



Caracterització del contingut proteic del nucli de l'espermatozoïde humà i el seu potencial epigenètic

Judit Castillo Corullón

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Caracterització del contingut proteic del nucli de l'espermatozoide humà i el seu potencial epigenètic

Judit Castillo Corullón

*Tesi Doctoral
Juliol, 2014*

Tesi Doctoral

Caracterització del contingut proteic del nucli de l'espermatozoide humà i el seu potencial epigenètic

Memòria presentada per
Judit Castillo Corullón

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona
en el
Programa de Doctorat en Biomedicina

Treball desenvolupat sota la direcció del Dr. Rafael Oliva i Virgili
Laboratori de Genètica Humana, Unitat de Genètica, Departament de Ciències
Fisiològiques I, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Director

Autora

Dr. Rafael Oliva Virgili

Judit Castillo Corullón

A mis padres, sin ellos esto no hubiese sido posible

A Miriam, la persona que más cree en mí

Esta tesis es tan mía como vuestra

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno, 1864-1936

“No hay que temer nada en la vida, solo hay que comprender”

Marie Curie, 1867-1934

“We can burn brighter than the sun”

We are Young by Fun, 2011

Aquesta tesi doctoral és el resultat no només del treball realitzat durant aquests anys, si no també de la influència de cadascuna de les persones amb les que m'he trobat i que m'han fet créixer personal i professionalment. Aquesta tesi té un tros de cadascun de vosaltres.

En primer lloc volia agrair de forma molt especial al meu director de tesi, el Dr. Rafael Oliva. Ell em va donar la oportunitat de ser membre d'aquest grup de recerca ara ja fa més de cinc anys. Gràcies a ell he conegut aquest món, m'he format com a investigadora i he conegut la docència. Ell va creure en mi desde el primer moment i ha dipositat en mi la seva confiança. He après moltíssim d'ell i amb ell. Moltes gràcies Rafael.

També volia agrair als membres de la comissió de seguiment d'aquesta tesi doctoral, el Dr. Cristóbal Mezquita, el Dr. Josep Oriola i la Dra. Gemma Marfany. Moltes gràcies pels vostres valuosos comentaris i recomanacions.

Al Dr. Josep Lluís Ballejà i a tot el laboratori d'Andrologia de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic. Per la seva gran feina, imprescindible per al desenvolupament del nostre treball.

A tots els col·laboradors que han participat en els treballs que es presenten en aquesta tesi doctoral, començant per la Dra. Sheena Lewis i el seu llavors doctorant Luke Simon de la Queen's University of Belfast, seguint pel Servei de Proteòmica de la Universitat de Barcelona (CCITUB) i molt en especial al Dr. Josep Maria Estanyol i a la Dra. Maria José Fidalgo. I també a la Dra. Tanya Vavouri de l'IMPPC, per la seva gran tasca d'anàlisi bioinformàtic.

Al *Human Genetics Lab*, el grup de recerca més especial que ningú pot trobar-se. Sou companys i amics. Vosaltres si que heu influït en mi i en aquesta tesi, per això vull dedicar-vos unes paraules a cadascun de vosaltres.

En primer lloc el meu més sincer agraïment va dirigit als meus tres pilars, la Sara, la Meri i la Xana. Cadascuna de vosaltres m'heu ensenyat una cosa diferent que ha format un tot. De la Sara em porto la seva manera de treballar i d'entendre la ciència, de tu vaig aprendre la meua manera de fer a la poyata. La Meri m'ha ensenyat a ser independent, a lluitar pel que vull aconseguir, a creure en mi i a que res és impossible. Y de ti Xani, a amar la investigación y la ciencia, a escribir, a valorarme, a avanzar y, sobre todo, a poner calidad en lo que hago. Cadascuna de vosaltres m'heu influït d'una forma diferent, però teniu una cosa en comú: sense vosaltres no seria el que sóc ara i sou i sereu sempre el meu model a seguir.

Al Rubén, el Dr. Azpiazu, el meu "compañero de fatigas" des del dia 1 del doctorat fins ara. Hem viscut mil moments junts, hem xocat molt, moltíssim, i em rigut molt també. I el més important, hem sigut un bon equip! Ets una gran persona i et desitjo tot el millor a partir d'ara, trobaràs el teu lloc, com tots ho farem.

A Carla, porque te admiro. No solo personalmente porque haces la vida más fácil a cualquiera que esté a su lado, si no también profesionalmente. De ti he aprendido día a día y esta tesis tiene algo tuyo en cada una de sus páginas. Lo mejor que le ha podido pasar al HGL

es que vinieras, así que olvida los olivos y los cinco minutos, y mucha fuerza, la próxima eres tú!

A la Montse, més que una *project manager*. No saps el que ha guanyat el laboratori tenint-te aquí amb nosaltres. Estic molt contenta que formis part del HGL i de tot el que aprenem de tu en cada reunió, en cada xerrada i en cada dinar.

A Claudio, nuestro Reprotrain. Gracias por ser como eres y por dar ese toque de alegría (italiana!) al laboratorio. En un tiempo estarás haciendo esto mismo que estoy haciendo yo. Mucha fuerza en tus proyectos, y aunque no esté en el lab, puedes contar conmigo para lo que quieras. A Orleigh, mi *future Nature co-author*, eres la alegría personificada i estás llena de conocimientos, el lab gana muchísimo contigo, tanto personal como profesionalmente. I al Ferran, el nostre petit que es fa gran. Ets molt vàlid per fer això, i ets una gran persona. Creu en tu i en el teu criteri i arribaràs lluny, n'estic molt segura.

I per últim a tota la resta de persones que han passat pel laboratori: la Gemma M., la M^a Cristina, la Margherita, la Gemma B., la Sanya, la Valeria, el Kishlay, l'Ana Sofia i la resta de fofinhas de Portugal, i al João Pedro, miembro no oficial del laboratorio pero uno más sin lugar a dudas, tú también eres HGL. A les col·laboracions, la Eva i la Lena. I en especial als meus petits saltamontes, l'Antoni i la Íngrid, amb vosaltres he après moltíssim.

A tot el Departament de Ciències Fisiològiques I: el cap de departament el Dr. Arcadi Gual, al grup de Genètica Molecular del Dr. Cristóbal Mezquita, al grup de Neurofisiologia del Dr. Xavier Gasull i al grup liderat pel Dr. Michael Edel. Sense oblidar-me de la Nuria i la Cristina, les secretàries més eficients que pot tenir aquest departament.

A part de la pròpia recerca, durant l'elaboració d'aquesta tesi he après també un altre àmbit del treball a la facultat, la docència. I en aquest sentit vull agrair, a part del Dr. Rafael Oliva, també a la Dra. Lourdes Mengual. Ha sigut un plaer ser la vostra *teacher assistant*. He après moltíssim al vostre costat.

També volia agrair a un grup de persones que he conegut recentment però que m'han marcat de per vida. Tota la gent de *Frontiers in Reproduction 2014*. Ha sigut una experiència única i inoblidable, de la que no només em porto una quantitat de coneixements infinita, si no grans amics i experiències personals d'incalculable valor.

I per últim, no puc deixar-me totes aquelles persones que no tenen relació directa amb la recerca però que sense ells no podria haver arribat al punt en el que estic ara.

A les meves amigues, en especial a la Sabina i a la Vane, per estar sempre interessades en el que faig, preguntar-me i escoltar-me. Per ser persones 10 i ferme sentir orgullosa de la gent que tinc al voltant.

Al Fran, el meu company a la vida. Gràcies per estar allà, per aguantar tant els bons moments que m'ha donat aquesta tesi com el dolents, i totes les hores que he parlat d'això sense parar. Ets el meu suport i no sé qué hagués fet sense tu. Has format part d'aquesta etapa de la meua vida des del dia que vaig fer la entrevista per entrar aquí. Has estat en tots els moments. Aquesta tesi és també teva.

Y por descontado, a mi familia. Y en especial a mis padres. Como he dicho antes, yo no estaría escribiendo esto si no fuera por vosotros. Lo habéis dado todo por mi educación y para que llegara a ser lo que soy hoy. Aunque os diera las gracias cada día no podría acabar demostrando lo mucho que os lo agradezco. Un día me gustaría ser como vosotros. Y a Miriam, si tuviera un club de fans ella sería sin duda la presidenta. Siempre está ahí y siempre lo estará. No hay persona que me valore más que tú y que hable de mi con más orgullo. Gracias por lo mucho que crees en mí. Esta tesis es un regalo que os quiero dar a los tres. Muchas gracias. Os quiero.

Moltes, moltes gràcies a tothom

Suport econòmic:

Aquesta tesi doctoral s'ha dut a terme gràcies al suport econòmic dels projectes d'investigació BFU2009-07118, i PI13/00699 concedits al Dr. Rafael Oliva pel Ministerio de Economía y Competitividad, i a la beca pre-doctoral Ajut al Personal Investigador en Formació (APIF) de la Universitat de Barcelona.



Índex

1. Introducció	17
1.1. L'espermatogènesi i maduració de l'espermatozoide humà	19
1.1.1. Cèl·lules espermatogèniques i fases de l'espermatogènesi	19
1.1.2. Altres cèl·lules del testicle i regulació de l'espermatogènesi	24
1.1.3. L'espermatozoide humà, la maduració a través de l'epidídim i la capacitació	25
1.2. El nucli de l'espermatozoide humà madur	28
1.2.1. Organització del DNA espermàtic	28
1.2.2. Nucleoproteïnes espermàtiques	30
1.3. Infertilitat/subfertilitat masculina	36
1.3.1. Pràctiques andrològiques: anàlisi espermàtic	37
1.3.2. Estudi de la fragmentació del DNA	40
1.3.3. Tècniques de reproducció assistida	42
1.4. Proteòmica de l'espermatozoide	44
1.4.1. Tècniques proteòmiques basades en espectrometria de masses	46
1.4.2. Estudis proteòmics de l'espermatozoide humà madur	49
1.4.3. Avenços cap al proteoma de l'espermatozoide humà complet i identificació de les vies cel·lulars representades	51
1.4.4. Proteòmica de l'espermatozoide en espècies models	56
1.5. Epigenètica de l'espermatozoide	57
1.5.1. Metilació del DNA espermàtic	57
1.5.2. Contingut d'RNAs	58
1.5.3. Modificacions de les histones	59
1.5.4. Estructura de la cromatina espermàtica	60
1.6. Fertilització i contribució de l'espermatozoide a l'oòcit	62
2. Hipòtesi i objectius	65

3. Material i mètodes.....	69
3.1. Material biològic i processament de les mostres de semen.....	71
3.2. Purificació dels espermatozoides	74
3.2.1. Selecció d'espermatozoides amb Percoll 50%.....	74
3.2.2. Eliminació de leucòcits amb Dynabeads® CD45.....	77
3.2.3. Comprovació de la puresa mitjançant extracció d'RNA i RT-PCR de CD45.....	78
3.3. Estudi de les proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide humà	83
3.3.1. Extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide humà	83
3.3.2. Electroforesi àcida.....	86
3.3.3. Preparació d'un estàndard de protamines humanes.....	88
3.3.4. Quantificació del contingut de protamines i càlcul de la relació P1/P2	92
3.3.5. Hidròlisi i quantificació del DNA procedent de l'extracció de proteïnes bàsiques d'espermatozoides i càlcul de les relacions Protamina/DNA	94
3.3.6. Identificació de modificacions post-traduccionals de protamines mitjançant espectrometria de masses.....	95
3.4. Determinació del dany al DNA amb l'assaig del Comet alcalí.....	96
3.5. Identificació del proteoma nuclear mitjançant espectrometria de masses	97
3.5.1. Aïllament de nuclis d'espermatozoides humans amb CTAB 1%	97
3.5.2. Lisi de nuclis d'espermatozoides, extracció de proteïnes i quantificació.....	100
3.5.3. Fraccionament de la cromatina espermàtica i extracció de proteïnes.....	103
3.5.3.1. Fraccionament amb NaCl 0,65 M	103
3.5.3.2. Fraccionament amb Nucleasa Micrococal.....	106
3.5.4. Separació de les proteïnes espermàtiques per electroforesi d'SDS	109
3.5.5. Identificació de proteïnes per espectrometria de masses.....	112
3.5.6. Anàlisi de les proteïnes espermàtiques identificades	114
3.6. Determinació de l'expressió de proteïnes a l'espermatozoide	115

3.6.1. <i>Western Blot</i>	115
3.6.2. <i>Immufluorescència</i>	118
3.7. Anàlisis estadístics	120
4. Resultats	121
4.1. Anàlisi del contingut de protamines d'espermatòzoides humans madurs i de la seva implicació en l'estat de la cromatina espermàtica	123
4.1.1. <i>Relació entre els quocients P1/P2 i P/DNA amb el grau de fragmentació del DNA en mostres de semen de pacients infèrtils</i>	123
4.1.2. <i>Identificació de la presència de modificacions post-traduccionals en les seqüències de les protamines humanes mitjançant espectrometria de masses</i>	127
4.2. Anàlisi del proteoma nuclear d'espermatòzoides humans normals mitjançant espectrometria de masses i la distribució en diferents compartiments de la cromatina espermàtica	130
4.2.1. <i>Descripció del contingut proteic del nucli de l'espermatòzoide humà madur normozoospermic</i>	130
4.2.2. <i>Caracterització de la distribució de proteïnes nuclears en diferents compartiments de la cromatina espermàtica en espermatòzoides normozoospermics</i>	133
4.3. El proteoma nuclear de l'espermatòzoide humà combinat, el seu potencial epigenètic i l'estat de conservació	144
5. Discussió	151
5.1. <i>L'efecte de les protamines en l'estructura de la cromatina espermàtica</i>	153
5.2. <i>El proteoma nuclear de l'espermatòzoide humà normal</i>	156
5.3. <i>Perfils de nucleoproteïnes diferents segons l'afinitat de les proteïnes cap a la cromatina espermàtica</i>	161
6. Conclusions	165
7. Referències	169

8. Annexos	187
8.1. Article publicat corresponent als resultats de l'objectiu 1.1: Castillo, Simon, de Mateo, Lewis, Oliva, 2011	189
8.2. Article publicat i informació suplementària corresponents als resultats de l'objectiu 2.1: de Mateo, Castillo, Estanyol, Ballescà, Oliva, 2011	191
8.3. Informació suplementària corresponent als resultats de l'objectiu 2.2.....	203
8.4. Article publicat i informació suplementària corresponents als resultats de l'objectiu 3: Castillo, Amaral, Oliva, 2014.....	225
9. Llistat d'abreviatures	255

1. Introducció

1.1. L'espermatogènesi i maduració de l'espermatozoide humà

L'espermatogènesi és un procés de diferenciació cel·lular molt complex que inclou canvis marcats a nivell genètic, cel·lular, funcional i estructural, el resultat del qual és la generació del gàmeta masculí madur, l'espermatozoide (Burgos and Fawcett, 1955; Mezquita, 1985; Alberts *et al.*, 2002; Sutovsky and Manandhar, 2006).

Aquest sofisticat procés té lloc als testicles, els quals són els òrgans sexuals masculins, i més específicament en els túbuls seminífers, que s'uneixen entre ells formant una xarxa de canals anomenada *rete testis*. Els túbuls seminífers presenten una arquitectura única al llarg de la qual es pot trobar una successió dels diferents tipus de cèl·lules espermàtiques immadures (espermatogònies, espermatòcits i espermatides) juntament amb els espermatozoides diferenciats. Les diferents cèl·lules espermàtiques es troben ordenades en els túbuls de forma concèntrica formant varies capes depenent del seu grau de maduresa (Figura 1.1). D'aquesta manera les cèl·lules més immadures, les espermatogònies, es troben a la làmina basal (part més externa del túbul) i els espermatozoides acaben sent abocats a la llum del túbul (la part més interna). Als túbuls seminífers també hi són presents cèl·lules no espermatogèniques com les cèl·lules de Sertoli, les quals formen unions fortes entre elles de manera que separen l'epiteli germinal en dos compartiments i formen la barrera hemato-testicular (de Kretser *et al.*, 1998; Holstein *et al.*, 2003; Sutovsky and Manandhar, 2006).

1.1.1. Cèl·lules espermatogèniques i fases de l'espermatogènesi

Durant la vida fetal, les cèl·lules germinals primordials migren cap al testicle, que es troba en desenvolupament, on es transformen en gonòcits envoltats de cèl·lules de Sertoli immadures. Després d'un període de multiplicació, aquestes cèl·lules migren a la membrana basal del túbul on es divideixen i formen les espermatogònies. El procés de l'espermatogènesi es manté de forma quiescent fins a la pubertat, i és en aquest moment quan comença la diferenciació a espermatozoide, la qual s'allargarà durant tota la vida fèrtil de l'home. S'estima que un cicle d'espermatogènesi sencer a l'ésser humà requereix al voltant de 64 dies (Heller and Clermont, 1963; Misell *et al.*, 2006) i una temperatura òptima de 32 °C.

El procés de l'espermatogènesi es pot dividir en tres fases: mitosi, meiosi i espermiogènesi (Figura 1.2), cadascuna de les quals és clau per a la correcta producció d'espermatozoides diferenciats (de Kretser *et al.*, 1998). Els diferents esdeveniments que tenen lloc es detallen a continuació:

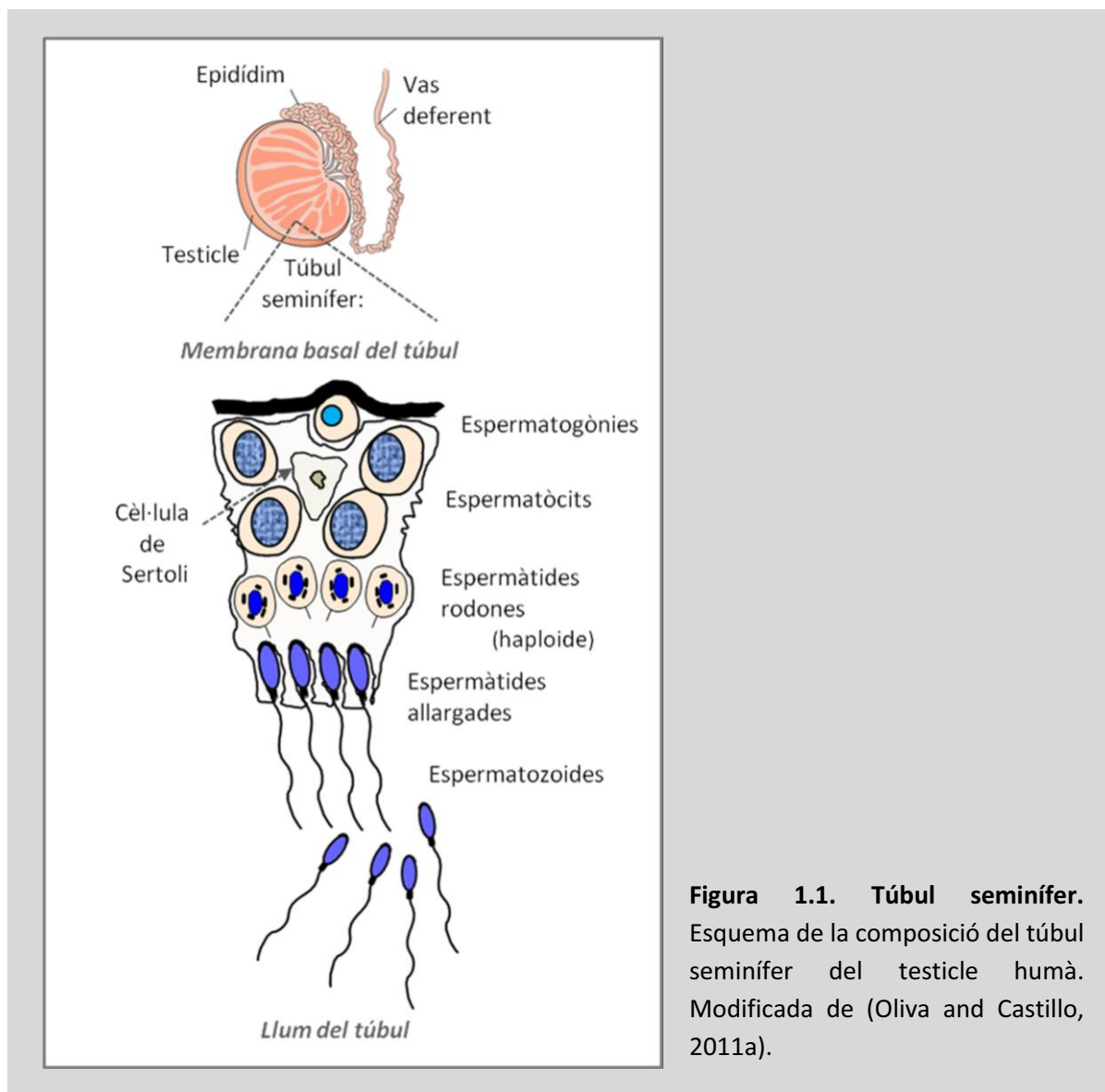


Figura 1.1. Túbul seminífer. Esquema de la composició del túbul seminífer del testicle humà. Modificada de (Oliva and Castillo, 2011a).

