlaces covalentes. A continuación, se fragmenta el ADN con un enzima de restricción, de manera que dichos loci siguen estando unidos en un mismo fragmento de ADN. Después de incorporar residuos y un proceso de ligación, se obtiene una biblioteca genómica de las parejas de fragmentos que estaban próximas en el núcleo. Cada fragmento ligado está marcado y tras purificar las uniones se pueden analizar mediante un secuenciador de alto rendimiento (Van Berkum *et al.*, 2010).

Mediante la aplicación de las técnicas más avanzadas basadas en el 3C, principalmente Hi-C y 5C (*3C Carbon Copy*), al estudio de los cromosomas durante todo el ciclo celular, se observaron dos estados diferentes de plegamiento en el genoma humano. El primero está solo durante la interfase, y se caracteriza por estar muy compartimentalizado y ser celularmente específico. El segundo se identificó durante la metafase, y es un estado mucho más homogéneo y común a todos los cromosomas y tipos de células. Mediante el uso simultáneo de modelizaciones bioinformáticas basadas en polímeros que simulan el ADN, y los estudios de Hi-C se demostró que algunos datos de los estudios clásicos sobre los modelos cromosómicos eran inconsistentes. La conclusión a la que se está llegando es que estos antiguos modelos de organización jerárquica no representaban correctamente la realidad, que cuadraba más con la existencia de un conjunto de lazos de cromatina que están consecutivamente comprimidos de manera longitudinal y lineal (Naumova *et al.*, 2013).

En la actualidad, además del uso de métodos basados en análisis genómicos como el Hi-C, también están aportando información valiosa el uso de nuevas técnicas de análisis de microscopía basadas en el escaneo 3D cromosómico. Estas imágenes son fundamentales para estudiar el cromosoma mitótico intacto, sin destruir ningún tipo de plegamiento existente.

A continuación, se enumeran varias de las técnicas que nos permiten obtener imágenes 3D de los cromosomas:

- La técnica TEM (*Transmission Electron Microscope*) que se utilizaba en los estudios clásicos y no podía escanear cromosomas intactos al ser demasiado anchos, se ha sustituido por la SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Esta escanea, gracias a un rayo de electrones concentrados, la superficie de los cromosomas (Yusuf *et al.*, 2019).
- La técnica AFM (*Atomic Force Microscopy*) también se utiliza para obtener imágenes 3D de la estructura cromosómica entre 400 y 800 nm de anchura. Los resultados son similares a los de la técnica SEM (Yusuf *et al.*, 2019).
- Técnica SIM (*3D Structures Illumination Microscopy*) se ha probado en cromosomas mitóticos y sus resultados son imágenes de alta resolución (Yusuf *et al.*, 2019).
- Las técnicas SBF-SEM (*Serial Block Face Scanning Electron Microscope*) y FIB-SEM (*Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope*) son similares, ambas nos permiten obtener la misma información 3D de la muestra, pero la SBF corta la muestra con una hoja de diamante y la FIB lo hace con un rayo de G+ iones (Yusuf *et al.*, 2019).

En realidad, la mayoría de las técnicas que nos permiten obtener imágenes de alta resolución de los cromosomas aún siguen en desarrollo y los resultados que están dando lugar no han terminado de solventar todas las dudas que existen con respecto a la existencia de niveles de plegamiento de diferente magnitud en la organización cromosómica (Yusuf *et al.*, 2019).

Todas las técnicas tienen algún problema o limitación con respecto al estudio del cromosoma. Algunas técnicas ópticas de alta resolución tienen de limitación el grosor de la muestra. Otras, como la STEM (*Scanning Transmission Electron Microscope*), aunque no hace falta tinción, la limitación está en la anchura de nuevo. Otras técnicas de visualización 3D estropean demasiado la muestra (deshidratación, uso de químicos muy agresivos para la fijación). SBF-SEM y FIB-SEM también son técnicas que pueden llegar a dañar la muestra (Yusuf *et al.*, 2019).

Por eso, hoy en día las investigaciones siguen centradas en intentar encontrar técnicas que mantengan la muestra cromosómica en un estado lo más natural posible. En opinión de algunos autores, una vez estas técnicas se optimicen lo suficiente serán claves para determinar si los modelos basados en niveles de plegamiento de diferente magnitud son válidos (Yusuf *et al.*, 2019).