I. Fase mitòtica o proliferant:

Aquesta primera fase de l'espermatogènesi s'inicia amb la duplicació de les espermatogònies tipus A que es troben al compartiment basal del túbul seminífer. Es poden diferenciar diversos tipus d'espermatogònies, depenent de la seva posició al túbul, la seva morfologia i la tinció del seu nucli, el número de les quals és variable entre les diferents espècies animals. En el cas concret de l'humà s'han descrit tres tipus d'espermatogònies (Heller and Clermont, 1963; de Kretser *et al.*, 1998):

- *Espermatogònies A de nucli pàl·lid:* presenten una cromatina altament condensada i una freqüència de divisió baixa que es produeix per tal de duplicar-se a si mateixes o per donar lloc a espermatogònies A de nucli fosc.

- *Espermatogònies A de nucli fosc*: presenten una cromatina poc condensada i una major freqüència de divisió per tal de duplicar-se a si mateixes o donar lloc a espermatogònies B.
- *Espermatogònies B*: aquest tipus cel·lular entrarà en la següent fase, la meiosi, i esdevindrà espermatòcit primari per tal de continuar el procés de desenvolupament de la cèl·lula espermàtica (Figura 1.2).

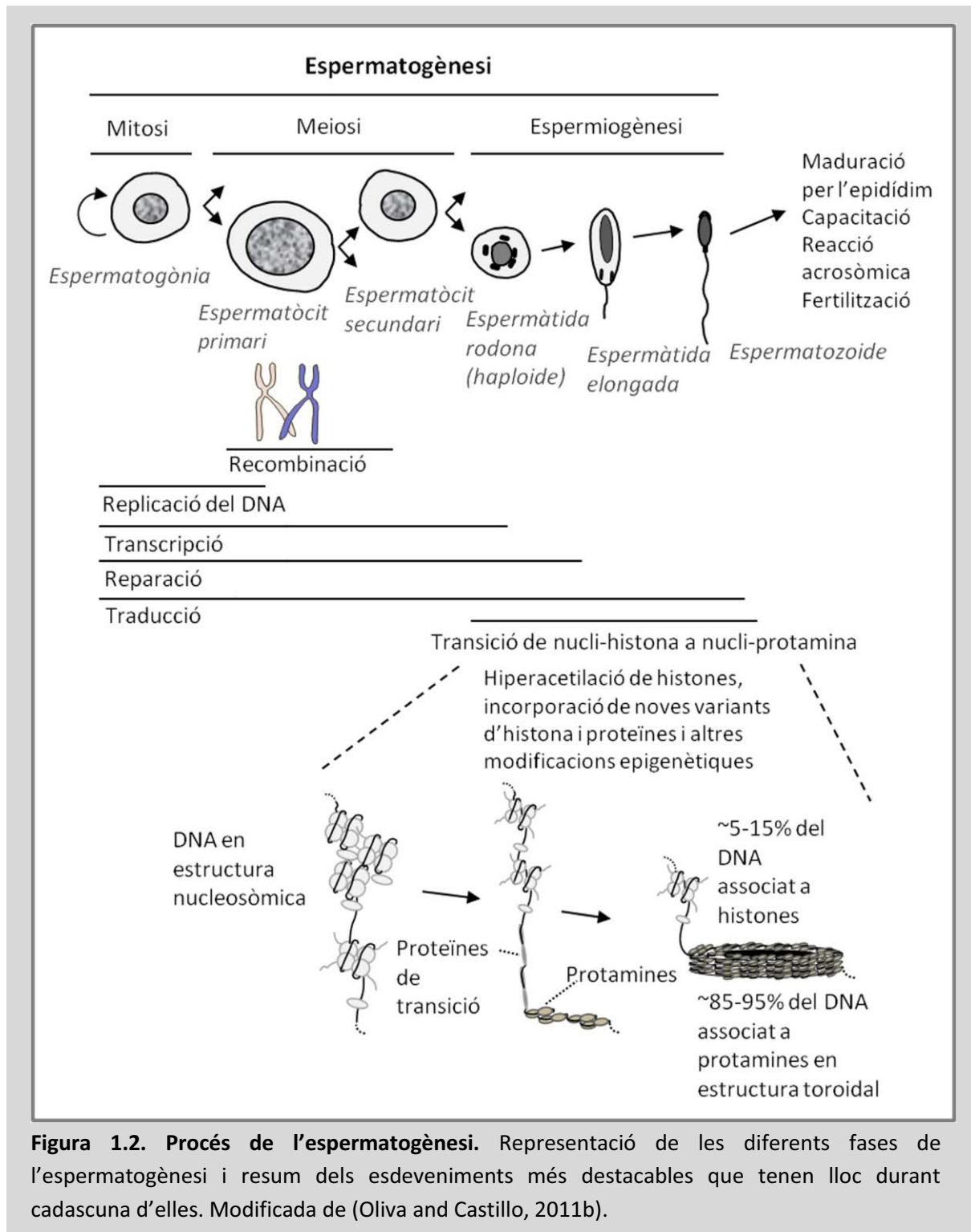
Durant aquesta fase proliferant es produeixen fenòmens de replicació de DNA, transcripció, reparació i traducció (Figura 1.2). Les espermatogònies A es multipliquen contínuament mitjançant mitosis successives, tot i això, aquestes divisions solen ser incompletes i les cèl·lules filles romanen interconnectades per ponts citoplasmàtics (Figura 1.3) (Burgos and Fawcett, 1955; Dym and Fawcett, 1971). Aquestes interconnexions entre les cèl·lules germinals en desenvolupament s'aniran mantenint en les fases posteriors fins a l'estadi d'espermàtida (Figura 1.2 i 1.3) el que permetrà que totes les cèl·lules disposin d'un genoma diploide complet (Holstein *et al.*, 2003). Aquest fet és molt important ja que assegura la supervivència per una banda de les cèl·lules que han rebut una còpia gènica defectuosa, i, per l'altra banda, dels espermatozoides portadors del cromosoma Y.

II. Fase meiòtica:

Les cèl·lules germinals en aquesta fase s'anomenen espermatòcits i són les cèl·lules espermatogèniques més grans a l'epiteli germinal. Els espermatòcits seran sotmesos a dues divisions meiòtiques consecutives reduint així a la meitat el seu contingut cromosòmic (Figura 1.1 i 1.2).

La meiosi s'inicia doncs al compartiment basal del túbul seminífer amb l'espermatòcit primari en estadi citològic de leptotè de la profase. A mesura que va progressant en els següents estadis de la profase (zigotè, paquitè i diplotè) l'espermatòcit primari realitza una migració a través de la barrera formada per les cèl·lules de Sertoli. Durant la profase es produeix la replicació del DNA, la condensació dels cromosomes i la recombinació homòloga d'aquests (Figura 1.2). Una vegada es produeix la primera divisió meiòtica, les cèl·lules esdevenen espermatòcits secundaris, els quals són sotmesos a una segona divisió sense duplicació del material genètic donant lloc a quatre cèl·lules haploides que passaran a anomenar-se espermàtides rodones (Holstein *et al.*, 2003). S'estima que en l'esser humà, la primera divisió meiòtica requereix de aproximadament 24 dies, mentre que la segona divisió meiòtica dura unes 6 hores (de Kretser *et al.*, 1998).

Diferents proteïnes desenvolupen papers claus en aquesta fase de la meiosi. Són especialment destacables la presència i la funció de diferents variants d'histones, com la H2A.X, tal i com s'explica més endavant a la Secció 1.2.2 de la Introducció.



III. Espermiogènesi:

És en aquesta última fase de l'espermatogènesi quan, tot i que no es produeix cap divisió cel·lular, es donen lloc els canvis més marcats i complexes a nivell morfològic i estructural, els quals requereixen una gran activitat transcripcional i traduccional inicial (Sutovsky and Manandhar, 2006). Els canvis principals són els següents:

- Reducció de la mida de la cèl·lula i pèrdua de la gran majoria del citoplasma, que serà fagocitat per les cèl·lules de Sertoli.
- Desplaçament del nucli a la perifèria de la cèl·lula.
- Remodelació de la estructura de la cromatina.
- Adquisició d'estructures accessòries noves que seran especialment necessàries per obtenir el potencial fertilitzant de la cèl·lula, com són l'acrosoma (lisosoma modificat format a partir de l'aparell de Golgi que s'uneix a la superfície del nucli) i el flagel (formació de microtúbuls a partir dels centríols de la espermàtida rodona).

A mesura que es van produint aquests canvis, l'espermàtida rodona esdevé espermàtida elongada i finalment espermatozoide (Figura 1.2).

De tots els canvis indicats, i pel que fa a aquesta tesi doctoral, és especialment interessant detallar els esdeveniments bioquímics que es produeixen en el nucli de la cèl·lula espermàtica durant aquesta fase d'espermioogènesi i que resulten en una completa remodelació de la estructura de la cromatina (Figura 1.2). En primer lloc, es produeix un reemplaçament d'histones nucleosomals somàtiques per variants menys estables i específiques de testicle, com per exemple la histona H2B tipus 1-A. De forma simultània es dona lloc un increment de l'acetilació de les histones, principalment de la histona H4, resultant en una cromatina d'estructura més laxa que permetrà l'acció de les topoisomerases (Oliva and Mezquita, 1982; Oliva *et al.*, 1990). Els canvis en la topologia del DNA provocats pels talls produïts per les topoisomerases, en especial per la topoisomerasa II, afectaran a la dissociació de les histones del DNA i a l'acoblament d'unes noves proteïnes anomenades proteïnes de transició 1 i 2 (TP1 i TP2; Figura 1.2) (Roca and Mezquita, 1989). En aquest procés d'hiperacetilació de les histones sembla ser de gran importància el paper que desenvolupen les proteïnes que contenen dominis *bromodomains*, i més específicament la proteïna *Testis-specific bromodomain-containing protein (BRDT)*, la qual s'uneix a la histona H4 durant el procés (Dhalluin *et al.*, 1999; Pivot-Pajot *et al.*, 2003; Govin *et al.*, 2004; Moriniere *et al.*, 2009; Dhar *et al.*, 2012). Les proteïnes TP1 i TP2, que substitueixen les histones, són proteïnes de basicitat intermèdia que acabaran sent completament reemplaçades per les protamines (Figura 1.2) (Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006; Oliva and Castillo, 2011a; Carrell, 2012; Rathke *et al.*, 2013). Aquestes últimes proteïnes presenten una elevada basicitat i es troben exclusivament en els espermatozoides empaquetant el DNA en una estructura unes 10 vegades més compacta que la formada per les histones (Miller *et al.*, 2010). Aquest fet provoca en aquest punt de l'espermatogènesi la reducció del volum de la cèl·lula i la inhibició de l'activitat transcripcional (Oliva, 2006) (Figura 1.2; Veure Secció 1.2.2. de la Introducció). D'aquesta manera, i com a resum, al final d'aquest procés es dona un canvi en l'estructura d'empaquetament del DNA en forma de

1. Introducció

nucleosomes, la qual passa a ser una estructura d'empaquetament per protamines en compactes toroides. És el que s'anomena transició d'estructura nucli-histònica a estructura nucli-protamínica (Figura 1.2) (Mezquita, 1985; Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006). Diverses variants d'histones s'han descrit com crucials pel bon desenvolupament d'aquest esdeveniment, les quals es troben descrites a la Secció 1.2.2. de la Introducció.

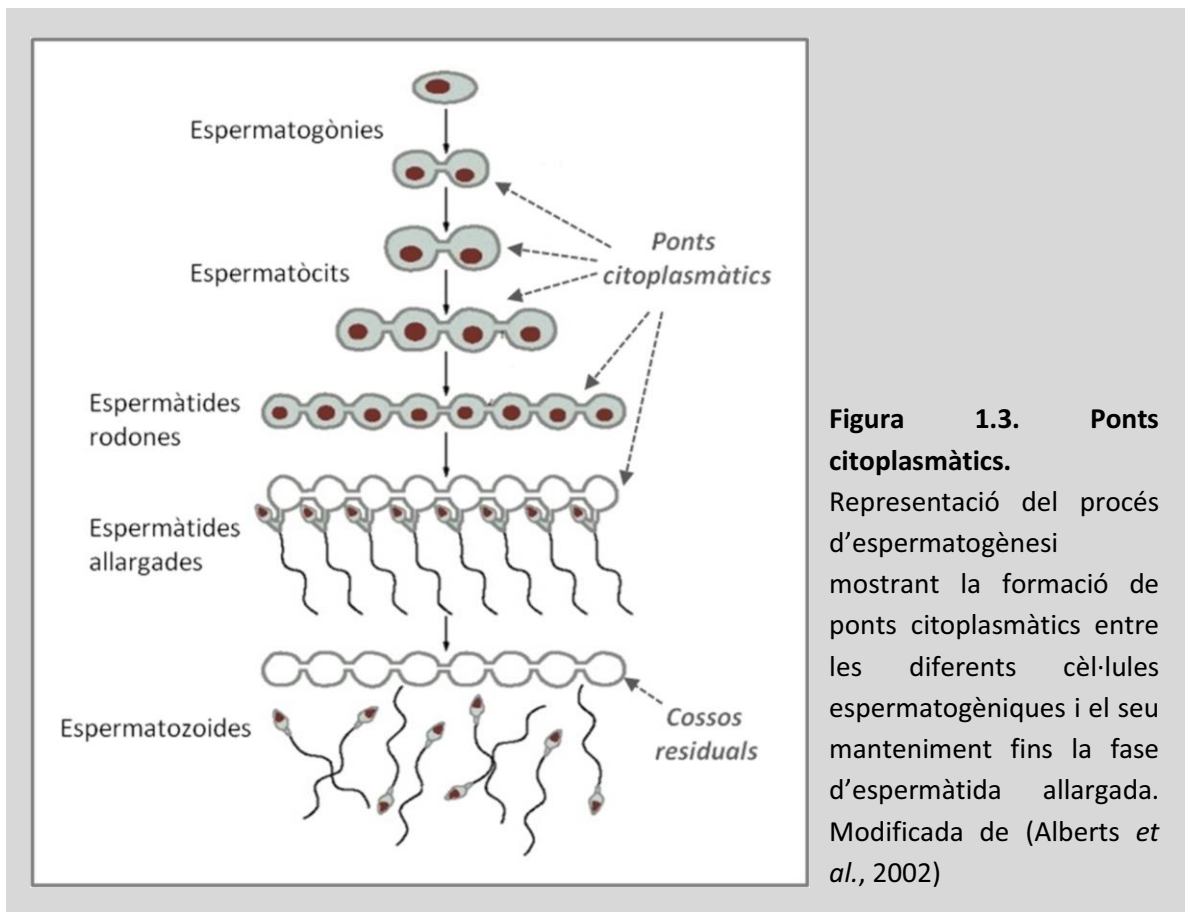


Figura 1.3. Ponts citoplasmàtics.

Representació del procés d'espermatogènesi mostrant la formació de ponts citoplasmàtics entre les diferents cèl·lules espermatogèniques i el seu manteniment fins la fase d'espermàtida allargada. Modificada de (Alberts *et al.*, 2002)

1.1.2. Altres cèl·lules del testicle i regulació de l'espermatogènesi

A més a més de les cèl·lules espermatogèniques i de les cèl·lules de Sertoli ja esmentades, en el teixit connectiu que hi ha entre els diferents túbuls seminífers dels testicles es troben presents altres tipus cel·lulars necessaris per al bon desenvolupament de l'espermatogènesi. El més destacable són les cèl·lules de Leydig, les quals es troben envoltant els capil·lars sanguinis, generant i secretant andrògens com la testosterona. D'aquesta manera, les cèl·lules de Leydig es troben involucrades en la regulació hormonal de l'espermatogènesi (Holstein *et al.*, 2003).

El procés de l'espermatogènesi està regulat i mantingut per diferents factors intrínsecs i extrínsecs (Holstein *et al.*, 2003):

- **Factors intrínsecs de regulació:** en aquest aspecte es troben involucrades les cèl·lules de Leydig, tal i com s'ha comentat anteriorment, mitjançant la secreció de la testosterona i altres substàncies neuroendocrines i factors de creixement. Aquestes substàncies influeixen tant a la nutrició de les cèl·lules de Sertoli com en la contracció de les cèl·lules mioïdes (veure més endavant en aquesta secció).
- **Factors extrínsecs de regulació:** es tracta d'una regulació hormonal provinent del cervell. De forma molt resumida, es dona la secreció de la hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH) de l'hipotàlem, la qual inicia l'alliberament de la hormona luteïnitzant (LH) de la hipòfisi. Aquests fets estimularan les cèl·lules de Leydig en la síntesi i secreció de testosterona. Per altra banda, la hormona pituïtària fol·liculostimulant (FSH) també tindrà una acció, en aquest cas estimulant les cèl·lules de Sertoli, les quals sintetitzaran inhibina com a mecanisme de retorn a la hipòfisi.

Per últim, al testicle també hi són presents cèl·lules mioïdes o peritubulars que faciliten el desplaçament dels espermatozoides al llarg dels túbuls seminífers; macròfags capaços d'entrar als túbuls seminífers per fagocitar espermatozoides; limfòcits lliures i fibroblasts.

1.1.3. L'espermatozoide humà, la maduració a través de l'epidídim i la capacitació

El producte final del procés d'espermatogènesi és l'espermatozoide diferenciat, el qual deixarà d'estar unit a altres cèl·lules per ponts citoplasmàtics i serà alliberat de l'epiteli germinal a la llum del túbul seminífer mitjançant les cèl·lules de Sertoli (Figura 1.1). Aquest procés s'anomena espermiació (Holstein *et al.*, 2003).

L'espermatozoide és una cèl·lula única i molt especialitzada, amb morfologia piriforme i inerta transcripcional i traduccionalment (Oliva and Castillo, 2011a; Amaral *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2014). L'espermatozoide humà presenta uns 60 µm de llargada i es troba format pel cap i la cua, dues regions morfològica i funcionalment diferents que es troben envoltades per membrana plasmàtica (Alberts *et al.*, 2002; Holstein *et al.*, 2003) (Figura 1.4):

- El *cap* de l'espermatozoide humà té un diàmetre de 4-5 µm i conté el nucli (Veure Secció 1.2. de la Introducció) i el material genètic patern haploide (Holstein *et al.*, 2003; Toshimori and Ito, 2003). Al voltant del nucli, i cobrint les seves dues terceres parts anteriors, es troba l'acrosoma, una vesícula que conté els enzims hidrolítics necessaris per facilitar la penetració de l'espermatozoide a l'oòcit (Alberts *et al.*, 2002).

1. Introducció

- La *cua* de l'espermatozoide conté el flagel, el qual presenta un diàmetre de 1-2 μm i una llargada de 60 μm (Holstein *et al.*, 2003). El flagel es pot dividir en quatre parts principals: el coll, la peça intermèdia, la peça principal i la peça terminal (Figura 1.4). A la peça intermèdia es troben les mitocòndries, necessàries per adquirir energia pel moviment del flagel a través d'un medi aquós (Alberts *et al.*, 2002).