Hay que mencionar que la organización de la cromatina durante interfase sí ha sido mucho más fácil de estudiar y comprender gracias al empleo de las técnicas de escaneo 3D y la de Hi-C (Gibcus *et al.*, 2018). Estos análisis han mapeado el conjunto de interacciones 3D que existen en el interior del núcleo, y se ha podido ver que existen una compartimentalización basada en lazos de cromatina que se mantienen físicamente próximos y que recibe el nombre de dominios asociados topológicamente (TADs, *Topologically Associated Domains*) (MacGregor *et al.*, 2019). Se pudo observar la pérdida de compartimentalización y la desaparición rápida de los TADs al entrar en profase. El mecanismo mediante el cual esto ocurre no es conocido, pero se demostró que el complejo condensina era requerido. (Gibcus *et al.*, 2018). Estos lazos se forman al establecerse interacciones entre diferentes regiones de la cromatina y son muy dinámicas. Los TADs suponen un nuevo concepto en el estudio de la organización de la cromatina durante el ciclo celular y solo han sido posible definirlos gracias al empleo de técnicas basadas en el 3C (MacGregor *et al.*, 2019).

Mediante el análisis de los TADs se han confirmado estudios previos que demostraban una preferencia por parte de los cromosomas individuales a la hora de colocarse en el interior del núcleo, es decir, su organización no es al azar (Barutcu *et al.*, 2015). Esta posición está relacionada con la actividad génica, ya que los genes que se encuentran en el centro nuclear están frecuentemente activos y los que están más próximos a la periferia se suelen encontrar silenciados (Cremer *et al.*, 2018).

En la actualidad, una idea bastante novedosa es el modelo llamado “loop extrusion”, que intenta explicar la dinámica de los lazos de cromatina que permite explicar la existencia de TADs. Según este modelo, existe algún tipo de factor o conjunto de proteínas (cohesina es uno de los candidatos propuestos), denominados LEF (*Loop Extrusion Factors*), que unen físicamente a dos

fragmentos de cromatina adyacentes entre sí; posteriormente, estos LEF son capaces de hacer que un tramo largo de cromatina se mueva o pase a través de ellos de manera que se empieza a formar un “lazo” (MacGregor *et al.*, 2019).

De este modo, estos grandes lazos conformarían los TADs, y su longitud estaría determinada por el bloqueo al proceso de loop extrusion de la cromatina que establecen otros factores asociados a lo misma denominados *boundary elements*, como es el caso de los dominios CTCF (*CCCTC-Binding factor*). Estos CTCF son unas proteínas muy conservadas que se unen a secuencias específicas del genoma, pudiendo estabilizar así los lazos de cromatina al actuar como una barrera. (Fudenberg *et al.*, 2016).

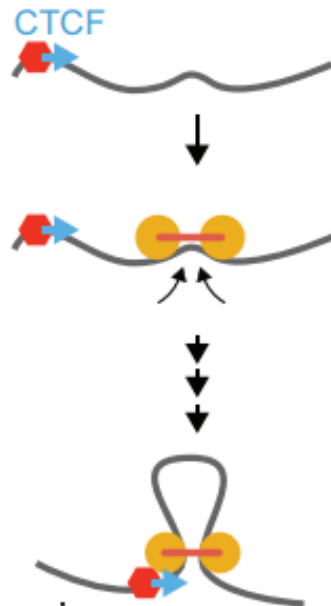


Figura 5. Mecanismo de acción del modelo "Loop Extrusion". En este esquema, la cromatina sería la cadena gris, los LEF los dos círculos que crean el lazo y el CTCF el hexágono rojo que frena su acción. Imagen sacada de (Fudenberg *et al.*, 2016).

También se especula que varios LEFs pueden actuar a la vez para generar TADs (MacGregor *et al.*, 2019). En la actualidad se considera que el modelo de “Loop Extrusion” es fundamental para entender el proceso de condensación cromosómica que regula la formación del cromosoma mitótico (MacGregor *et al.*, 2019).

3. EUCARIOTAS

La mayoría de la información molecular que tenemos del ciclo celular es gracias a las muestras de unas pocas especies que fueron seleccionadas debido a que poseen algunas características que facilitan el trabajo en el laboratorio (por ejemplo, ciclos celulares más rápidos o etapas embrionarias más cortas) (Harashima *et al.*, 2013).

Estas especies pertenecen todas al clado Amorphea o Unikonta, por lo que es simplemente una pequeña parte de toda la diversidad del dominio eucariota (Harashima *et al.*, 2013).

3.1. Simples

Si bien todos los eucariotas comparten una serie de características básicas, algunos eucariotas simples como las levaduras tienen ciertas particularidades destacables en relación con la división mitótica (Taddei & Gasser, 2012).

Tienen una estructura que sustituye al centrosoma, llamada SPB (*Spindle Pole Body*), que se mantiene unida a la envoltura nuclear. Esta estructura está sujeta a los centrómeros de los cromosomas mediante unos microtúbulos interfásicos, permitiéndole así redireccionarlos. Con respecto a proteínas, estas levaduras carecen de diferentes histonas, como la H1 o H5. Su genoma codifica para una proteína similar a la histona H1, llamada Hho1, pero a diferencia de la H1 en eucariotas complejos, esta no es un componente principal de la cromatina de las levaduras. Las histonas H3.1 y macroH2A también están ausentes en sus cromosomas, mientras que la histona H3 en vertebrados en levaduras es H3.3. Otra proteína de la que carecen es la lamina, una proteína estructural nuclear, pero sí codifican para unas proteínas asociadas a la lamina que participan en el anclaje de la cromatina en los eucariotas complejos (Taddei & Gasser, 2012).

Las levaduras, además de sus características anteriormente mencionadas, también han sido protagonistas de muchas investigaciones *in vitro*, sobre todo durante las investigaciones clásicas del cromosoma (Hirano, 1995). En eucariotas unicelulares, las levaduras más estudiadas con respecto a la organización genómica, son las especies *Saccharomyces cerevisiae* y

Schizosaccharomyces pombe al poder cultivarlas tan fácilmente en el laboratorio (Cremer et al., 2018). Gracias a la técnica FISH, se pudo ver en ambas especies la condensación cromosómica con más detalle, encontrando así dos proteínas de la familia SMC en ambas levaduras (Hirano, 1995).

Estas dos levaduras también protagonizaron las investigaciones que ayudaron a relacionar las CDKs y ciclinas con el ciclo celular. Se pudo observar cómo una CDK (Cdc28 en *S. cerevisiae* y Cdc2 en *S. pombe*) interactuaba con las ciclinas para que la célula fuera avanzando por las diferentes fases del ciclo celular (Lim & Kaldis, 2013).

Otro caso evolutivo excepcional son los dinoflagelados, unos tipos de protistas que carecen de nucleosomas. Evolutivamente, se piensa que el nucleosoma apareció como un tetrámero en el reino *Archaea*, evolucionando posteriormente a octámeros formados por dos unidades de las histonas H2A, H2B, H2 y H4. Los cromosomas de los dinoflagelados permanecen condensados durante todo el ciclo celular, y debido a la ausencia de nucleosomas su estructura es diferente a la de los otros eucariotas. Tienen unas proteínas homólogas a la histona H1 llamadas HCc, que participan en la compactación de la cromatina (Cremer et al., 2018).

3.2. Superiores

Una de las especies que más ha aportado al estudio de la condensación cromosómica *in vitro* es *Xenopus laevis*. En concreto, el uso de huevos no fertilizados a los que podía someter a procedimientos de inmunosupresión e inhibición permitía analizar la dinámica de condensación cromosómica en tiempo real, y averiguar las funciones específicas de algunas proteínas implicadas como la Topo II y la histona H1 (Hirano, 1995). También, a raíz del uso de este modelo de experimentación, se consiguió identificar el complejo condensina I (Hudson et al., 2009) y se pudo ver *in vitro* que sus subunidades que no pertenecen a la familia SMC son las que modulan la actividad ATPasa del complejo (Hudson et al., 2009). Otro estudio *in vitro* con *Xenopus* señaló la posible dependencia de la acción del complejo condensina durante la condensación cromosómica (Kireeva et al., 2004).

El complejo condensina es una estructura bien conservada en la evolución de los eucariotas, ya que la mayoría tienen los dos tipos, condensina I y condensina II (Hirano, 2016). Esto se debe a que el ancestro común eucariota (LECA, *Last Eukaryota Common Ancestor*) portaba ya ambas condensinas. A partir del mismo, algunas especies de eucariotas han perdido la condensina II durante su evolución (Hirano, 2012). Sin embargo, lo que se desconoce es si hay algún eucariota que porte únicamente la condensina II, ya que todos los analizados siempre contenían condensina I. (Hirano, 2016).

De la misma manera, el complejo cohesina también está altamente conservado. Los eucariotas superiores, en lugar de tener la subunidad SCC3, tienen dos análogos llamados SA1 (*Stromal Antigen-1*) o SA2 (*Stromal Antigen-2*), pero nunca ambos. La pérdida de cualquiera de las subunidades por disrupción genética hace que las cromátidas hermanas no pudieran mantenerse unidas, creando un grave error durante la segregación cromosómica (Moser & Swedlow, 2011).