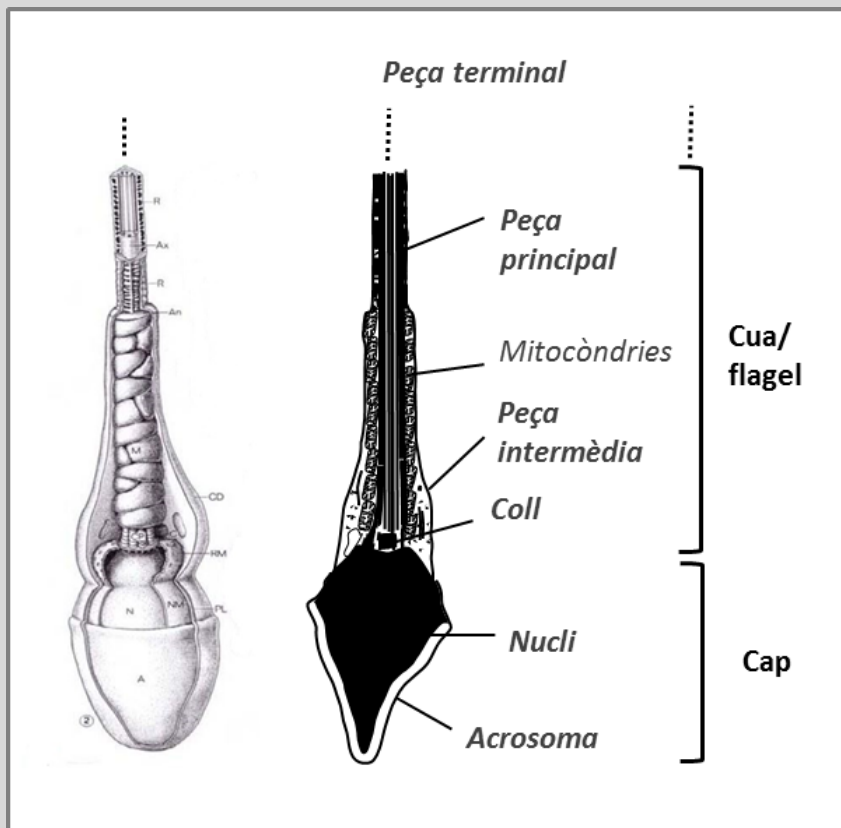


Figura 1.4. L'espermatozoide humà diferenciat. A la esquerra es pot observar una representació esquemàtica de l'espermatozoide madur. A la dreta es mostra una imatge de microscopia. Es poden diferenciar les diferents parts de l'espermatozoide. Basada en (Holstein *et al.*, 2003)

Tot i això, una vegada alliberat a la llum del túbul seminífer, l'espermatozoide encara es troba en un estat funcionalment immadur i sense capacitat de moviment. És per aquest motiu que la cèl·lula espermàtica experimenta una maduració a través del seu pas per l'epidídim, donada principalment per l'aparició de modificacions post-traduccionals (*Post-translational modifications, PTM*) en les proteïnes, que proporcionaran motilitat a la cèl·lula (Baker *et al.*, 2012). Durant aquest trànsit també es produeix l'eliminació de la gota citoplasmàtica (que es queda a nivell de la zona intermèdia del flagel després de que s'elimini la gran majoria del citoplasma) (Sutovsky and Manandhar, 2006) i l'estabilització

del nucli amb la formació de ponts disulfur entre protamines adjacents (Saowaros and Panyim, 1979; Oliva, 2006).

Després del pas per l'epidídim, els espermatozoides arriben al conducte deferent on adquireixen el líquid seminal de la pròstata per donar lloc a la formació del semen. No obstant, els espermatozoides encara requereixen uns canvis finals per adquirir la capacitat fertilitzant completa. Aquest últim procés de maduració es produeix ja dins del tracte reproductor femení i s'anomena capacitació. Principalment, durant la capacitació es produeix un canvi bioquímic en la composició de la membrana del cap de l'espermatozoide. Aquest fet permetrà el desenvolupament de la reacció acrosòmica (alliberació dels enzims continguts a l'acrosoma) que tindrà lloc una vegada el gàmeta masculí contacti amb la zona pel·lúcida de l'òocit, afavorint la fecundació (Zaneveld *et al.*, 1991) (Veure Secció 1.6. de la Introducció).

1.2. El nucli de l'espermatozoide humà madur

Com s'ha comentat a la secció anterior, la formació del cap de l'espermatozoide es produeix durant l'espermioogènesi, la última fase de l'espermatogènesi. Tot i estar envoltat per la membrana plasmàtica i l'acrosoma, gairebé la totalitat del cap de l'espermatozoide està constituïda pel nucli (Figura 1.4), que a la vegada es troba protegit per la membrana nuclear. L'espai que queda entre el nucli i la membrana plasmàtica correspon a la teca perinuclear (*perinuclear theca*), la qual és considerada un element del citoesquelet que forma part de la petita porció de citoplasma que roman a la cèl·lula espermàtica madura (Dadoue, 1995; Toshimori and Ito, 2003).

L'estat final i correcte del nucli ve donat per dos esdeveniments principals que succeeixen durant l'espermioogènesi: l'adquisició de la forma de nucli compacte i el correcte reemplaçament d'histones per protamines. Moltes de les anomalies morfològiques del nucli de l'espermatozoide es produiran per defectes en aquesta fase.

El nucli de l'espermatozoide madur conté principalment el material genètic patern i les proteïnes involucrades en l'empaquetament d'aquest. Tot i això, en els últims anys s'ha observat la presència d'altres proteïnes nuclears diferents a histones i protamines. El coneixement tant de l'organització del DNA al nucli de l'espermatozoide com de les proteïnes nuclears que es troben presents són d'importància rellevant pel que fa a la funció de l'espermatozoide i el seu paper en la fertilització.

1.2.1. Organització del DNA espermàtic

Tot i que durant l'espermioogènesi les histones es dissocien del DNA per donar lloc a la incorporació de protamines, aquest reemplaçament no es dona de forma completa. Com a resultat d'aquest fet, la gran majoria del genoma de l'espermatozoide humà, 85-95%, es troba empaquetat per protamines, mentre que un 5-15% roman empaquetat per histones (Gatewood *et al.*, 1987, 1990; Zalensky *et al.*, 2002; Balhorn, 2007; Oliva and Castillo, 2011a, 2011b) (Figura 1.5). La quantitat d'histones que queden retingudes en la cromatina de l'espermatozoide madur varia segons les espècies animals, en ratolí, per exemple, només s'observa un 1% de retenció (Bench *et al.*, 1998; Pittoggi *et al.*, 2001).

D'aquesta manera, la cromatina a l'espermatozoide humà presenta una estructura molt compacta, única i especialitzada, que es troba organitzada en dos dominis ben diferenciats: el domini nucli-histònic i el domini nucli-protamínic.

- *Domini nucli-histònic (NH)*: en aquest domini el DNA es troba empaquetat en forma de nucleosomes, els quals corresponen a octàmers de 5,5 nm d'alçada i 10 nm d'amplada formats per dues molècules de cadascuna de les histones nucleosomals: H2A, H2B, H3 i H4 (Figura 1.5). A part d'aquestes histones també es troben presents

altres variants específiques de testicle (Veure Secció 1.2.2. de la Introducció). A més a més, entre nucleosomes es pot trobar DNA unit a la histona H1 que actuarà com a enllaç entre nucleosomes. S'estima que la quantitat de DNA empaquetat en un nucleosoma sumat al de l'enllaç és aproximadament d'uns 200 pb (Figura 1.5) (Lilley and Pardon, 1979; Miller *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2014). Estudis recents han demostrat que la distribució de les histones al llarg de la cromatina espermàtica no és donada a l'atzar, suggerint la presència de dos tipus de distribucions diferents: en fraccions relativament llargues de DNA de 10 a 100 kb per una banda, i en fraccions més petites intercalades entre els toroides formats per les protamines per l'altra (Sotolongo *et al.*, 2003; Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009; Ward, 2010) (Figura 1.5). Addicionalment, s'ha observat com aquest domini de la cromatina espermàtica, més obert i accessible que el domini nucli-protamina, es troba preferentment associat a gens segellats o *imprintats*, gens i promotors de gens del desenvolupament, factors de senyalització i microRNAs, tal i com s'explica amb més detall més endavant a la Secció 1.5.4 de la Introducció.

- *Domini nucli-protamínic (NP)*: l'empaquetament de DNA per protamines resulta en la formació d'una estructura en forma de toroides d'uns 25 nm d'alçada i uns 50-70 nm d'amplada, que pot arribar a empaquetar 50.000 pb de DNA (Figura 1.5) (Hud *et al.*, 1993; Ward, 2010; Castillo *et al.*, 2014). A cada toroide s'observen dos tipus de protamina, la Protamina 1 i la família de la Protamina 2, que es troben explicades més endavant a la Secció 1.2.2. de la Introducció. Aquest alt grau de compactació resulta en una estructura semi cristal·lina i resistent a la digestió amb nucleases que inhibeix l'activitat transcripcional (Sotolongo *et al.*, 2003; Oliva, 2006; Balhorn, 2007), el que converteix la protaminació en una forma de regulació epigenètica no tradicional que és única dels espermatozoides (Carrell, 2012).

Addicionalment als dominis NH i NP de la cromatina espermàtica, s'ha observat com petites fraccions de DNA es troben unides al que es coneix com matriu nuclear o *nuclear matrix* (Figura 1.5) (Ward and Coffey, 1990; Ward, 2010). Aquestes unions a la matriu nuclear s'han detectat també entre els diferents toroides a la estructura NP (Sotolongo *et al.*, 2005). S'ha observat com la presència d'unions entre el DNA i la matriu nuclear podrien ser necessàries per la correcta replicació del DNA del pronucli masculí durant l'embriogènesi (Shaman *et al.*, 2007). No obstant, també s'ha proposat un paper com a punt de control o *checkpoint* per la integritat del DNA una vegada donada la fertilització (Ward, 2010).

Aquesta forma de condensació del DNA en dominis NH i NP, única dels espermatozoides, es donaria principalment per protegir el DNA durant el trànsit de l'espermatozoide fins arribar a l'oòcit, tot i que també podria suposar un tipus de marca epigenètica amb un paper important durant les primeres fases del desenvolupament embrionari (Veure Secció 1.5.4. de la Introducció).

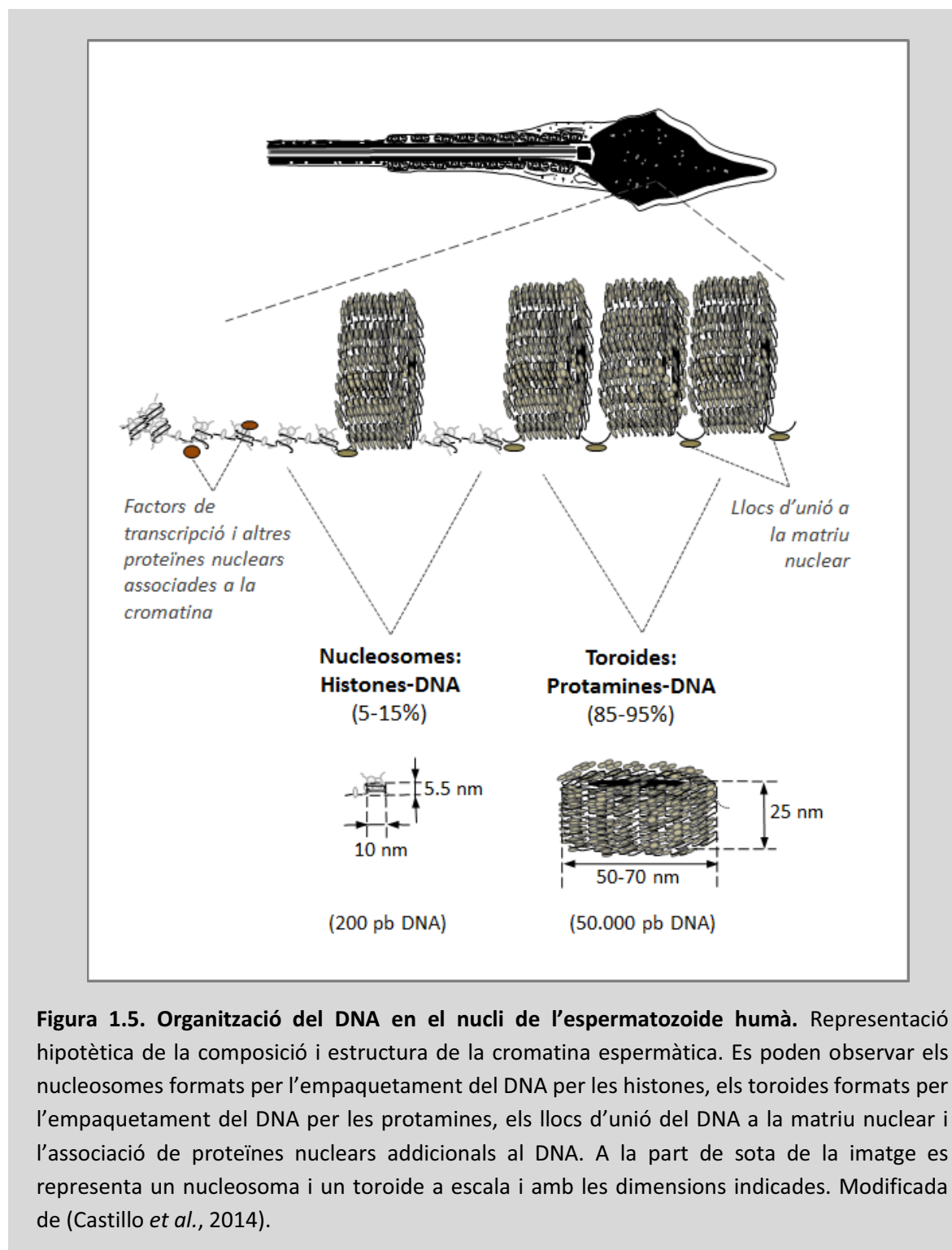


Figura 1.5. Organització del DNA en el nucli de l'espermatozoide humà. Representació hipotètica de la composició i estructura de la cromatina espermàtica. Es poden observar els nucleosomes formats per l'empaquetament del DNA per les histones, els toroides formats per l'empaquetament del DNA per les protamines, els llocs d'unió del DNA a la matriu nuclear i l'associació de proteïnes nuclears addicionals al DNA. A la part de sota de la imatge es representa un nucleosoma i un toroide a escala i amb les dimensions indicades. Modificada de (Castillo *et al.*, 2014).

1.2.2. Nucleoproteïnes espermàtiques

Les proteïnes majoritàries del nucli de l'espermatozoide humà són les protamines, tot i que també hi són presents diferents variants d'histones i altres proteïnes nuclears

d'especial interès (Oliva and Castillo, 2011a; Castillo *et al.*, 2014). Tots aquests tipus de nucleoproteïnes espermàtiques es detallen a continuació:

I. Protamines:

Es coneixen dos tipus de protamines en vertebrats: la protamina 1 (P1) i la família de protamina 2 (P2), les quals van ser observades per primer cop fa més d'un segle en espermatozoide de salmó per Friedrich Miescher (Dahm, 2005). Els gens corresponents a ambdues protamines (PRM1 i PRM2, respectivament) es troben localitzats al cromosoma 16 i organitzats en un domini en forma de *loop* juntament al gen de la proteïna de transició TNP2, el que facilitarà una expressió coordinada d'aquests gens durant l'espermioogènesi (Oliva, 2006).

Tot i que els dos productes respectius dels gens PRM1 i PRM2 donen lloc a proteïnes amb característiques similars (són proteïnes petites que presenten un alt contingut d'aminoàcids amb càrrega positiva, en especial d'arginina), existeixen algunes diferències entre ells (Felix, 1960; Dixon and Smith, 1968; Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006; Balhorn, 2007):

- Protamina 1 (P1): es troba present en totes les espècies de vertebrats estudiades i es sintetitza com a proteïna madura. La seqüència de la P1 humana té 51 aminoàcids, 6.823 Da i un pI de 12,08, amb un 47,1% de residus d'arginines (Figura 1.6).
- Família de Protamina 2 (P2): el gen PRM2 només s'ha detectat en algunes espècies de mamífers i codifica per una forma immadura o precursor (pre-P2) que mitjançant proteòlisi donarà lloc als diferents components de la família: P2, P3 i P4. Aquests 3 components només difereixen entre ells per un rang de 1-4 aminoàcids a l'extrem amino terminal de la proteïna (Figura 1.6). El component majoritari és el P2, el qual és el més llarg i el que dóna nom a aquesta família. La seqüència de P2 humana té 102 aminoàcids, 13.051 Da i un pI de 11,9, amb un 31,4% d'arginines i un 2% de lisines (Figura 1.6).

L'elevada càrrega positiva que presenten ambdues protamines és necessària per la unió i empaquetament del DNA, tot i això, aquestes característiques fisicoquímiques fan que no es puguin estudiar amb mètodes convencionals, si no que requereixen de tractaments àcids forts per extreure-les i d'electroforesis monodimensionals àcides per visualitzar-les (de Yebra and Oliva, 1993) (Figura 1.7). A més a més, incorporen cisteïnes en la seva seqüència, fet que permet la creació de ponts disulfur intra i intermoleculars que estabilitzaran fortament el complex NP però que dificultaran el seu anàlisi i quantificació al laboratori (Veure Secció 3.3.4. de Material i Mètodes).

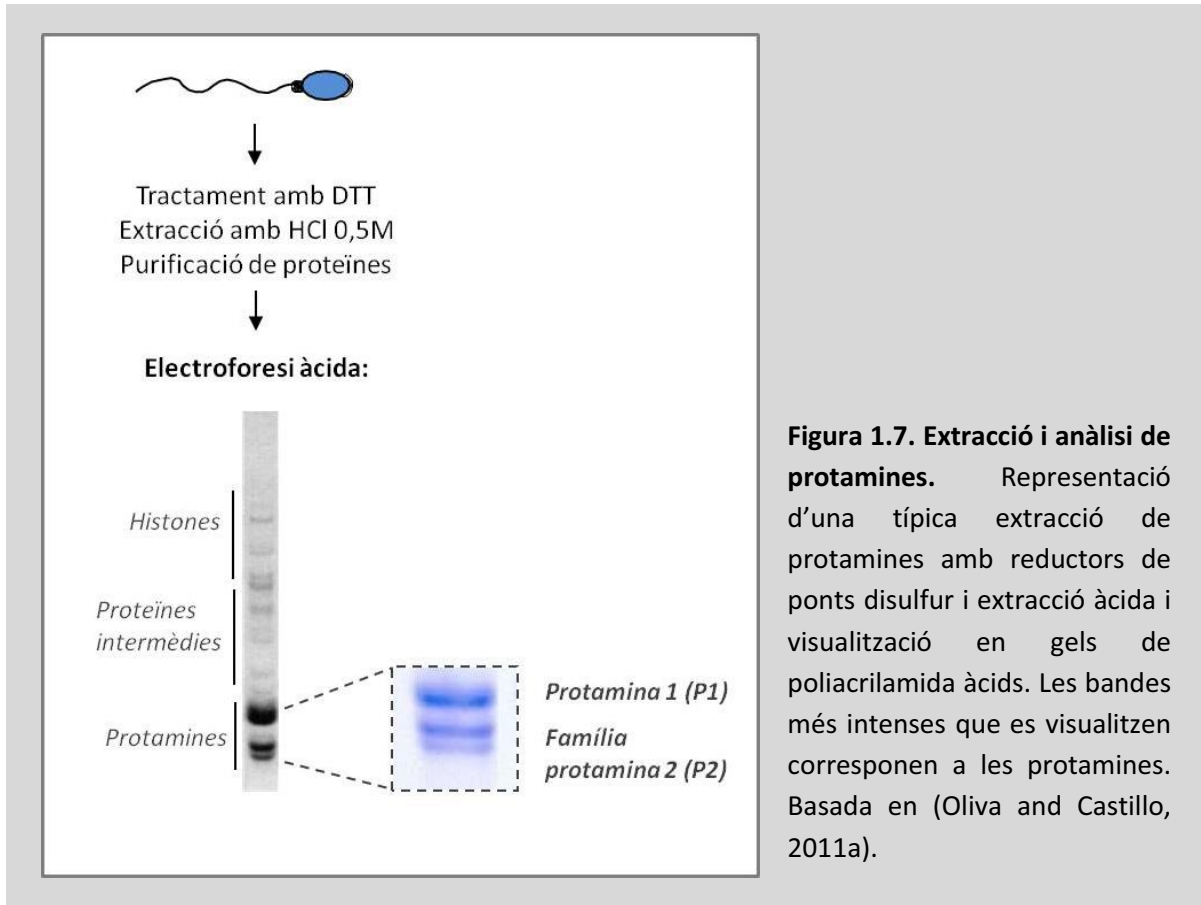


Figura 1.7. Extracció i anàlisi de protamines. Representació d'una típica extracció de protamines amb reductors de ponts disulfur i extracció àcida i visualització en gels de poliacrilamida àcids. Les bandes més intenses que es visualitzen corresponen a les protamines. Basada en (Oliva and Castillo, 2011a).