A principios de los años 2000 se descubrió que todos los organismos eucariotas tienen al menos una Topo II alfa. Los vertebrados tienen 2 isoformas, Topo II alfa y Topo II beta, con actividades catalíticas similares *in vitro*, pero distintas *in vivo* (Swedlow & Hirano, 2003).

En vertebrados, al menos, Topo II es necesaria para la individualización de los cromosomas. Este es un proceso por el cual la cromatina que conforma un cromosoma es capaz de irse condensando y separando del resto hasta dar lugar a una estructura individual independiente del resto. Durante el mismo, la actividad de eliminación de superenrollamientos y concatenaciones entre cromátidas hermanas y no hermanas que realiza Topo II es fundamental (Swedlow & Hirano, 2003).

Sin embargo, tras unos ensayos en los que se silenció la Topo II alfa en células humanas, se pudo comprobar que, aunque sea imprescindible para la segregación cromosómica, no se encontraron defectos muy negativos para la compactación (Antonin & Neumann, 2016). Aunque sabemos que participa en la condensación *per se*, en estos momentos no está claro como es dicha actividad

a nivel molecular, más allá de su actividad coordinada con las condensinas. La función exacta de Topo II en este proceso sigue siendo un misterio (Swedlow & Hirano, 2003).

La localización de la cromatina en el núcleo (si es rica en genes está en el interior del núcleo, si no lo es está en la periferia (Barutcu et al., 2015)) es otro ejemplo de la conservación en eucariotas. A pesar de la evolución de las diferentes especies del dominio eucariota, se han observado genes específicos (como HSA18 y HSA19) en diferentes especies localizados en las mismas regiones del núcleo (periferia y el interior del núcleo, según el consenso anteriormente mencionado) (revisado en Cremer et al., 2018).

Otro estudio que confirma la conservación en eucariotas es el realizado con el pólipo *Hydra*, especie que pertenece a un filo muy lejano de los mamíferos, que demostró el parecido con la replicación en mamíferos, una organización similar de la cromatina durante las etapas de su replicación (Alexandrova et al., 2003).

De esta manera, se puede confirmar el alto grado de conservación del plegamiento cromosómico a lo largo de la evolución de los eucariotas superiores.

4. CONCLUSIÓN Y VISIÓN FUTURA

Aún después de tantos años estudiando el cromosoma mitótico y su compactación, los plegamientos superiores siguen sin estar claros o, como mínimo, están siendo debatidos. Incluso la existencia de la estructura solenoide de 30 nm, la cual se había descrito nada más comenzar a postular los diferentes modelos de condensación cromosómica, sigue sin estar probada *in vivo*.

Ocurre lo mismo con las pequeñas estructuras de los cromosomas. Aunque las técnicas de observación cromosómicas hayan avanzado mucho estas últimas décadas, siguen sin ser suficientes al estar limitadas por el límite de difracción de la luz. Ya se están desarrollando técnicas que pretenden mejorar las anteriormente mencionadas y permiten una mejor observación del cromosoma, ya sea mediante una aislación menos agresiva, como técnicas que no necesitan seccionar el cromosoma o aquellas que nos permiten observar las muestras bajo un estado muy próximo al nativo.

Es por eso que el avance tecnológico de las últimas décadas ha sido tan útil al permitirnos comenzar a utilizar técnicas basadas en el escaneo 3D cromosómicos en alta resolución. Así, debería de ser posible destapar el resto de incógnitas que nos quedan sobre los niveles de plegamiento de diferente magnitud en la organización cromosómica dentro de unos años tras nuevos avances en este tipo de técnicas que solventen los problemas que dan las ya existentes.

5. BIBLIOGRAFÍA

Adolph, K. W., Cheng, S. M., & Laemmli, U. K. (1977). Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell*, 12(3), 805-816. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90279-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90279-3)

Alexandrova, O., Solovei, I., Cremer, T., & David, C. N. (2003). Replication labeling patterns and chromosome territories typical of mammalian nuclei are conserved in the early metazoan Hydra. *Chromosoma*, 112(4), 190-200. <https://doi.org/10.1007/s00412-003-0259-z>

Antonin, W., & Neumann, H. (2016). Chromosome condensation and decondensation during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.013>

Barutcu, A. R., Fritz, A. J., Zaidi, S. K., van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, J. L., ... Stein, G. S. (2015). C-ing the Genome: A Compendium of Chromosome Conformation Capture Methods to Study Higher-Order Chromatin Organization. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 31-35. <https://doi.org/10.1002/jcp.25062>

Belmont, A. S. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 632-638. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.09.007>

Civelekoglu-Scholey, G., & Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic cells. *Interface Focus*, 4(3), 20130073. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0073>

Cremer, T., Cremer, M., & Cremer, C. (2018). The 4D Nucleome: Genome Compartmentalization in an Evolutionary Context. *Biochemistry (Moscow)*, 83(4), 313-325. <https://doi.org/10.1134/s000629791804003x>

Earnshaw, William & Laemmli, U. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *The Journal of cell biology*. 96. 84-93. [10.1083/jcb.96.1.84](https://doi.org/10.1083/jcb.96.1.84).

Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., & Mirny, L. A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Reports*, 15(9), 2038-2049. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>

Gibcus, J. H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., ... Dekker, J. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*, 359(6376), eaao6135. <https://doi.org/10.1126/science.aao6135>

Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 345-356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>

Hart, C. M., & Laemmli, U. K. (1998). Facilitation of chromatin dynamics by SARs. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5), 519-525. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80005-1](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80005-1)

Hirano, T. (1995). Biochemical and genetic dissection of mitotic chromosome condensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(9), 357-361. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)89076-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89076-3)

Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes & Development*, 26(15), 1659-1678. <https://doi.org/10.1101/gad.194746.112>

Hirano, Tatsuya. (2016). Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell*, 164(5), 847-857. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.033>

Hudson, D. F., Marshall, K. M., & Earnshaw, W. C. (2009). Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Research*, 17(2), 131-144. <https://doi.org/10.1007/s10577-008-9009-7>

Kannan, T. P., & Zilfalil, B. A. (2009). Cytogenetics: past, present and future. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 16(2), 4–9.

Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T., & Belmont, A. S. (2004). Visualization of early chromosome condensation. *Journal of Cell Biology*, 166(6), 775-785. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406049>

Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>

Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., & Medema, R. H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of Cell Biology*, 185(2), 193-202. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812045>

MacGregor, I. A., Adams, I. R., & Gilbert, N. (2019). Large-scale chromatin organisation in interphase, mitosis and meiosis. *Biochemical Journal*, 476(15), 2141-2156. <https://doi.org/10.1042/bcj20180512>

Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>

McIntosh, J. R. (2016). Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a023218. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023218>

Moser, S. C., & Swedlow, J. R. (2011). How to be a mitotic chromosome. *Chromosome Research*, 19(3), 307-319. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9198-3>

Nagano, T., Lubling, Y., Várnai, C., Dudley, C., Leung, W., Baran, Y., ... Tanay, A. (2017). Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution. *Nature*, 547(7661), 61-67. <https://doi.org/10.1038/nature23001>

Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B. R., Mirny, L. A., & Dekker, J. (2013). Organization of the Mitotic Chromosome. *Science*, 342(6161), 948-953. <https://doi.org/10.1126/science.1236083>

Ohta, S., Wood, L., Bukowski-Wills, J.-C., Rappsilber, J., & Earnshaw, W. C. (2011). Building mitotic chromosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(1), 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.09.009>

Paulson, J. R., & Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3), 817-828. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90280-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90280-x)

Piskadlo, E., & Oliveira, R. A. (2016). Novel insights into mitotic chromosome condensation. *F1000Research*, 5, 1807. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8727.1>

Poon, R. Y. C. (2016). Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods in Molecular Biology*, 3-19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2957-3_1

Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, 35(6), 461-478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>

Swedlow, J. R., & Hirano, T. (2003). The Making of the Mitotic Chromosome: Modern Insights into Classical Questions. *Molecular Cell*, 11(3), 557-569. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00103-5)

Taddei, A., & Gasser, S. M. (2012). Structure and Function in the Budding Yeast Nucleus. *Genetics*, 192(1), 107-129. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140608>

Vagnarelli, P. (2012). Mitotic chromosome condensation in vertebrates. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1435-1441. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.017>

Van Berkum, N.L., Lieberman-Aiden, E., Williams, L., Imakaev, M., Gnirke, A., Mirny, L.A., Dekker, J., Lander, E.S. *Hi-C: A Method to Study the Three-dimensional Architecture of Genomes*. *J. Vis. Exp.* (39), e1869, doi:10.3791/1869 (2010).

Van Hooser, A. A., Yuh, P., & Heald, R. (2005). The perichromosomal layer. *Chromosoma*, 114(6), 377-388. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0021-9>

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), 131-149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>

Yusuf, M., Kaneyoshi, K., Fukui, K. et al. Use of 3D imaging for providing insights into high-order structure of mitotic chromosomes. *Chromosoma* 128, 7–13 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0678-5>