II. Histones i variants d'histones:

Entre el 10-15% de nucleosomes que queden retinguts a l'espermatozoide humà s'han identificat diferents histones i variants d'histones, algunes d'elles específiques de testicle. S'han destacat diverses d'elles per la seva funció rellevant durant l'espermatogènesi, ja que s'ha suggerit que el desacoblament de les histones a l'espermioogènesi es troba precedit per una incorporació massiva de variants d'histones. No obstant, també s'han proposat papers durant el desenvolupament embrionari primerenc per algunes de les variants identificades a l'espermatozoide (Veure Secció 1.5.3. de la Introducció). Les funcions desenvolupades per aquestes variants d'histones moltes vegades venen donades per les modificacions post-traduccional que carreguen, fet que defineix l'anomenat codi d'histones (Jenuwein and Allis, 2001).

Les variants d'histones més destacables per la seva funció durant l'espermatogènesi es detallen a continuació:

- *Histona H1 testicular (Testicular H1 histone; H1t):* aquesta variant d'H1 específica de testicle apareix durant la fase meiótica de l'espermatogènesi. S'ha observat com la interacció entre H1t i els nucleosomes dona lloc a estructures menys compactes que altres variants d'H1, el que suggeriria un paper en la descompactació de la

cromatina per donar accessibilitat a factors de remodelació (De Lucia *et al.*, 1994; Govin *et al.*, 2004).

- *Histona H2A.Bbd (H2A.Bbd)*: es troba codificada al cromosoma X i s'ha observat en fraccions avançades de cèl·lules espermatogèniques que estan sent sotmeses a l'acetilació d'histones prèvia al seu desacoblament. D'aquesta manera s'ha proposat un paper en la participació del procés de transició NH-NP (Ishibashi *et al.*, 2010).
- *Histona H2AX (H2AX)*: l'H2AX desenvolupa un paper important durant la meiosi, ja que s'ha associat amb el reconeixement del dany en el DNA que es pot produir durant l'espermatogènesi. En aquest cas, la seva fosforilació en la serina 139 sembla ser imprescindible per realitzar aquesta funció (Celeste *et al.*, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003a). A més a més, també s'ha proposat un paper com a mediadora de la inactivació dels cromosomes sexuals en aquesta mateixa fase (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003b).
- *Histona macro-H2A (Core Histone macro-H2A)*: aquesta variant és gairebé tres vegades més llarga que la canònica H2A i conté una regió no-histona molt bàsica a la fracció C-terminal de la seqüència, amb capacitat d'unió a àcids nucleics i altres estructures associades a les interaccions proteïna-proteïna (Pehrson and Fried, 1992; Churikov *et al.*, 2004). S'han observat tres isoformes tant en humà com en ratolí, macroH2A1.1, macroH2A1.2 i macroH2A2. Aquesta variant s'ha relacionat amb l'aparellament dels cromosomes sexuals durant la fase de paquitè de l'espermatogènesi (Hoyer-Fender *et al.*, 2000).
- *Histona H2B 1-A (Histone H2B type 1-A)*: la seva homòloga en ratolí és la TH2B, la qual és una de les variants d'histones específiques de testicle millor caracteritzades. S'ha trobat associada a la heterocromatina pericèntrica en espermatòides i s'ha observat com aquesta proteïna és clau en l'espermatogènesi dirigint el procés de desestabilització de nucleosomes previ a la incorporació de proteïnes de transició i protamines. També s'ha proposat un paper en el procés de remodelació que es donaria després de la fecundació, la transició de protamines a histones (Govin *et al.*, 2007; Montellier *et al.*, 2013).
- *Histone H3.3*: aquesta variant d'histona H3 s'incorpora durant la profase de la primera divisió meiótica de l'espermatogènesi, es concentra en unes zones limitades de la cromatina i després desapareix juntament amb altres histones durant l'espermogènesi. El fet que aquesta variant hagi estat relacionada en cèl·lules somàtiques amb regions transcripcionalment actives ha suggerit un possible paper de la H3.3 en els espermatòcits durant la etapa d'activació de la transcripció que es dona durant la meiosi (Govin *et al.*, 2004).

III. Altres nucleoproteïnes espermàtiques:

El coneixement i l'estudi de les proteïnes nuclears espermàtiques han estat tradicionalment basats en l'aplicació de tècniques convencionals que es limitaven a la identificació de les proteïnes més abundants de la cromatina espermàtica, és a dir, protamines i histones (Oliva and Dixon, 1991; Bench *et al.*, 1998; Oliva, 2006; Balhorn, 2007; Carrell *et al.*, 2008). No obstant, un major coneixement del contingut proteic de l'espermatozoide va esdevenir amb el desenvolupament de tècniques proteòmiques basades en l'espectrometria de masses. Mitjançant l'ús d'aquestes tècniques s'han realitzat estudis d'anàlisi del proteoma de l'espermatozoide humà total, arribant a descriure més d'un miler de proteïnes diferents (Martinez-Heredia *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2007). De les proteïnes identificades una petita proporció corresponien a proteïnes nuclears, entre les quals es trobaven alguns factors de transcripció i proteïnes involucrades en altres processos nuclears. Més informació sobre estudis del contingut proteic de l'espermatozoide utilitzant tècniques avançades de proteòmica es troba a la Secció 1.4. de la Introducció.

1.3. Infertilitat/subfertilitat masculina

Al llarg del temps s'han proposat diferents definicions pel terme infertilitat. Segons la Organització Mundial de la Salut (*World Health Organization, WHO*) la infertilitat es defineix com la incapacitat d'una parella sexualment activa d'aconseguir un embaràs després d'un any d'intents regulars sense utilitzar mètodes anticonceptius (*World of Health Organization, 2010*). En molts casos es diferencia entre el terme infertilitat, com la incapacitat de dur un embaràs a terme, i el terme esterilitat, com la incapacitat de concebre. D'aquesta manera, una dona que pateix un avortament durant l'embaràs es consideraria infèrtil però no estèril. De qualsevol manera, degut als avanços generats per les tècniques de reproducció assistida s'ha fet possible arribar a tractar la gran majoria de pacients infèrtils o estèrils, fent que aquesta incapacitat de concebre o obtenir descendència sigui un concepte relatiu (Veure Secció 1.3.3. de la Introducció). Per aquest motiu, s'ha establert l'ús d'un nou terme, el de subfertilitat, per tal de designar tots aquells individus que no aconsegueixen tenir descendència de forma espontània (Evers, 2002).

És important tenir en compte que tant la infertilitat com la subfertilitat són considerades un problema de parella, el qual afecta al 15-20% de la població en edat reproductiva. S'ha estimat que aproximadament en el 40% d'aquests casos el problema és degut a un factor masculí, mentre que un altre 40% és degut a un factor femení i un 20% a un factor conjunt (Oliva and Ballescà, 1999; Ballescà and Oliva, 2012).

Són múltiples els factors que poden interferir en la formació normal dels gàmetes (Pomerol and Arrondo, 1994). Es coneixen diverses malalties que cursen amb infertilitat en l'home, com el varicocele, la síndrome de Klinefelter o la síndrome de Morris. A més a més s'ha descrit la participació de diferents factors intrínsecs i extrínsecs:

- *Factors intrínsecs:* s'inclouen causes gonadals com la criptorquídia (donada per la deficiència en el descens dels testicles fins l'escrot), efectes secundaris d'infeccions (com per exemple les galteres) o obstruccions a l'epidídim o al conducte deferent. També es pot parlar de causes sistèmiques com alteracions hormonals, immunològiques, psicològiques o com efecte secundari de medicaments o malalties (per exemple, diabetis i obesitat). Per últim, s'han de considerar també els factors genètics com les anomalies cromosòmiques o les delecions del cromosoma Y.
- *Factors extrínsecs:* generalment es tracta de gonadotoxines, és a dir, substàncies que presenten un efecte tòxic que altera la producció normal d'espermatozoides. Entre les més estudiades trobem el tabac, les drogues i l'alcohol, o altres factors com la contaminació, la llum ultravioleta, metalls pesants, pesticides o els disruptors endocrins presents en l'aigua de beguda o en aparells electrònics, entre d'altres.

No obstant, i tot i que el coneixement sobre aquest desordre creix cada any, encara són molts els pacients en els que és difícil establir la causa específica de la infertilitat, donant lloc a casos d'infertilitat idiopàtica que requereixen un estudi detallat.

L'andrologia és la part de la medicina dedicada a l'estudi de l'aparell genital masculí i de les malalties associades, i entre les seves àrees d'interès es troba la infertilitat (Pomerol and Arrondo, 1994). Per tal d'estudiar el possible paper d'un factor masculí en una parella amb un problema d'infertilitat, l'estudi principal que es duu a terme en un laboratori d'andrologia és l'anàlisi de la qualitat seminal de l'ejaculat. El procediment establert per aquest anàlisi es detalla en el següent apartat.

1.3.1. Pràctiques andrològiques: anàlisi espermàtic

La WHO va crear al 1980 el *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction* per tal de respondre a la necessitat de proveir uns procediments estàndards per l'examinació de mostres de semen. Des d'aquella primera edició, el manual ha estat actualitzat diverses vegades. La cinquena i per ara última edició es va publicar al 2010 (World of Health Organization, 2010).

Seguint les guies estandarditzades de la WHO, l'anàlisi espermàtic s'ha de dur a terme en una mostra de semen que es recull per masturbació, en contenidors estèrils especials, després de 2-7 dies d'abstinència i havent proporcionat al pacient instruccions clares del procediment, tant escrites com orals. Una vegada obtingut l'ejaculat, aquest s'analitza a dos nivells, macroscòpic i microscòpic, obtenint l'anomenat seminograma.

- I. Anàlisi macroscòpic: consisteix en la comprovació d'una correcta líquüefacció, la valoració de la viscositat i el control del volum i pH de l'ejaculat. Altres característiques que es poden observar són l'olor o el color.
- II. Anàlisi microscòpic: es valora principalment la presència d'agregats d'espermatozoides, concentració, mobilitat, morfologia i viabilitat. El manual de la WHO estableix protocols detallats per tal de valorar cadascun d'aquests paràmetres. Per exemple, per mesurar la concentració (milions d'espermatozoides/ml) s'utilitza una cambra de comptatge, com la cambra Makler o la *Neubauer haemocytometer* (Figura 1.8). La mobilitat també es pot determinar manualment, tot i que esdevé més subjectiva que la concentració. Per aquest motiu es sol utilitzar sistemes computats com el sistema d'anàlisi CASA (*Computer-Aided Sperm Analysis*). S'han establert diferents tipus de mobilitat, de manera que es pot arribar a diferenciar entre espermatozoides amb mobilitat progressiva (aquells que es mouen activament ja sigui de forma lineal o en un gran cercle, independentment de la seva velocitat) i els espermatozoides amb mobilitat no progressiva (referent a altres patrons de mobilitat sense progressió, per exemple, moviment en petits cercles o *in*

1. Introducció

situ). Els espermatozoides que no presenten moviment seran considerats immòbils. Com a últim exemple, segons la WHO la morfologia s'avalua mitjançant preparacions d'espermatozoides en porta-objectes que seran sotmesos a una tinció (per exemple *Diff-Quick*[®]).

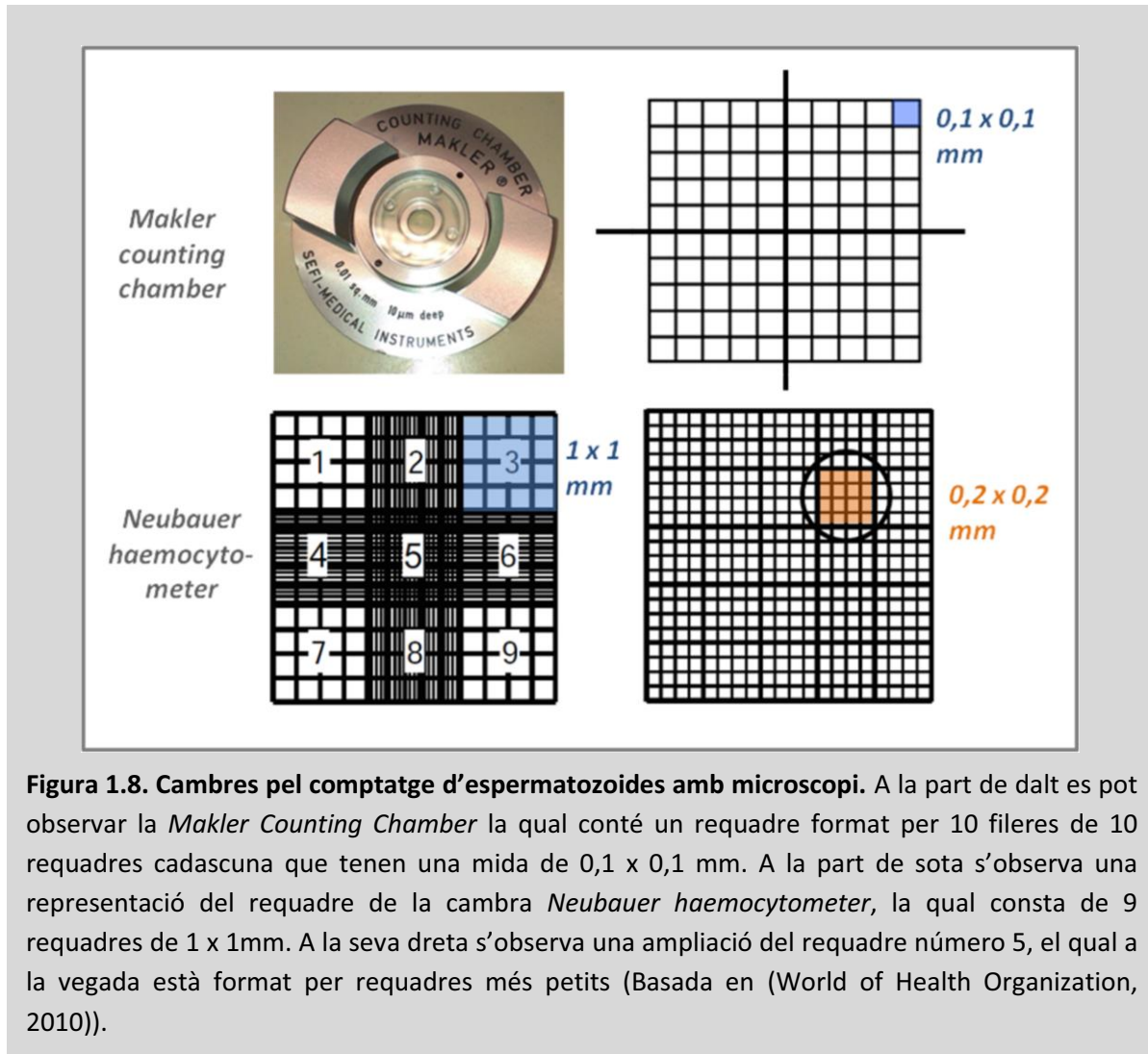


Figura 1.8. Cambres pel comptatge d'espermatozoides amb microscopi. A la part de dalt es pot observar la *Makler Counting Chamber* la qual conté un requadre format per 10 fileres de 10 requadres cadascuna que tenen una mida de 0,1 x 0,1 mm. A la part de sota s'observa una representació del requadre de la cambra *Neubauer haemocytometer*, la qual consta de 9 requadres de 1 x 1mm. A la seva dreta s'observa una ampliació del requadre número 5, el qual a la vegada està format per requadres més petits (Basada en (World of Health Organization, 2010)).

En la seva última edició, la WHO va actualitzar els valors de referència mínims per cadascun dels paràmetres indicats anteriorment que ha de presentar una mostra de semen per tal de ser considerada normal (Taula 1.1). Aquests valors es van establir després d'haver analitzat ejaculats aproximadament de 4.500 homes de 14 països diferents d'arreu del món, entre els quals es trobaven homes de fertilitat provada, homes de fertilitat desconeguda i homes amb paràmetres seminals considerats normals segons les edicions anteriors (Cooper *et al.*, 2010). D'aquesta manera, una mostra de semen que es troba per

sobre d'aquests límits de referència serà considerada normozoospèrmica. Depenent de quin paràmetre es trobi disminuït s'estableixen diferents fenotips patològics (Taula 1.1):

- *Azoospèrmia*: no hi ha detecció d'espermatozoides a l'ejaculat.
- *Criptoazoospèrmia*: no hi ha detecció d'espermatozoides en preparacions fresques però si que es poden observar al sediment després d'una centrifugació.
- *Oligozoospèrmia*: el número d'espermatozoides o la concentració es troben per sota del límit de referència.
- *Astenoazoospèrmia*: la proporció d'espermatozoides que presenten mobilitat progressiva es troba per sota del límit de referència.
- *Teratozoospèrmia*: la proporció d'espermatozoides que presenten una morfologia normal es troba per sota del límit de referència.
- *Necrozoospèrmia*: baixa proporció d'espermatozoides vius i gran quantitat d'espermatozoides immòbils.

També es poden observar mostres que presenten més d'un paràmetre alterat, donant lloc a fenotips combinats, com per exemple astenoazoospèrmia, astenoteratozoospèrmia, oligoastenoazoospèrmia, oligoteratozoospèrmia o oligoastenoteratozoospèrmia.

S'han establert altres fenotips si l'anomalia es troba a l'ejaculat:

- *Aspèrmia*: no es dona producció de semen.
- *Hemospèrmia*: presència d'eritròcits a l'ejaculat.
- *Leucospèrmia*: presència de leucòcits a l'ejaculat, en aquest cas per sobre del límit de referència.

És interessant notar que sempre que el sufix del fenotip sigui "*spèrmia*" ens estarem referint a una anomalia a l'ejaculat, mentre que quan el sufix sigui "*zoospèrmia*" l'anomalia es trobarà a l'espermatozoide.

Tot i això, és important tenir en compte que el terme normozoospèrmic no és sinònim de fèrtil i que per tant podem trobar homes amb un seminograma normal que presentin problemes de reproducció. S'ha de considerar que els espermatozoides poden presentar altres anomalies no reflectides en la morfologia, motilitat o inclús en la capacitat de fertilitzar l'òocit. Són exemples els polimorfismes o mutacions de gens concrets (Jodar *et al.*, 2011), la desregulació de proteïnes (de Yebra *et al.*, 1993; Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2007, 2009), les alteracions del patró de metilació del DNA o de la distribució NH-NP (Hammoud *et al.*, 2010, 2011; Azpiazu *et al.*, 2014) o la presència de fragmentació del DNA espermàtic (Aoki *et al.*, 2005a). Més detalls de l'estudi de l'última anomalia esmentada, la fragmentació del DNA, es descriuen a l'apartat següent.

Taula 1.1. Recull dels valors de referència mínims establerts per la WHO pels principals paràmetres avaluats en un seminograma. Valors mínims referents a altres paràmetres com pH, leucòcits positius a peroxidasa o zinc seminal, entre d'altres, es poden trobar a l'apèndix 1 del manual de la WHO (World of Health Organization, 2010).

<i>Paràmetre seminal</i>	<i>Valor mínim de referència</i>
Volum seminal (ml)	1,5
Nombre total d'espermatozoides (10^6 per ejaculat)	39
Concentració espermàtica (10^6 /ml)	15
Espermatozoides amb mobilitat progressiva (%)	32
Mobilitat total (espermatozoides amb mobilitat progressiva + espermatozoides amb mobilitat no progressiva, %)	40
Viabilitat (espermatozoides vius, %)	58
Morfologia espermàtica (espermatozoides amb morfologia normal, %)	4

1.3.2. Estudi de la fragmentació del DNA

La integritat del genoma dels gàmetes, tant de l'oòcit com de l'espermatozoide, és una característica fonamental a tenir en compte per aconseguir una fecundació amb èxit, la formació de l'embrió i la seva correcta evolució fins al final de l'embaràs. Especialment l'espermatozoide humà resulta ser molt susceptible a l'estrès oxidatiu, degut a que aquest procés indueix lesions a la membrana i fragmentació del DNA, tant nuclear com mitocondrial. El dany al DNA en l'espermatozoide es pot manifestar de diverses formes: talls a la cadena de DNA, llocs on s'ha perdut una base nuclear o modificacions de les bases o unions covalents entre cadenes de DNA o entre DNA i proteïnes (Aitken *et al.*, 2009).

S'ha observat que la fragmentació del DNA a l'espermatozoide es podria donar durant l'espermatogènesi, per alteracions que provoquen una maduració incompleta o una inducció de l'apoptosi. No obstant, també podria donar-se després de l'espermatogènesi, en els espermatozoides ja madurs, a causa d'un excés de radicals lliures que originin estrès oxidatiu (Smith *et al.*, 2006). De qualsevol manera, s'ha proposat que la fragmentació del DNA podria ser utilitzada com a un bon marcador predictiu de la qualitat espermàtica, sobretot en relació a les tècniques de reproducció assistida (Aoki *et al.*, 2005b). De fet, s'han observat nivells elevats de DNA fragmentat en espermatozoides de pacients infèrtils utilitzant diferents tècniques, les quals es poden dividir en dos grups: les directes i les indirectes.

- I. Tècniques de detecció directes: s'anomenen així perquè avaluen la fragmentació per observació directa del DNA mitjançant fluorescència. Principalment podem parlar de dues tècniques: el TUNEL o *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate(dUTP)-Nick End-Labeling* i el Comet o *Single cell gel electrophoresis*. En el cas concret de l'assaig del Comet, espermatozoides descondensats s'exposen a una electroforesi en gel d'agarosa, durant la qual es crea un camp elèctric que provoca la migració de fragments de DNA. D'aquesta manera es dona lloc a la visualització microscòpica d'una cua semblant a un cometa que és més o menys llarga depenent del nivell de fragmentació que té la cèl·lula (Ostling and Johanson, 1984) (Figura 1.9). Existeixen dues variants d'aquest assaig, el Comet neutre, el qual detecta només talls de cadena doble, i el Comet alcalí, que detecta tant talls de cadena doble com de cadena simple. Es tracta d'una tècnica molt sensible amb un rang de dany al DNA que pot anar del 0 al 100%. A més a més, s'ha observat que presenta una capacitat predictiva molt forta del resultat de l'embaràs amb un solapament molt petit entre homes fèrtils i infèrtils (Simon *et al.*, 2010, 2011b; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b) i, en el cas del Comet alcalí, també una bona predicció d'infertilitat masculina (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a, 2013). Per altra banda, a diferència d'altres tècniques, el procediment del Comet inclou una extracció prèvia d'histones i protamines utilitzant altes concentracions de sals i agents reductors. Aquest pas previ fa que es puguin arribar a detectar un major nombre de trencaments al DNA que amb altres tècniques, però, no obstant, no permetrà distingir la localització cromosòmica d'aquests (Shaman and Ward, 2006; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a, 2013).

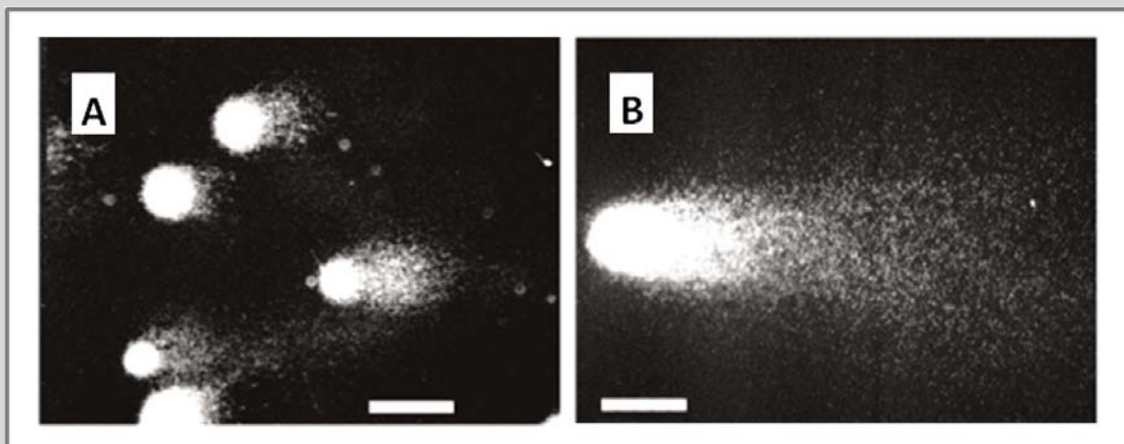


Figura 1.9. Visualització microscòpica del resultat de la tècnica del Comet. A: visualització d'espermatozoides amb diferents llargades de cua de fragments de DNA en el mateix individu. B: cèl·lula espermàtica amb un elevat percentatge de dany al DNA, el que dona lloc a una cua molt llarga. Modificada de (Duty *et al.*, 2003).

- II. Tècniques de detecció indirectes: mesuren la susceptibilitat del nucli a ser danyat a través de la determinació de la facilitat amb que aquest és descondensat. Les dues tècniques principals d'aquest grup són: l'SCSA o *Sperm Chromatin Structure Assay* i el SCD o *Sperm Chromatin Dispersion*.

Diferents estudis han demostrat una correlació entre una protaminació alterada (ja sigui calculada per relació P1/P2 alterada, la concentració de protamines o per anàlisi indirecte utilitzant la tinció amb cromomicina A3; CMA3) amb un increment en el dany del DNA en espermatozoides humans. Aquest fet reforça la hipòtesi de la protecció del material genètic com a funció de les protamines i fa que la fragmentació del DNA sigui una mesura d'utilitat en pacients amb infertilitat idiopàtica (Nasr-Esfahani *et al.*, 2004a, 2004b, 2005; Ramos *et al.*, 2004; Torregrosa *et al.*, 2006; Zubkova and Robaire, 2006; Angelopoulou *et al.*, 2007; Domínguez-Fandos *et al.*, 2007; Plastira *et al.*, 2007; Tarozzi *et al.*, 2009; Tavalae *et al.*, 2009; Nili *et al.*, 2009; García-Peiró *et al.*, 2011; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a). Tot i això existeix una falta d'estudis correlacionant el dany al DNA espermàtic amb els dos tipus de protamines, P1 i P2, individualment.

1.3.3. Tècniques de reproducció assistida

Cada vegada són més les parelles que assisteixen a les clíniques de reproducció assistida a causa d'un problema de subfertilitat. En aquests casos, després d'estudiar la possible causa del problema, analitzant tant el factor masculí com femení, es solen cursar tècniques de reproducció assistida (RA). La RA es pot dur a terme utilitzant diferents mètodes depenent de les circumstàncies i el problema concret de cada parella. En aquesta secció es vol introduir breument les tres tècniques més comunes: la inseminació artificial, la fecundació *in vitro* i la injecció intracitoplasmàtica (Pomerol and Arrondo, 1994; Ballejà and Oliva, 2012).

- *Inseminació artificial*: es tracta de la tècnica de RA més antiga (la primera vegada que es va dur a terme va ser a finals del segle XVII) i la més similar a la fecundació natural, ja que consisteix en la col·locació d'una mostra de semen (prèviament preparada al laboratori mitjançant selecció i capacitació) a l'interior de l'úter de la dona. D'aquesta manera l'espermatozoide ha d'arribar a l'òvul i fecundar-lo, tal i com passaria en un embaràs tradicional però havent facilitat el procés amb un recorregut més curt i amb menys dificultats. Per dur-la a terme és important aconseguir el major nombre d'espermatozoides mòbils possible, per tant, estaria indicada en parelles amb subfertilitat d'origen desconegut, parelles en les que hi ha un factor femení per problemes d'ovulació o alteracions a nivell del coll uterí o en parelles en les que hi ha un factor masculí per defectes lleus o moderats respecte a la concentració o a la mobilitat espermàtica.

- *Fecundació in vitro (FIV)*: consisteix en una fecundació fora de l'organisme femení després d'haver dut a terme una extracció dels òvuls i la obtenció i preparació de la mostra de semen. En aquest cas l'objectiu és aconseguir un nombre fix d'espermatozoides de la millor qualitat possible, generalment uns 100.000 espermatozoides/ml. Una quantitat menor podria disminuir la possibilitat de fertilització de l'òocit, ja que hi haurà una menor probabilitat de que els espermatozoides el trobin i el fertilitzin. Per altra banda, una quantitat major podria augmentar la possibilitat de polipenetració espermàtica, el que faria que el zigot no fos viable. Una vegada extrets i madurats els oòcits, aquests es posen en contacte amb els espermatozoides per donar lloc a la fertilització i a la formació d'embrions. Tot i l'existència de criteris per tal d'evaluar la qualitat dels embrions obtinguts, és impossible predir amb seguretat quin acabarà implantant-se i quin no. És per aquest motiu que s'acostuma a transferir més d'un embrió a la vegada, amb un màxim de 3 segons el que indica l'actual legislació espanyola. Aquesta tècnica es troba indicada en aquelles parelles en les que procediments més senzills com la inseminació artificial no han funcionat, quan el factor femení ve donat per una absència o lesió a les trompes, endometriosis avançada o nombre limitat d'òvuls, o quan hi ha un factor masculí sever amb una qualitat espermàtica molt disminuïda.
- *Injecció intracitoplasmàtica (ICSI)*: forma part de les tècniques anomenades innovadores. De la mateixa manera que la FIV, quan es realitza una ICSI la fecundació es duu a terme fora de l'organisme femení, però en aquest cas per microinjecció directa del cap d'un espermatozoide capacitat en el citoplasma d'un òvul que es troba en metafase II i desproveït de les cèl·lules del cúmulus. Per tant, ja que només és necessari un espermatozoide per cada òvul que es vol fecundar, aquesta tècnica es troba indicada quan el factor masculí és sever, amb alteracions seminals que no fan possible la FIV (baix nombre d'espermatozoides o problemes de mobilitat o de morfologia). A més a més, resulta una alternativa per aquells homes que s'han realitzat una vasectomia o que presenten dificultats en l'ejaculació, ja que es pot realitzar amb espermatozoides obtinguts a partir de biòpsies testiculars. És considerada la tècnica de reproducció més artificial.

1.4. Proteòmica de l'espermatozoide¹

S'entén per proteòmica l'anàlisi sistemàtic de totes les proteïnes d'una cèl·lula, d'un teixit o d'un organisme, que es troben en un determinat moment i sota unes condicions particulars (Aebersold and Mann, 2003; Domon and Aebersold, 2006; Cox and Mann, 2007). D'aquesta manera, la disposició d'un catàleg que descriu el perfil proteic de la cèl·lula espermàtica és un primer pas molt important per tal d'entendre diversos aspectes de la fisiologia del gàmeta masculí i de la fertilització i el desenvolupament, per tal de poder caracteritzar funcions cel·lulars de l'espermatozoide i identificar noves causes d'infertilitat o subfertilitat.

L'espermatozoide és una cèl·lula molt apropiada per dur a terme estudis proteòmics, degut a la seva accessibilitat i a la facilitat que mostra per ser purificada i analitzada (Oliva *et al.*, 2008, 2009). A més a més, la cèl·lula espermàtica madura és transcripcional i traduccionalment inerta (Veure Secció 1.2.1. de la Introducció), dues característiques que simplifiquen encara més els estudis proteòmics, en comparació amb els que es duen a terme en cèl·lules somàtiques (Amaral *et al.*, 2014). Per altra banda, l'espermatozoide cursa diferents processos, els quals, tot i que no involucren síntesi de proteïnes, requereixen de diferents PTMs. La capacitació n'és un exemple ja que necessita de la fosforilació de diverses proteïnes, particularment en residus de tirosina, fet que produeix un canvi en el proteoma.

Tot i això, en el camp de la proteòmica en l'espermatozoide s'ha de tenir molt present que la identificació d'una proteïna pot no significar que aquesta estigui duent a terme una funció específica, si no que, pel contrari, podria representar restes provinents del procés previ d'espermatogènesi que no s'han eliminat amb els cossos residuals i que, per tant, no presenten cap paper rellevant en la cèl·lula madura. A més a més, a l'hora de dur a terme un estudi proteòmic en l'espermatozoide s'ha de tenir en compte una altra característica especial d'aquest tipus cel·lular que és la gran heterogeneïtat de les mostres de semen. S'ha de ser conscient sempre d'aquest fet, tot i que s'utilitzin tècniques inicials per tal d'incrementar l'homogeneïtat de la qualitat espermàtica, ja que les mostres presentaran una variabilitat tant interindividual com intraindividual (Amaral *et al.*, 2014).

Durant les últimes dècades s'han dut a terme molts estudis proteòmics amb l'objectiu de caracteritzar proteïnes presents a les cèl·lules espermàtiques, tant immadures com madures. Tot i això, la major contribució en el coneixement del contingut proteic de l'espermatozoide s'ha aconseguit amb l'aplicació de tècniques basades en l'espectrometria de masses, les quals es descriuen en la secció següent i es troben resumides a la Figura 1.10.

¹ La informació inclosa en aquesta secció de la Introducció es basa principalment en les revisions **Oliva and Castillo, 2011b**; i **Amaral, Castillo, Ramalho-Santos and Oliva, 2014**.

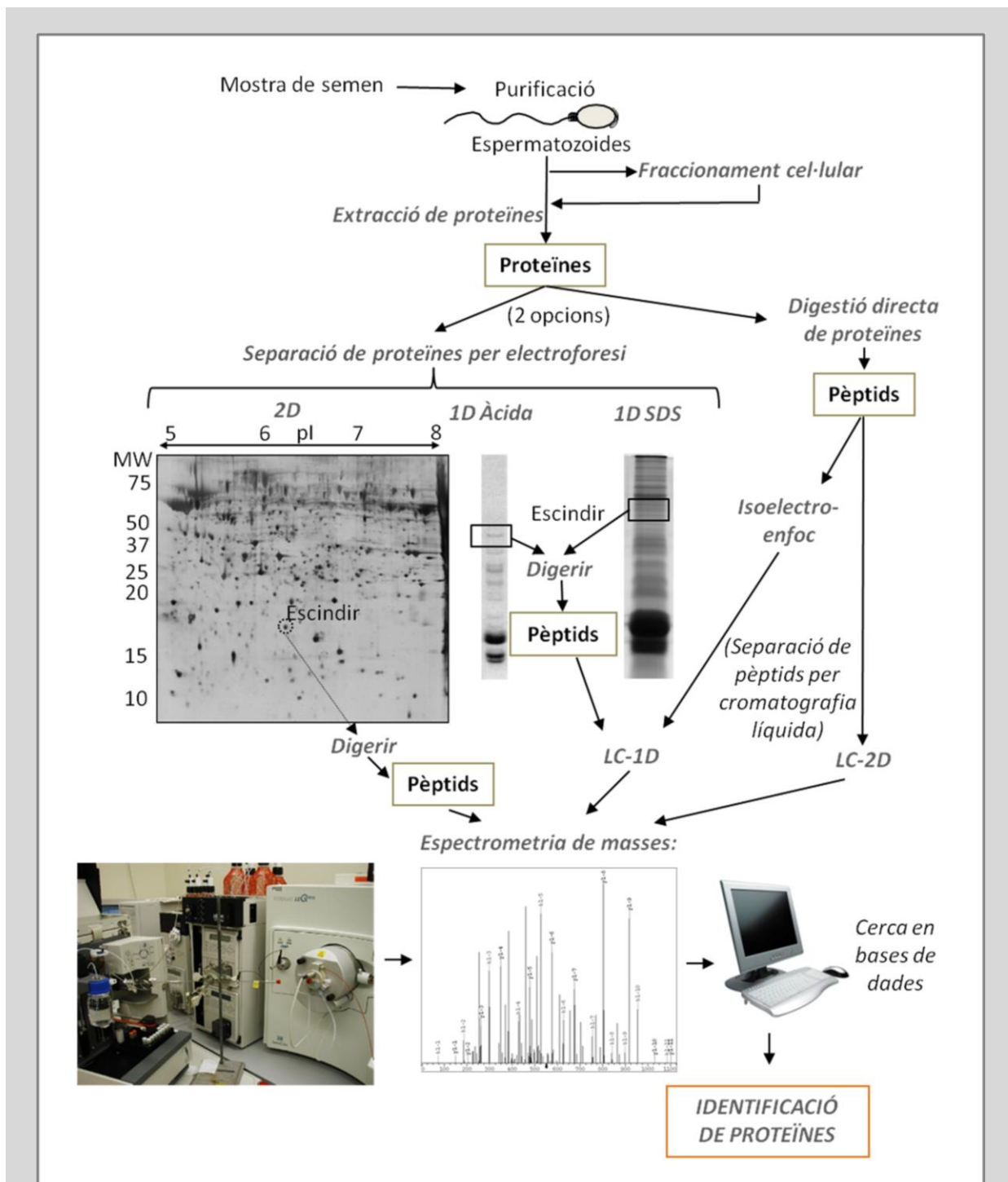


Figura 1.10. Tècniques proteòmiques basades en espectrometria de masses aplicades en l'estudi de l'espermatozoide humà madur. Esquema de les diferents estratègies que es poden seguir per analitzar el contingut proteic de l'espermatozoide, partint de la cèl·lula completa o de subfraccions de la mateixa. Modificada de (Amaral *et al.*, 2014).

1.4.1. Tècniques proteòmiques basades en espectrometria de masses

Degut a la disponibilitat de bases de dades amb seqüències genòmiques i als mètodes d'ionització de proteïnes, l'espectrometria de masses (MS) s'ha convertit en el mètode d'elecció per dur a terme anàlisis de mostres proteiques complexes (Aebersold and Mann, 2003). No obstant, en el cas de l'espermatozoide, i per tal d'establir un disseny adequat de l'estudi, abans de dur a terme qualsevol procediment basat en MS s'han de tenir en compte dos conceptes importants (Figura 1.10): la puresa de la mostra i el material cel·lular de partida.

- *La puresa de la mostra:* tot i que no sempre es té en compte, la puresa de la preparació d'espermatozoides és un dels passos més crítics en aquestes tècniques, ja que qualsevol mínima contaminació pot resultar en la identificació de proteïnes que erròniament serien catalogades com espermàtiques. Un exemple de contaminació seria la presència de cèl·lules rodones en la mostra, les quals tenen molt més citoplasma que l'espermatozoide i seria molt fàcil la obtenció de falsos positius en l'anàlisi. Per tant, resulta necessari efectuar un pas de purificació previ, el qual dependrà de l'objectiu de l'estudi. Són possibilitats l'ús de gradients de densitat i/o l'eliminació específica de leucòcits amb anticossos (Veure Secció 3.2. de Materials i Mètodes).
- *Material cel·lular de partida:* degut a la específica compartimentació de la cèl·lula germinal masculina i per tal de donar resposta a l'objectiu de l'estudi, és important decidir si l'anàlisi es realitzarà a partir d'extractes proteics obtinguts a partir de la totalitat de l'espermatozoide o, en cas contrari, si serà necessari dur a terme un fraccionament cel·lular per tal d'explorar el contingut de proteïnes de compartiments concrets. La realització de proteòmica subcel·lular presenta l'avantatge de reduir la complexitat de la mostra i, per tant, de permetre la identificació de proteïnes poc abundants que poden no ser detectades quan es treballa amb l'espermatozoide sencer (Amaral *et al.*, 2013, 2014) (Veure Secció 1.4.2. de la Introducció).

Una vegada es disposa d'espermatozoides purificats i s'ha dut a terme o no el fraccionament cel·lular, generalment es procedeix amb la lisi de les cèl·lules i la solubilització de les proteïnes i, seguidament, a la disminució de la complexitat de l'extracte proteic abans de que sigui analitzat amb l'aparell de MS. Els estudis proteòmics realitzats en espermatozoides, tan humans com d'altres espècies animals, s'han basat essencialment en tres enfocaments diferents (Oliva *et al.*, 2009; de Mateo *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014), els quals es descriuen a continuació (Figura 1.10):

- *Electroforesi bidimensional i MS:* en primer lloc es duu a terme una separació inicial de proteïnes amb electroforesi bidimensional (2D), les quals es componen per una primera dimensió on les proteïnes es separen per punt isoelèctric i una segona on les proteïnes es separen per pes molecular. D'aquesta manera s'acaben obtenint una sèrie de punts o *spots*, cadascun dels quals es troba format per un grup petit de proteïnes amb les mateixes característiques fisicoquímiques. Seguidament es talla cadascun dels *spots* per tal de digerir-los individualment i així obtenir els pèptids corresponents (és el que es coneix com *in-gel digestion*), els quals poden ser analitzats amb un aparell de MS directament (Figura 1.10). L'ús d'electroforesi 2D ha sigut àmpliament utilitzada en diversos estudis amb espermatozoides resultant en la identificació aproximadament d'un centenar de proteïnes cadascun (Pixton *et al.*, 2004; Martinez-Heredia *et al.*, 2006, 2008; de Mateo *et al.*, 2007).
- *Electroforesi monodimensional i cromatografia líquida acoblada a MS:* en aquest cas, la separació inicial de proteïnes es duu a terme segons el seu pes molecular amb electroforesi monodimensional (1D). Les bandes obtingudes es retallen i es sotmeten a *in-gel digestion*. Estudis proteòmics realitzats amb espermatozoides que han utilitzat aquest mètode inclouen una separació de pèptids per cromatografia líquida (LC) abans de la identificació amb espectrometria de masses, la qual és farà en tàndem (MS/MS) (Figura 1.10) (Johnston *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2007, 2013; Kim *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2013). L'acoblament de la LC amb el MS/MS ha fet possible separar ràpidament els extractes complexes de proteïnes i identificar els seus components, donant lloc a un augment del límit de detecció de la tècnica amb caracteritzacions de 400-1.000 proteïnes per estudi. No obstant, a diferència de la tècnica anterior, fent servir aquest mètode es perd la informació relacionada amb la presència de PTM en diferents regions de la mateixa proteïna.
- *Digestió directa de pèptids i cromatografia líquida acoblada a MS:* en aquest cas, les proteïnes es digereixen directament sense fer una separació prèvia amb electroforesi, és el que s'anomena *in-solution digestion*. Alguns estudis han dut a terme un pre-fraccionament dels pèptids mitjançant isoelectroenfoc abans de dur a terme l'anàlisi i identificació amb LC-MS/MS. Aquest mètode ha donat lloc a la identificació d'unes 800 proteïnes (Baker *et al.*, 2008). Una altra opció que s'ha aplicat recentment en un estudi amb espermatozoide humà consisteix en una doble separació dels pèptids amb LC abans de la identificació amb MS/MS, és el que es coneix com 2D-LC-MS/MS (Figura 1.10). Aquesta variació del mètode va suposar un augment de la sensibilitat de la tècnica que va ampliar molt el límit de detecció, donant lloc a un catàleg de més de 4.000 proteïnes espermàtiques diferents (Wang *et al.*, 2013).

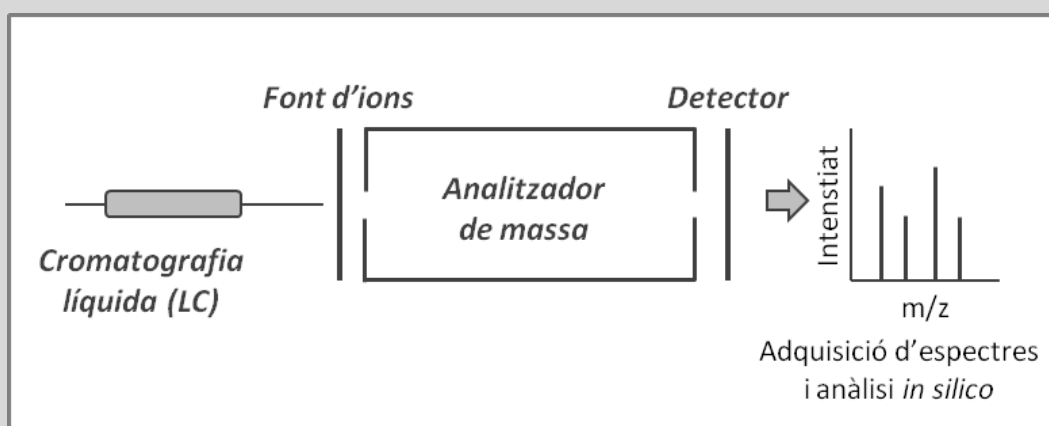


Figura 1.11. Espectròmetre de masses. Representació esquemàtica de les parts que formen un espectròmetre de masses. Els pèptids poden ser separats prèviament per cromatografia líquida. Finalment s'obté la relació massa/càrrega (m/z) per cada pèptid.

La tècnica de MS es basa en la detecció de molècules ionitzades d'acord a la seva relació massa-càrrega (m/z) i l'aparell amb la que es realitza consta de tres parts fonamentals: la font d'ions, l'analitzador de massa i el detector (Figura 1.11). La font d'ions modifica l'analit per obtenir-lo en l'estat òptim per ser analitzat, és a dir en forma gasosa i ionitzat. Hi ha diferents tipus de fonts d'ionització, les més usades són la MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) i la ESI (*Electrospray Ionisation*). La font MALDI presenta una resolució molt bona i normalment s'associa a un analitzador TOF (*Time Of Fly*), el qual identificarà els pèptids segons el temps que triguen en volar i arribar al detector per un tub buit. Tot i que aquesta combinació és precisa es considera poc exacta i es troba una mica desfasada. Actualment els estudis proteòmics es solen basar en una combinació d'una font ESI (que genera un esprai per evaporar i carregar l'analit) amb un detector en forma de trampa iònica, ja que augmenta molt la resolució de la tècnica. En aquest cas la font ESI rep la mostra en forma líquida ja que normalment prové d'una LC, i generalment es troba seguida per dos analitzadors separats que donaran lloc al MS/MS. L'últim component és el detector, el qual registrarà la càrrega produïda per l'ió i ho relacionarà amb la seva massa (m/z) per generar els espectres (Figures 1.10 i 1.11). Finalment, la identificació positiva de les proteïnes es produirà mitjançant una cerca en bases de dades (Figura 1.10). Els criteris establerts en els anàlisis *in silico* que es duren a terme a partir dels espectres obtinguts són crítics per una bona identificació de les proteïnes i per evitar el major nombre de falsos positius possible. Generalment, uns criteris acceptables serien els següents: identificació d'un mínim de dos pèptids per proteïna, dels quals un hauria de ser pèptid únic per la proteïna concreta, amb un *false discovery rate* (FDR) menor al 5% o a l'1%.

1.4.2. Estudis proteòmics de l'espermatozoide humà madur

Les primeres publicacions que contenen les paraules “proteoma de l'espermatozoide humà” al seu títol daten de finals de segle XX, però es van dur a terme amb l'objectiu d'identificar un petit nombre de proteïnes específiques de superfície reconegudes per anticossos anti-espermatozoides en el sèrum de pacients infèrtils (Shetty *et al.*, 1999, 2001). No va ser fins a l'any 2005 quan es va realitzar el primer *in-depth proteomic analysis*, tot i que no es va fer públic el llistat de proteïnes identificades (Johnston *et al.*, 2005). Des de llavors s'han realitzat nombrosos estudis utilitzant tècniques diferents en pacients infèrtils i controls i tant amb la totalitat de l'espermatozoide com amb subfraccions del mateix. Les troballes més rellevants d'aquests estudis es descriuen a continuació:

I. Proteòmica de l'espermatozoide madur sencer:

S'han realitzat diversos estudis de proteòmica a partir d'espermatozoides normozoospèrmics sencers que han fet públic els catàlegs de proteïnes obtinguts. Alguns d'ells van aplicar una electroforesi 2D i una identificació amb MALDI-TOF, resultant en catàlegs d'unes cent proteïnes que van mostrar resultats inesperats, com la caracterització de diferents proteïnes involucrades en la transcripció i la traducció (Martinez-Heredia *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Altres estudis van fer ús de la tècnica més sensible consistent en una identificació amb LC-MS/MS. Un d'ells va identificar 1.053 proteïnes, les quals es podien diferenciar segons la seva solubilitat en presència del detergent Tritó X-100. Aquesta estratègia va permetre caracteritzar una gran proporció d'enzims involucrats en diverses vies metabòliques (Baker *et al.*, 2007). Tot i això, recentment s'ha realitzat l'estudi que ha proporcionat el catàleg més extens de proteïnes espermàtiques a partir de l'espermatozoide sencer, amb una identificació de 4.675 proteïnes diferents. En aquest projecte també es va comparar el llistat de proteïnes amb el transcriptoma de l'espermatozoide i es va observar una petita superposició, confirmant la importància de dur a terme estudis en l'espermatozoide a nivell proteic (Wang *et al.*, 2013).

II. Proteòmica de subfraccions de l'espermatozoide madur:

Com ja s'ha explicat anteriorment, l'espermatozoide és un tipus cel·lular molt apropiat per dur a terme subfraccionament. A més a més, aquesta estratègia permet no solament suggerir possibles localitzacions cel·lulars per les proteïnes identificades si no que incrementa la possibilitat d'identificar proteïnes minoritàries que han pogut estar emmascarades quan es treballa amb l'espermatozoide sencer. S'han realitzat estudis enfocats en les proteïnes presents en la cua de l'espermatozoide suggerint la possible activitat de diferents vies metabòliques i

observant, per primer cop, la presència de proteïnes del peroxisoma, fet sorprenent ja que es pensava que l'espermatozoide es trobava desproveït d'ells (Amaral *et al.*, 2013). També s'han enfocat estudis a descriure específicament proteïnes de membrana, algunes de les quals es va veure que podrien estar involucrades en la interacció espermatozoide-oòcit, i altres van permetre incrementar el coneixement de processos com la capacitació i la fertilització (Naaby-Hansen and Herr, 2010; Naaby-Hansen *et al.*, 2010; Nixon *et al.*, 2011). Per últim, destacar la publicació d'un estudi recent en el qual es va realitzar la descripció i comparació del proteoma de caps i de cues aïllades per separat a partir de les mateixes mostres de semen, obtenint un total de 703 i 900 proteïnes respectivament. Aquests resultats van corroborar el fet de que moltes de les proteïnes espermàtiques presenten una expressió compartimentada (Baker *et al.*, 2013)².

III. Alteracions del contingut proteic dels espermatozoides de pacients infèrtils:

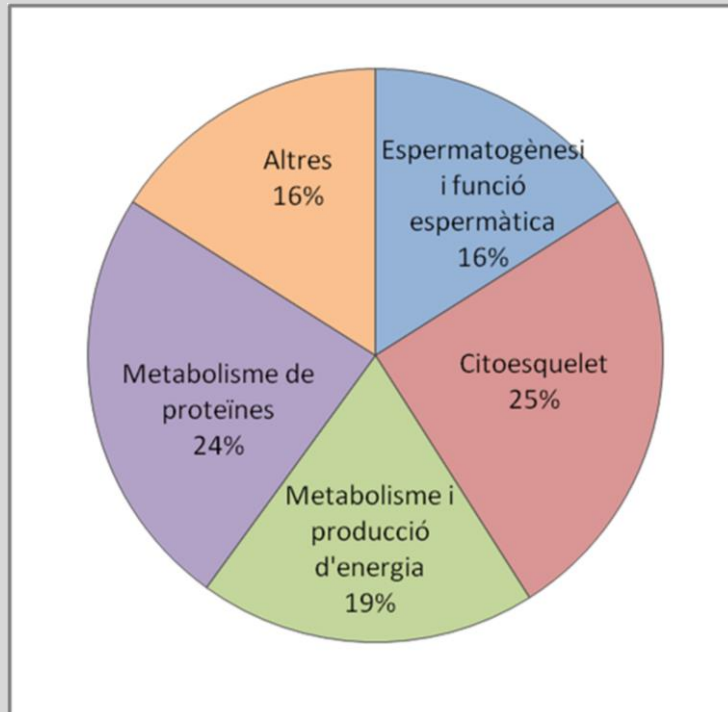
A part de l'anàlisi d'alteracions dels nivells de protaminació, ja comentat anteriorment (Veure Secció 1.2.2. de la Introducció), la identificació d'anomalies en la resta de proteïnes en pacients infèrtils s'ha dut a terme mitjançant la comparació del proteoma de mostres de semen de pacients amb alteracions amb mostres controls normozoospermiques de donants fèrtils. Aquestes comparacions han permès suggerir la presència de proteïnes que podrien actuar com biomarcadors de la fertilitat o infertilitat. El fenotip espermàtic alterat més estudiat amb aquest tipus d'estudis comparatius ha sigut l'astenozoospermia (Zhao *et al.*, 2007; Martinez-Heredia *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Siva *et al.*, 2010; Parte *et al.*, 2012), possiblement degut tant a la importància biològica de les troballes obtingudes com també a la facilitat d'obtenció de mostra en comparació amb altres fenotips com la oligozoospermia. S'han realitzat tant estudis proteòmics que combinaven la electroforesi 2D amb MS, com estudis focalitzats en l'estat de fosforilació de les proteïnes. Si s'ajunten els resultats obtinguts en els diferents estudis citats, podem observar la identificació d'un total de 109 proteïnes diferents alterades en espermatozoides astenozoospermics (Figura 1.12). D'aquestes, una gran majoria es troben relacionades amb el citoesquelet o són enzims involucrats en metabolisme i producció d'energia, el que possiblement podria portar a l'alteració del moviment del flagel. Per altra banda, també s'han realitzat estudis proteòmics comparatius per tal d'esbrinar possibles causes per les quals pacients normozoospermics sense alteracions aparents no donen lloc a embarassos a través de tècniques de reproducció assistida com la FIV. Duent a terme aquest anàlisi mitjançant marcatge

² L'estudi (Baker *et al.*, 2013) es va publicar després de la realització i publicació de l'article de **Mateo, Castillo, Estanyol, Ballescà, Oliva, 2011**; que respon a l'objectiu 2.1 d'aquesta tesi doctoral (Annex 8.2).

diferencial dels extractes proteics s'han observat alteracions en proteïnes relacionades amb l'estructura de la cromatina i per tant la possible implicació d'alteracions epigenètiques en aquests pacients (Azpiazu *et al.*, 2014).

Figura 1.12. Implicació funcional de proteïnes alterades en pacients astenozoospermics.

En aquest gràfic es troben incloses les 109 proteïnes identificades en diferents estudis proteòmics basats en espectrometria de masses que s'han dut a terme en mostres d'espermatozoides humans amb mobilitat afectada. Modificada de (Amaral *et al.*, 2014).



A part dels estudis comentats en aquesta secció, també s'ha de destacar la realització de diversos estudis enfocats a identificar aquelles proteïnes que participen en diferents processos espermàtics com per exemple la capacitació (Ficarro *et al.*, 2003; Secciani *et al.*, 2009) o la interacció amb l'oòcit (Redgrove *et al.*, 2011; Petit *et al.*, 2013). És el que es coneix com proteòmica funcional.

1.4.3. Avenços cap al proteoma de l'espermatozoide humà complet i identificació de les vies cel·lulars representades

Fins l'any 2013 es van arribar a publicar un total de 6198 proteïnes espermàtiques diferents a partir d'estudis proteòmics basats en MS i realitzats amb espermatozoides humans madurs³. L'estudi específic de totes aquestes proteïnes en conjunt mitjançant eines bioinformàtiques i anàlisis estadístics va permetre identificar les vies biològiques que podrien estar representades en l'espermatozoide humà (Amaral *et al.*, 2014). D'aquesta

³ El catàleg que compila totes aquestes proteïnes ha sigut publicat pel nostre grup i es troba a **Amaral, Castillo, Ramalho-Santos and Oliva, 2014.**

manera, es va observar principalment la presència de grups de proteïnes destacats que participaven en processos de metabolisme, metabolisme de proteïnes, trànsit de membrana, metabolisme d'RNA, apoptosi, hemostàsia i cicle cel·lular i meiosi (Figura 1.13). Cadascuna d'aquestes vies, així com les proteïnes implicades i la possibilitat de que estiguin o no totalment actives a l'espermatozoide, es detallen breument a continuació (per obtenir informació més extensa es recomana la revisió (Amaral *et al.*, 2014):

I. Metabolisme:

El fet que la de metabolisme energètic sigui la via cel·lular més significativa entre les identificades en l'espermatozoide humà pot no ser un fet sorprenent degut a la seva associació amb la producció d'energia, la síntesi de molècules essencials i l'eliminació de molècules tòxiques. Dintre del terme metabolisme es consideren proteïnes involucrades en el metabolisme de carbohidrats i lípids, en el cicle de l'àcid tricarboxílic, en la fosforilació oxidativa mitocondrial i en el metabolisme de nucleòtids.

II. Metabolisme de proteïnes:

Sembla ser que el proteoma de l'espermatozoide humà està especialment enriquit en proteïnes involucrades en la traducció, empaquetament, modificació i degradació de proteïnes. És especialment interessant observar que l'espermatozoide humà presenta la maquinària bàsica per sintetitzar proteïnes, incloent diversos factors eucariòtics d'iniciació de la traducció, factors d'elongació i factors d'alliberament de cadenes peptídiques involucrades en la finalització d'aquest procés. L'activitat d'aquestes proteïnes a l'espermatozoide és un tema molt debatut a la literatura. Generalment, s'ha establert la idea de que l'espermatozoide madur és una cèl·lula traduccionament inerta i que per tant no experimenta cap procés de síntesi proteica a partir de gens codificats al nucli, tot i que si que podria traduir gens mitocondrials (Baker, 2011). No obstant, s'han identificat nombroses proteïnes ribosomals, tant mitocondrials com citoplasmàtiques, tot i que no s'han dut a terme estudis per determinar la seva integritat o funcionalitat. Aquests estudis ajudarien a saber si aquestes proteïnes presentarien alguna funció o, en cas contrari, si es trobarien a l'espermatozoide com resultat de processos d'alta activitat traducciona que es van donar prèviament durant l'espermatogènesi. Per altra banda, la presència de components proteics que participen en la modificació i degradació de proteïnes són necessaris per processos essencials de la cèl·lula espermàtica com és el cas de la capacitació o la reacció acrosòmica, respectivament.

III. Trànsit de membrana:

Aquesta via consisteix en l'alliberament de diferents molècules cap a diferents localitzacions cel·lulars mitjançant vesícules, el que resulta imprescindible per

diferents processos cel·lulars. Diversos components del trànsit de membrana han sigut identificats com a part del contingut proteic de l'espermatozoide humà madur, el que pot portar a la idea de que el gàmeta masculí és una cèl·lula molt més dinàmica del que es solia pensar. Tot i això, i d'igual manera que amb les vies anteriors, és possible que aquestes proteïnes només suposin una representació d'esdeveniments que han succeït durant l'espermatogènesi. De fet, el paper del trànsit de membrana durant la formació de la cèl·lula germinal masculina es troba molt ben estudiat, especialment pel que fa a la formació de l'acrosoma (Ramalho-Santos *et al.*, 2001, 2002). Per altra banda, algunes de les proteïnes identificades estan involucrades en la mediació de la fusió de la membrana i, per tant, també es podrien trobar relacionades amb funcions que es donarien una vegada l'espermatozoide està format, com la mateixa reacció acrosòmica. A més a més, en aquest grup també s'inclouen proteïnes que participen en l'important esdeveniment de fusió amb l'oòcit, n'és un exemple la proteïna IZUMO (Sutovsky, 2009).

IV. Metabolisme d'RNA:

L'espermatozoide humà madur presenta un grup de proteïnes involucrades en la degradació d'RNA missatger i en l'empaquetament i processament de petites ribonucleoproteïnes. Tot i semblar sorprenent, ja que en un principi es posava en dubte la presència d'RNA a la cèl·lula espermàtica madura, actualment ja s'han identificat diversos RNAs missatgers, *non-coding RNAs* i RNAs mitocondrials espermàtics (Jodar *et al.*, 2013). El significat funcional d'aquests transcrits a l'espermatozoide madur encara no està ben establert, sobretot tenint en compte que estem parlant d'una cèl·lula transcripcionalment inerta. Per una banda, els RNAs són sintetitzats al principi de l'espermatogènesi ja que es requereixen durant la fase haploide del procés i, per tant, podrien ser simples residus en la cèl·lula ja madura. Per altra banda, s'ha suggerit que alguns dels transcrits podrien participar en l'empaquetament del genoma patern, en la embriogènesi primerenca o en la transmissió d'informació epigenètica a la descendència (Veure Secció 1.5.2. de la Introducció).

V. Apoptosi:

Un altre grup de proteïnes representatiu en l'espermatozoide humà madur és aquell amb components relacionats amb el procés de mort cel·lular programada. De fet, diversos estudis han identificat, mitjançant tècniques diferents a la MS, diversos factors apoptòtics a l'espermatozoide i han establert la seva associació amb la qualitat espermàtica (Varum *et al.*, 2007; Zalata *et al.*, 2011). En aquest cas, l'apoptosi si que seria una via activa en l'espermatozoide madur, la qual es donaria principalment amb dos objectius: com a mecanisme de selecció cel·lular per prevenir que espermatozoides amb dany al DNA participin en la fertilització, per una banda, i per eliminar els espermatozoides del tracte reproductor femení, per l'altra.

VI. Hemostàsia:

La representació significativa d'aquesta via cel·lular en l'espermatozoide podria resultar d'alguna forma sorprenent en un primer moment. No obstant, el fet és que les cèl·lules espermàtiques duen a terme processos que requereixen múltiples passos consecutius, els quals es troben controlats per un conjunt de interaccions específiques receptor-ligand. Aquestes interaccions són requerides per les adhesions entre cèl·lules o entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular, i moltes de les proteïnes involucrades són idèntiques a les necessàries en els processos de reconeixement i adhesió que tenen lloc a l'hemostàsia, al reclutament de leucòcits i a l'adhesió i agregació de plaquetes (Zhou *et al.*, 2004; Preissner and Bronson, 2007). També s'han observat similituds entre el procés de coagulació i fibrinolisi de la sang i el de coagulació i liqüefacció del semen (Fernández *et al.*, 1997).

VII. Cicle cel·lular i Meiosi:

Les proteïnes involucrades en el cicle cel·lular i la meiosi podrien considerar-se part del contingut residual que queda a l'espermatozoide després de l'espermatogènesi. Tot i això, en aquesta via també es troben representades les histones i variants d'histones, les quals, tot i que són importants durant tot el procés de formació del gàmeta masculí (Veure Secció 1.2.2. de la Introducció), també s'ha observat que desenvolupen un paper molt important després de la fertilització, constituint una marca epigenètica important durant el desenvolupament embrionari (Veure secció 1.5.3 i 1.5.4. de la Introducció).

La identificació d'aquestes vies cel·lulars en l'espermatozoide, a partir de l'anàlisi bioinformàtic de totes les proteïnes identificades en el gàmeta masculí, demostra la gran importància i utilitat que es deriva dels estudis proteòmics. Tot i això, a partir d'aquest anàlisi s'ha estimat que les 6.198 proteïnes espermàtiques identificades només constituïrien aproximadament el 78% de la totalitat del proteoma de l'espermatozoide, el qual estaria format per unes 7200 proteïnes (Amaral *et al.*, 2014). De tota manera, les tècniques basades en MS es troben en constant desenvolupament, aquest fet juntament amb l'aplicació de tècniques de subfraccionament, que augmenten la possibilitat de caracteritzar proteïnes menys abundants, faran que en els pròxims anys el proteoma de l'espermatozoide humà madur s'acabi segurament completant. A més a més, un següent pas interessant en el camp de la proteòmica en l'espermatozoide seria determinar els papers d'aquestes proteïnes, si en tenen algun, i investigar si algunes d'elles es troben implicades en el desenvolupament embrionari primerenc.

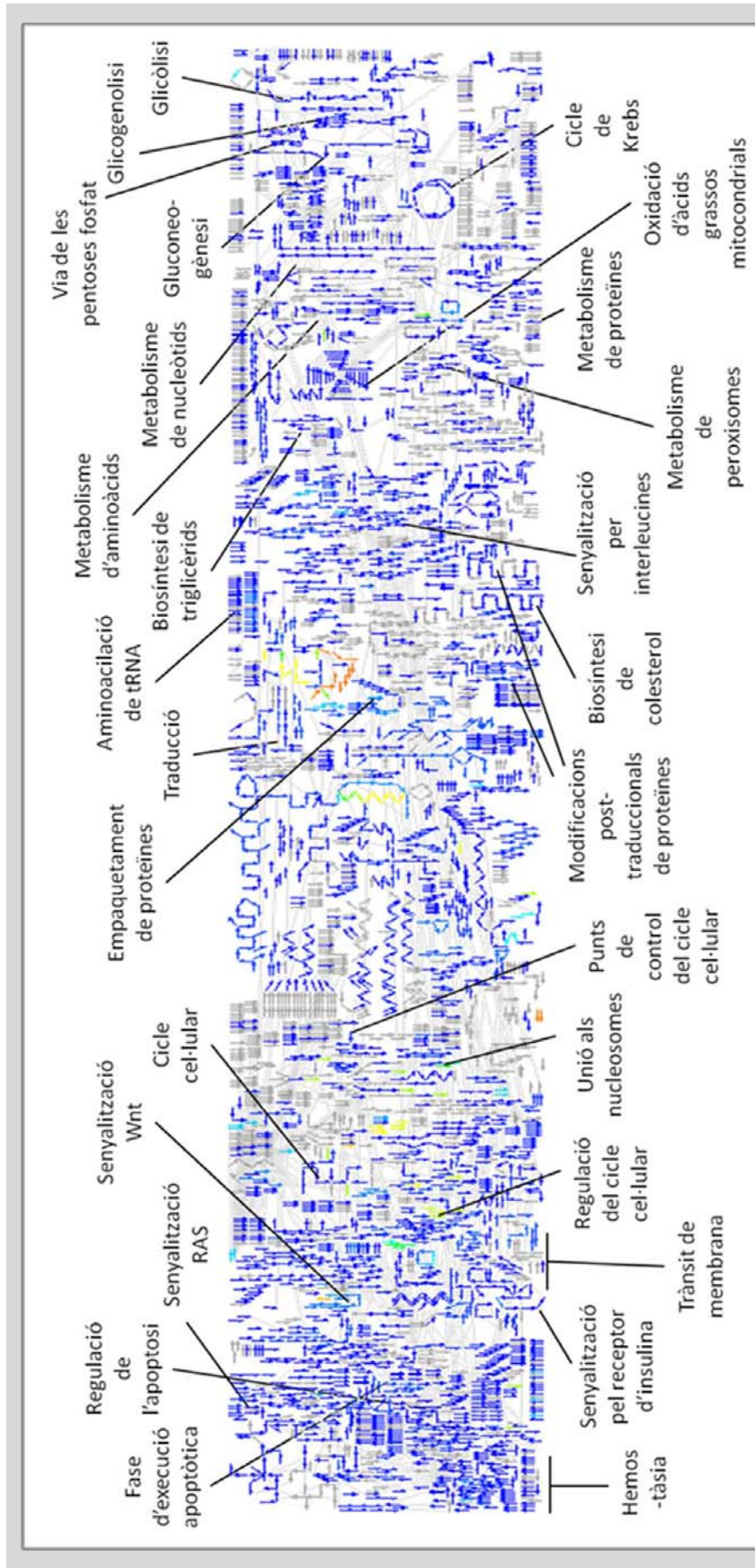


Figura 1.13. Mapa de vies cel·lulars presents en l'espermatozoide humà madur a partir del proteoma espermàtic total. Representació de totes les vies cel·lulars presents en una cèl·lula mitjançant fletxes. Aquelles que es podrien trobar actives en l'espermatozoide humà madur, a partir de l'anàlisi bioinformàtic amb *Reactome* de les 6198 proteïnes diferents reportades fins al moment, es troben representades amb fletxes de colors (rang de colors segons el nombre de gens, de 1 a 80, que s'han identificat i són participants a la via, corresponent el blau a 1 i el vermell a 80). Les vies més representatives es troben senyalitzades al mapa. Modificada de (Amaral *et al.*, 2014).

1.4.4. Proteòmica de l'espermatozoide en espècies models

L'ús d'espècies models presenta diverses avantatges en comparació amb els estudis realitzats amb mostres de procedència humana. En primer lloc, les mostres són més accessibles, facilitant la obtenció d'espermatozoides madurs suficients per realitzar els anàlisis pertinents. A més a més, permeten la possibilitat de realitzar estudis amb l'objectiu d'identificar canvis proteòmics que es poden donar durant l'espermatogènesi o la maduració per l'epidídim. Per últim, cal destacar la utilitat d'aquests organismes per tal d'aplicar la proteòmica en l'estudi de l'efecte tòxic de drogues o diferents agents externs en la cèl·lula germinal masculina.

Pel que fa als estudis en espermatozoide madur, actualment es troben descrits els proteomes espermàtics de diferents mamífers, com ara el del ratolí (Baker *et al.*, 2008; Nixon *et al.*, 2009; Asano *et al.*, 2010; Dorus *et al.*, 2010; Chauvin *et al.*, 2012; Guyonnet *et al.*, 2012), el de la rata (Baker *et al.*, 2008; Maselli *et al.*, 2012), el del toro (Peddinti *et al.*, 2008; Byrne *et al.*, 2012; Soggiu *et al.*, 2013), el del porc (Park *et al.*, 2012) i el del macaco (Skerget *et al.*, 2013). Per altra banda, les tècniques proteòmiques també s'han aplicat amb l'objectiu d'identificar les proteïnes presents en l'espermatozoide de diferents invertebrats i plantes. Per exemple, avui en dia es troben publicats catàlegs de proteïnes procedents del gàmeta masculí de *Drosophila* (Dorus *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010), d'abella (Collins *et al.*, 2006; Poland *et al.*, 2011), de grill (Simmons *et al.*, 2013), de cuc (Chu *et al.*, 2006) i del pol·len d'arròs i de tomàquet (Dai *et al.*, 2006; Sheoran *et al.*, 2007), entre d'altres.

Resulta destacable que en el cas de *Drosophila* s'hagin arribat a identificar unes 381 proteïnes diferents, les quals presentaven una distribució específica al llarg del genoma en forma de *clusters* i amb una menor representació en el cromosoma X (Dorus *et al.*, 2006). Per altra banda, també es interessant tenir en compte que en el cuc *Caenorhabditis elegans* s'han identificat fins a 502 proteïnes associades a la cromatina (Chu *et al.*, 2006).

Tenint present que proteïnes altament conservades són requerides per funcions cel·lulars bàsiques, l'estudi comparatiu entre els diferents proteomes, ja sigui de l'espermatozoide sencer o enfocat en específiques fraccions cel·lulars (com per exemple el nucli), pot ser una eina molt útil per tal d'incrementar el coneixement actual de quins són els processos cel·lulars espermàtics crítics que s'han mantingut conservats al llarg de la evolució.

1.5. Epigenètica de l'espermatozoide

Tradicionalment s'ha considerat l'espermatozoide com una cèl·lula que presentava l'única funció de transmetre a la següent generació el missatge genètic patern codificat al DNA. Aquesta idea era recolzada per la gran diferència de mida que presenta amb l'oòcit i pel fet que el gàmeta femení és el que contribueix a l'embrió amb orgànuls cel·lulars, RNAs i diversa maquinària cel·lular. No obstant, i tot i que aquesta funció té una gran importància biològica i no es posa en dubte, és una realitat que el nombre d'evidències que suggereixen que la cèl·lula germinal masculina podria dur a terme altres funcions essencials es troba en augment. De fet, actualment es considera que a part de l'herència de la informació genètica codificada a la seqüència de DNA, la transmissió de la informació epigenètica espermàtica també representa una funció molt important (Rando, 2012).

L'epigenètica es defineix com l'estudi dels canvis heretables a través d'herència mitòtica o meiòtica que es donen en la funció gènica i que no poden ser explicats pels canvis que succeeixen en la seqüència de DNA (Carrell, 2012). D'aquesta manera, entendre l'epigenètica associada a l'espermatozoide permetrà desentranyar temes relacionats amb l'efecte patern en l'embriogènesi, la biologia de la cèl·lula germinal i la pluripotència de les cèl·lules mare embrionàries.

En el cas de l'espermatozoide, l'estudi epigenètic es basa en 4 àrees principals: la metilació del DNA, el contingut d'RNAs, les modificacions de les histones i l'estructura única que presenta la cromatina espermàtica.

1.5.1. Metilació del DNA espermàtic

La metilació del DNA és un procés bioquímic que cursa amb l'addició d'un grup metil en la posició 5' dels residus de citosina que es troben formant dinucleòtids de citosina-guanina (CpG). Aquest procés de metilació es troba regulat pels enzims anomenats DNA metiltransferases (DNMT), dels quals tres són els principals: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Les dues últimes variants de DNMT esmentades contenen dominis catalítics que provoquen la metilació *de novo* de promotors de gens durant el desenvolupament embrionari. Una vegada les marques de metilació es troben establertes, l'enzim DNMT1 és l'encarregat del seu manteniment a través de les diferents divisions cel·lulars (Bestor, 2000; Jurkowska *et al.*, 2011).

Aquesta modificació epigenètica es troba relacionada amb la regulació de l'expressió dels gens. D'aquesta manera, una hipermetilació gènica provocaria un bloqueig de la maquinària transcripcional, mentre que una hipometilació facilitaria l'activació gènica com a resultat d'una major accessibilitat del DNA a la DNA polimerasa. Per aquest motiu, la metilació del DNA es troba normalment associada al silenciament de gens i esdevé crítica

per l'expressió al·lèlica específica dels gens segellats (*imprinted genes*), la inactivació del cromosoma X, la diferenciació cel·lular i el desenvolupament (Hermann *et al.*, 2004; Auclair and Weber, 2012).

La cèl·lula germinal masculina presenta uns patrons de metilació del DNA similars als de les cèl·lules mare embrionàries, amb una hipometilació general dels promotors gènics que contribueix en la seva transcripció durant el desenvolupament embrionari (Weber *et al.*, 2007; Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009). S'ha observat com alteracions en aquest patró es troben associades a infertilitat o subfertilitat. Per exemple, una metilació alterada dels promotors de gens específics com el DAZL o de gens segellats estaria estretament relacionada amb defectes espermàtics (Navarro-Costa and Plancha, 2011; Pacheco *et al.*, 2011). Per altra banda, també s'ha evidenciat com alteracions en els patrons de la metilació del DNA espermàtic podria resultar en una reducció de la taxa d'embaràs després de cursar FIV (Benchaib *et al.*, 2005). Per tant, el fet de mantenir uns nivells de metilació del DNA ben regulats en l'espermatozoide no seria només necessari per poder donar lloc a la fecundació, si no que també seria important després de la fertilització, quan es produeix una ràpida i activa desmetilació general del DNA patern (exceptuant aquells gens que es troben segellats), la qual és necessària per iniciar el desenvolupament (Reik *et al.*, 2001; Abdalla *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2012). D'aquesta manera, quedaria demostrat com una correcta metilació del DNA és extremadament important per la funció espermàtica.

1.5.2. Contingut d'RNAs

Durant les primeres fases de l'espermatogènesi es dona lloc a una gran activitat transcripcional i traduccional que finalitzarà en la etapa d'espermàtida, després de la qual la majoria del citoplasma i els RNAs són eliminats amb els cossos residuals (Veure Secció 1.1.1. de la Introducció; Figura 1.2). Tot i això, i tal i com s'ha comentat anteriorment (Veure Secció 1.4.3. de la Introducció), s'ha observat la presència de diferents tipus d'RNAs a la cèl·lula espermàtica madura, alguns dels quals podrien representar restes de l'espermatogènesi, però d'altres podrien dur a terme funcions essencials en l'espermatozoide.

Diferents estudis han demostrat com RNAs de gens concrets podrien tenir una aplicació clínica i ser utilitzats com biomarcadors de fertilitat en diferents fenotips espermàtics, com l'astenozoospermia, la teratozoospermia o la oligozoospermia (Platts *et al.*, 2007; Jodar *et al.*, 2012; Montjean *et al.*, 2012). D'altra banda, també s'ha observat l'aparició de diferents *non-coding* RNAs durant les últimes fases de la maduració espermàtica, els quals podrien dur a terme una funció durant els primers estadis després de la fertilització (Ostermeier *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012). Per exemple, els miRNAs

podrien actuar com reguladors transcripcionals en regions on codifiquen promotors, i com a senyal durant la remodelació de la cromatina que té lloc després de la fecundació, quan les protamines són reemplaçades per histones maternes (Kim *et al.*, 2008; Place *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2011). Per altra banda, els piRNAs podrien regular la estabilitat de l'RNA i de l'estat epigenètic i protegir el genoma espermàtic de la transposició, mitjançant la seva unió al DNA. De la mateixa manera, els piRNAs podrien exercir aquesta protecció en el genoma durant el desenvolupament embrionari (Krawetz *et al.*, 2011; Jodar *et al.*, 2013).

1.5.3. Modificacions de les histones

Les histones són proteïnes capaces de contenir modificacions químiques en les seves regions amino-terminals que poden alterar completament l'afinitat amb el DNA, l'accessibilitat de factors reguladors al material genètic i l'expressió gènica. D'aquesta manera es forma el que es coneix com codi d'histones, el qual pot ser reconegut o "llegit" per dominis de proteïnes específiques, com són els *zinc fingers*, els *bromodomains* o els *cromodomains* (Jenuwein and Allis, 2001; Rathke *et al.*, 2013).

Les modificacions principals que poden contenir les histones són metilacions, acetilacions, ubiquitinitzacions i fosforilacions, les quals poden trobar-se de forma individual o bé en conjunt, per tal d'assegurar l'estat d'activació o repressió requerit. Generalment, les acetilacions en les histones H3 i H4 es relacionen amb processos d'activació transcripcional ja que disminueixen la càrrega positiva global, redueixen l'afinitat pel DNA i, per tant, faciliten la generació d'una cromatina més oberta i més accessible als factors de transcripció. De manera inversa, la desacetilació d'histones s'associa a un estat inactiu i sol estar correlacionada amb regions metilades de DNA (Jenuwein and Allis, 2001; Rice and Allis, 2001; Carrell, 2012). La metilació d'histones, en canvi, pot esdevenir tant un marcador de regions de cromatina actives com d'inactives, depenent de la histona i del residu de lisina on es trobi emplaçada. Per exemple, la metilació de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me) es relaciona amb el silenciament del DNA i es troba distribuïda de forma general per la heterocromatina. En canvi, la metilació de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me) es troba principalment associada a promotors de gens actius (Jenuwein and Allis, 2001; Rice and Allis, 2001; Dada *et al.*, 2012). Aquestes modificacions s'estableixen i es regulen per diferents enzims. Les metiltransferases d'histones i les demetilases d'histones són capaces de catalitzar l'addició o eliminació de grups metils, respectivament, mentre que les acetiltransferases d'histones i les desacetilases d'histones ho fan amb els grups acetil.

Com ja s'ha comentat en seccions anteriors (Veure Seccions 1.2.1 i 1.2.2. de la Introducció), l'espermatozoide madur presenta diferents tipus de variants d'histones associades a una petita part del DNA, algunes d'elles específiques de testicle, les quals

poden ser sotmeses a diverses PTM per desenvolupar la seva funció. Algunes d'aquestes modificacions són especialment importants durant el procés de l'espermatogènesi, com és l'acetilació de la histona H4, necessària per reduir l'afinitat dels nucleosomes pel DNA i donar lloc al reemplaçament de les histones per les protamines. Tot i això, s'ha observat també l'existència un codi d'histones que esdevé essencial pel desenvolupament embrionari una vegada donada la fecundació, fent que tant les histones com les seves modificacions siguin un dels majors mediadors d'herència epigenètica de la línia germinal masculina. Degut a que aquest aspecte es troba estretament lligat amb la següent i última àrea de contribució epigenètica de l'espermatozoide, la estructura de la cromatina espermàtica, més detalls seran explicats en el següent apartat.

1.5.4. Estructura de la cromatina espermàtica

Tal i com s'ha descrit anteriorment, l'estructura de la cromatina de la cèl·lula espermàtica és única, formada per dos dominis ben diferenciats entre ells, segons el grau de compactació del DNA. D'aquesta manera, la gran majoria del material genètic es troba altament empaquetat per la seva associació a la regió NP, mentre que el corresponent a la regió NH presentaria una arquitectura més relaxada (Veure Secció 1.2.1. de la Introducció). Diferents estudis han demostrat que el DNA espermàtic organitzat per histones es troba predominantment associat a centròmers i telòmers i especialment enriquit en gens reguladors del desenvolupament i altres elements modificadors de l'expressió gènica (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2010; Oliva and Balleca, 2012; Rathke *et al.*, 2013). D'aquesta manera, a través d'aquesta distribució de gens al llarg de la cromatina de forma diferencial i no donada a l'atzar, l'espermatozoide madur estaria transmetent informació epigenètica a l'embrió.

La primera vegada que es va suggerir l'existència de seqüències de DNA específiques pels components NH i NP i la implicació de les histones en la programació de gens actius en el desenvolupament primerenc va ser a finals del segle passat, tot i que sense descripció dels gens concrets establerts en cadascun dels dominis (Gatewood *et al.*, 1987, 1990). Més tard, a través de l'estudi de les globines, es va observar com gens codificants per ϵ -globina i γ -globina, actives en el sac vitel·lí, contenien regions associades a histones, mentre que els gens de β -globina i δ -globina, silenciats al sac vitel·lí, no les contenien (Gardiner-Garden *et al.*, 1998). Tot i això, amb els avenços de les tècniques d'anàlisi *genome-wide*, aquesta evidència ha sigut totalment confirmada per diferents grups mitjançant la seqüenciació del DNA associat a NH. Concretament s'ha demostrat que tant els nucleosomes d'espermatozoides humans com els de ratolí es troben enriquets en *loci* importants per processos de desenvolupament, incloent gens HOX, microRNAs i regions promotores de gens del desenvolupament i de factors de transcripció (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009). En aquests estudis també s'ha observat com els patrons de metilació de les

histones espermàtiques podrien constituir marques tant d'esdeveniments passats com futurs, ja que gens relacionats amb l'espermatogènesi es trobarien associats a la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3, modificació activadora), mentre que promotors de gens del desenvolupament es trobarien relacionats tant amb modificacions activadores (H3K4me2 i H3K4me3) com repressores (H3K27me3). A més a més, s'ha observat l'existència d'una superposició de gens bivalents (marcats tant amb H3K4me3 com amb H3K27me3) entre l'espermatozoide i les cèl·lules mare embrionàries, el que suggeriria que les marques epigenètiques espermàtiques podrien participar en l'establiment de la totipotència de l'embrió (Hammoud *et al.*, 2009). D'aquesta manera, es poden trobar diferents patrons de metilació d'histones a la cromatina espermàtica: amb efecte activador aquelles associades a gens importants en l'espermatogènesi, i amb caràcter bivalent aquelles que es troben unides a reguladors del desenvolupament (Brykczynska *et al.*, 2010; Lesch *et al.*, 2013). Per tant, l'establiment d'una correcta distribució gènica al llarg de la cromatina espermàtica sembla ser primordial per una correcta funció de l'espermatozoide. De fet, s'ha observat com espermatozoides provinents de pacients infèrtils presentarien una retenció d'histones no específica i donada a l'atzar, a més a més d'una reducció de la quantitat de H3K4me3 o H3K27me3 associades a gens segellats o corresponents a alguns factors de transcripció (Hammoud *et al.*, 2011).

No obstant, encara existeixen alguns aspectes a estudiar en més detall. Per exemple, com ja s'ha comentat en altres seccions d'aquesta introducció, gràcies als estudis proteòmics basats en tècniques de gran resolució i realitzats amb l'espermatozoide madur, es coneix com el nucli espermàtic conté altres nucleoproteïnes a més a més de les protamines i les histones, les quals podrien també presentar una funció en la regulació de l'expressió gènica. Són exemples alguns factors de transcripció, proteïnes portadores de dominis *zinc-fingers* o modificadors de la cromatina. Tot i això, no es coneix si aquestes proteïnes nuclears també podrien estar distribuïdes de forma específica al llarg de la cromatina, associant-se específicament a zones més actives i desenvolupant activitats reguladores que podrien ser transmeses a les següents generacions.

1.6. Fertilització i contribució de l'espermatozoide a l'òocit

La fertilització es pot definir com la unió física entre l'espermatozoide capacitat i l'òvul arrestat en metafase II, la qual resultarà en la formació del zigot (Wassarman *et al.*, 2001). Aquest procés s'inicia amb la penetració de l'espermatozoide en la zona pel·lúcida de l'òocit mitjançant la reacció acrosòmica i es tracta d'un procés gradual, durant el qual la cèl·lula espermàtica experimenta la pèrdua o modificació irreversible de diferents estructures (Sutovsky, 2009) (Figura 1.14). Inicialment, la cèl·lula germinal masculina pateix una pèrdua de membranes, tant plasmàtica com acrosòmica, i es fusiona amb el gàmeta femení mitjançant el segment equatorial del seu cap. Aquest procés de fusió es troba dirigit principalment per la proteïna espermàtica IZUMO, que es redistribueix pel cap de l'espermatozoide després de la capacitació, i s'uneix al receptor Juno de la superfície de l'òvul (Inoue *et al.*, 2005; Sutovsky, 2009; Bianchi *et al.*, 2014). Aquestes proteïnes resulten essencials per la fusió dels gàmetes i, per tant, per la fertilització. A més a més, s'ha descrit la participació de Juno en la prevenció de la polispermia (Bianchi and Wright, 2014).

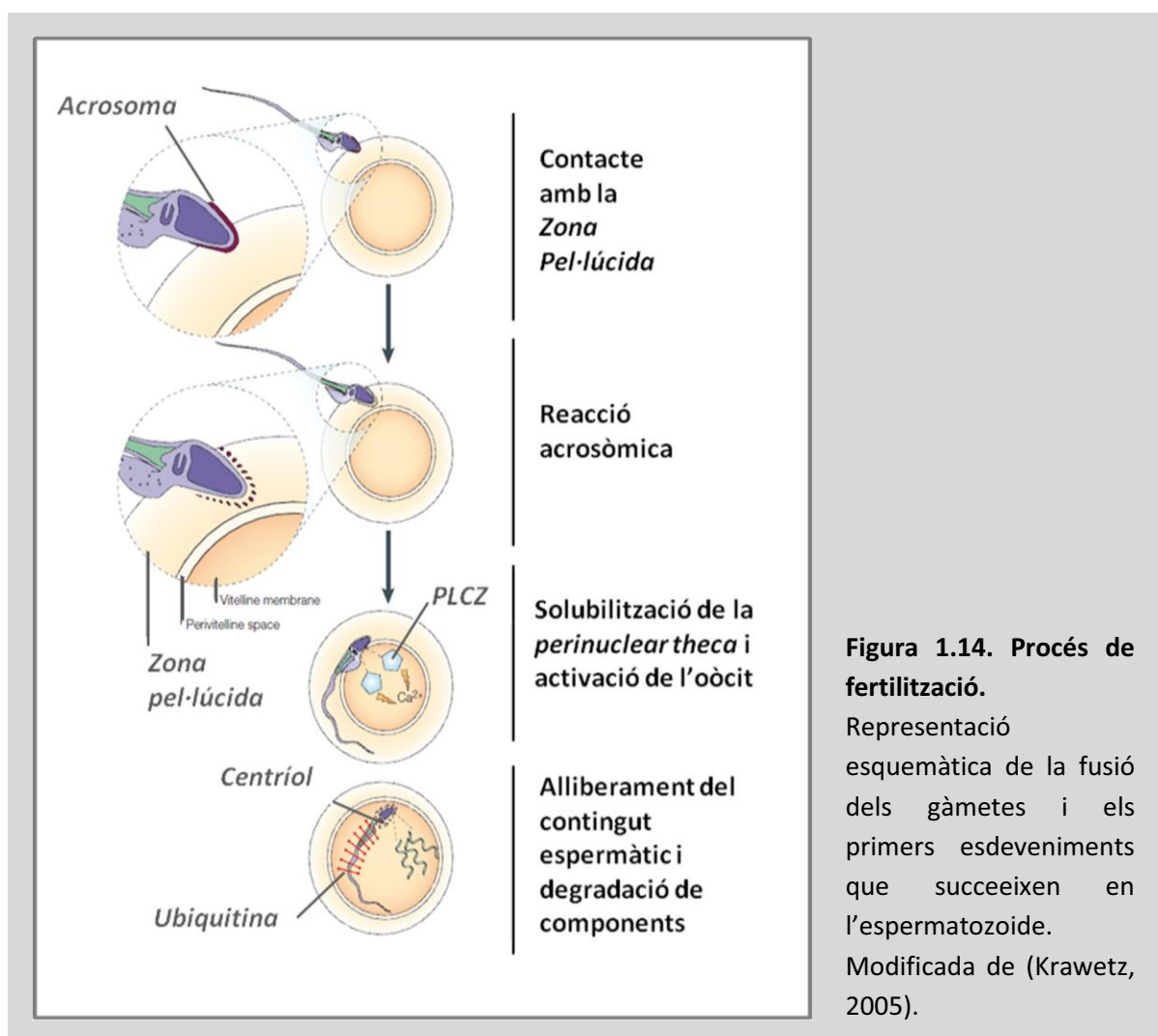


Figura 1.14. Procés de fertilització.

Representació esquemàtica de la fusió dels gàmetes i els primers esdeveniments que succeeixen en l'espermatozoide. Modificada de (Krawetz, 2005).

Una vegada donada la fusió dels gàmetes, l'espermatozoide penetra a l'òvul i allibera a l'ooplasma la teca perinuclear i la fosfolipasa C ζ (PLCZ), entre d'altres components, per tal d'iniciar les oscil·lacions de calci i activar l'òocit. Seguidament s'iniciarà el procés de desenvolupament embrionari (Sutovsky and Manandhar, 2006; Sutovsky, 2009) (Figura 1.14).

Quan es parla de contribució dels gàmetes en la fertilització, el paper de l'òocit és troba ben definit i entès. En canvi, el coneixement actual sobre quina és la implicació real i completa de l'espermatozoide en aquest procés, més enllà de la contribució amb el material genètic, es troba en evolució (Schultz, 2002). Es considera que una vegada donada la fusió dels gàmetes l'espermatozoide allibera tot el seu contingut a l'ooplasma, encara que no tots els components seran necessaris pel desenvolupament embrionari. Per exemple, les mitocòndries espermàtiques són marcades per la seva degradació mitjançant el sistema d'ubiquitines. A més a més, també es produeix l'eliminació de l'axonema i de les estructures flagel·lars accessòries de l'espermatozoide (Krawetz, 2005; Sutovsky and Manandhar, 2006). En cas contrari, i tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, actualment es coneix que la cèl·lula espermàtica es troba contribuint amb un conjunt d'RNAs, alguns dels quals semblen ser necessaris per una correcta embriogènesi. Per altra banda, el centríol patern es troba involucrat en la formació del centrosoma del zigot (Sutovsky and Manandhar, 2006).

Una vegada dintre del citoplasma de l'òocit, el nucli espermàtic experimenta diferents processos per tal de donar lloc al desenvolupament del pronucli masculí: pèrdua de la membrana nuclear, remodelació de la cromatina, descondensació i augment de la mida, obtenció d'una forma més esfèrica i formació d'una nova membrana nuclear (Wright, 1999). Pel que fa a la remodelació de la cromatina, les protamines es dissocien del DNA i són ràpidament degradades per tal de ser reemplaçades, en primer lloc, de forma transitòria per histones de l'òocit i, finalment, de forma permanent per histones somàtiques maternes. Tot i així, i a part de la proteïna PLCZ ja esmentada, l'espermatozoide conté altres proteïnes, com factors de transcripció o molècules de senyalització, que tenen relació amb diferents processos de desenvolupament i que, per tant, podrien ser considerades necessàries en la fertilització. Per exemple, es creu que la PT32 (32-kD *perinuclear theca protein*) podria participar en esdeveniments inicials del desenvolupament del zigot o del pronucli (Krawetz, 2005). D'aquesta manera, sembla necessari poder completar la descripció del contingut proteic del nucli de l'espermatozoide madur per tal de caracteritzar possibles nucleoproteïnes que, com les ja esmentades, puguin estar duent a terme funcions importants en la fertilització o en les fases posteriors.

2. Hipòtesi i objectius

2. Hipòtesi i objectius

Cada vegada són més les evidències que suggereixen que l'espermatozoide madur presenta una funció més enllà de la simple transmissió del material genètic patern a la següent generació. La hipòtesi principal d'aquesta tesi consisteix en que aquesta contribució paterna no és solament basada en la transmissió de patrons de metilació de DNA o modificacions d'histones concretes, si no que també es troba influïda per l'estat de la cromatina espermàtica i en especial per la seva composició proteica. A partir d'això, es generen hipòtesis addicionals. Per una banda, les protamines, proteïnes majoritàries del nucli de l'espermatozoide, ajudarien a la conservació d'aquesta cromatina i, per tant, alteracions en els seus nivells afectarien a la integritat del material genètic. A més a més, l'aplicació de tècniques proteòmiques basades en espectrometria de masses, partint de la cèl·lula completa, ha permès la identificació de nucleoproteïnes interessants, com són alguns factors de transcripció, proteïnes amb dominis *zinc finger* o diverses variants d'histones diferents. La presència d'aquest tipus de proteïnes en una cèl·lula transcripcionalment inerta ens permet hipotetitzar, per altra banda, la presència de proteïnes nuclears addicionals que podrien representar components importants en diferents processos durant la fecundació i el desenvolupament embrionari i en la transmissió d'informació epigenètica.

D'aquesta manera, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral consisteix en realitzar una caracterització completa del contingut proteic del nucli de l'espermatozoide humà normal i de les seves característiques per tal d'augmentar el coneixement actual d'aquest compartiment cel·lular i així arribar a desentranyar aspectes relatius a alteracions epigenètiques en pacients infèrtils, per una banda, i a la implicació potencial del gàmeta masculí en la fertilització i el desenvolupament embrionari, per l'altra. Degut a que les proteïnes majoritàries del nucli espermàtic són les protamines i que aquestes presenten característiques fisicoquímiques molt especials que requereixen tècniques d'anàlisi concretes, la caracterització proteòmica s'obtindrà per dos estratègies diferents: en primer lloc l'estudi específic de nivells de protamines en pacients infèrtils valorant la seva implicació en l'estat de la cromatina, i en segon lloc l'estudi de la resta de proteïnes nuclears, mitjançant enriquiment per subfraccionament. Per últim s'establirà el proteoma nuclear total i la conservació per comparació amb espècies models de mamífers.

Per tant, els objectius específics i detallats d'aquesta tesi doctoral són els següents:

1. Analitzar el contingut de protamines d'espermatozoides humans madurs i la seva implicació en l'estat de la cromatina espermàtica.
 - 1.1. *Establir la relació entre els quocients P1/P2 i P/DNA amb el grau de fragmentació del DNA en mostres de semen de pacients infèrtils.*
 - 1.2. *Identificar la presència de modificacions post-traduccionals en les seqüències de les protamines humanes mitjançant espectrometria de masses.*

2. Hipòtesi i objectius

2. Analitzar el proteoma nuclear d'espermatozoides humans normals i la distribució de proteïnes en diferents compartiments de la cromatina espermàtica mitjançant espectrometria de masses.

2.1. Descriure el contingut proteic del nucli de l'espermatzoide humà madur normozoospèrmic.

2.2. Caracteritzar subconjunts de proteïnes nuclears d'espermatozoides normozoospèrmics segons la seva distribució en diferents compartiments de la cromatina espermàtica.

3. Compilar el proteoma nuclear total de l'espermatzoide humà normozoospèrmic i establir el potencial epigenètic i la conservació per comparació amb el d'espècies models de mamífers.

3. Material i mètodes

3. Material i mètodes

3.1. Material biològic i processament de les mostres de semen

En la present tesi s'han utilitzat dos tipus de mostres de semen humà de diferent origen i processament:

1) Mostres de pacients infèrtils del laboratori d'andrologia de la *Queen's University of Belfast*, Irlanda:

Aquestes mostres de semen van procedir d'homes que van assistir amb la seva parella al laboratori d'andrologia de la *Queen's University of Belfast* a causa d'un problema d'infertilitat. Per tant, la raó de la infertilitat era desconeguda en el moment de la recollida de les mostres. Més tard, aquests pacients van dur a terme reproducció assistida per FIV o per ICSI. Tots els pacients van donar el consentiment informat per escrit i el projecte va ser aprovat per la *Office for Research Ethics Committees in Northern Ireland* i el *Royal Group Hospitals Trust Clinical Governance Committee*.

Es van recollir un total de 66 mostres que van ser utilitzades per dur a terme un estudi col·laboratiu amb el grup de la Dra. Sheena Lewis de Belfast, Irlanda. La recollida de les mostres, els tractaments inicials i els anàlisis espermàtics es van dur a terme al seu laboratori i pel seu grup seguint els seus procediments habituals. Després, les mostres van ser enviades al nostre laboratori per tal de dur a terme un anàlisi del contingut de protamines (Veure Secció 3.3. de Material i mètodes i 4.1.1. de Resultats). Per tal de proveir informació referent al tractament que es va fer a les mostres abans de rebre-les en el nostre laboratori, els procediments seguits al grup de la Dra. Sheena Lewis es troben descrits breument a continuació:

- Els ejaculats es van obtenir després de 3-5 dies d'abstinència sexual i es va procedir a la liqüefacció. Seguidament, les mostres van ser sotmeses a un anàlisi espermàtic convencional seguint les indicacions de la Organització Mundial de la Salut (World of Health Organization, 1999). Com a paràmetres seminals es van determinar el volum, la concentració espermàtica, la producció total d'espermatozoides, la mobilitat progressiva i la morfologia.
- Una alíquota de cada mostra es va reservar per tal de dur a terme un gradient discontinu 90%-45% amb PureSperm (Hunter Scientific Limited, Essex, Regne Unit). El gradient estava format per 2 ml de PureSperm 90% a sobre del qual hi havia 4 ml de PureSperm 45%. A la part de dalt del gradient es va dipositar la mostra de semen i es va procedir a centrifugar les mostres a 250 g durant 20 min a temperatura ambient. Es va descartar el sobrenedant i es van utilitzar els espermatozoides recollits al sediment per fer els anàlisis.
- De cadascuna de les mostres utilitzades es va obtenir una alíquota representativa de l'ejaculat inicial, a la qual se li va anomenar *Native sample*, i una alíquota

3. Material i mètodes

representativa dels espermatozoides recollits després del gradient 90-45% de PureSperm, a la qual se li va anomenar DGC *sample* (*Density Gradient Centrifuged sample*).

- Part de les dues alíquotes recollides per a cadascuna de les mostres es va incubar a 37 °C durant un mínim de 30 min i un màxim de 4 hores fins al començament de l'anàlisi del dany del DNA mitjançant Comet (Veure Secció 3.4 de Material i Mètodes). El material restant es van centrifugar a 800 *g* durant 12 minuts a temperatura ambient i els sediments es van conservar a -80 °C fins al seu enviament al nostre laboratori amb un servei de missatgeria de 24h, per tal de dur a terme l'anàlisi del contingut de protamines (Veure Secció 3.3.1. de Material i Mètodes).

2) Mostres de pacients que es sotmeten a anàlisis de semen rutinaris a la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona:

La resta d'estudis duts a terme en aquesta tesi doctoral es van realitzar amb mostres de semen de pacients de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona (FIV Clínic). Tots els pacients van signar els formularis de consentiment informat i el material humà va ser utilitzat seguint les guies d'ètica internes del centre.

A la Unitat de Reproducció Assistida es van realitzar tots els anàlisis de semen rutinaris: recollida dels ejaculats en recipients estèrils específics després d'un mínim de 3 dies d'abstinència sexual, liqüefacció de les mostres a temperatura ambient i avaluació dels paràmetres seminals (concentració, volum, mobilitat i morfologia), seguint les guies actualitzades de la Organització Mundial de la Salut (World of Health Organization, 2010). La determinació dels paràmetres seminals es va dur a terme amb el sistema informatitzat CASA (Proiser, València, Espanya), exceptuant la morfologia que es va avaluar segons el criteri estricte de Kruger (Kruger *et al.*, 1987), examinant un mínim de 100 espermatozoides per mostra.

Ja en el nostre laboratori, les mostres es van processar de dues formes diferents segons si l'objectiu era conservar-les per ser utilitzades més endavant (per a la realització d'estudis de protaminació) o bé utilitzar-les en fresc (per a la realització d'estudis de proteòmica). Els passos es van seguir es descriuen a continuació:

- I. Conservació de les mostres per ser utilitzades més endavant (estudis de protaminació):
 - Rentar les mostres de semen amb un mínim d'1 volum de medi nutritiu Ham F10 1x complementat amb NaHCO₃ 2% (p/v). Agitar bé i centrifugar a 3000 *g* durant 5 min.
NOTA: Aquest pas serveix per eliminar el plasma seminal.

Per preparar 50 ml de Ham F10 1x- NaHCO₃ 2%:

50 ml Ham F10 1x (Gibco®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Paisley, Escòcia)

100 mg NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St Louis, Misuri, USA)

- Resuspendre el sediment en 1 ml de Ham F10 1x-2% NaHCO₃ amb 7% de glicerol.
NOTA: el glicerol a aquesta concentració permetrà protegir els espermatozoides durant el procés de congelació i descongelació.

Per preparar 1ml de Ham F10 1x- NaHCO₃ 2%- Glicerol 7% (v/v):

860 µl Ham F10 1x- NaHCO₃ 2%

140 µl Glicerol (Sigma-Aldrich)

- Conservar les mostres a -20 °C.

II. Utilització de mostres fresques (estudis de proteòmica):

- Rentar les mostres de semen amb un mínim d'1 volum de Ham F10 1x-NaHCO₃ 2%. Agitar bé i centrifugar a 3000 g durant 5 min per tal d'eliminar el plasma seminal.
- Resuspendre el sediment de cèl·lules recollit amb 1 ml de Ham F10 1x-NaHCO₃ 2% i fer un recompte de cèl·lules amb el microscopi òptic fent servir la cambra de comptatge Makler (*Makler Counting Chamber*, Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel)
NOTA: La cambra Makler consta de 10 files amb 10 requadres cadascuna. La quantitat d'espermatozoides que es troben en una fila de 10 requadres correspon a milions d'espermatozoides/ml. Contar al menys 3 files de requadres amb la cambra Makler i fer el promig per determinar la concentració d'una mostra. Controlar la presència de cèl·lules contaminants contant qualsevol cèl·lula diferent a l'espermatozoide que estigui present en les 10 fileres de la cambra Makler (100 requadres), fer el promig i calcular el percentatge de contaminació referent a la totalitat d'espermatozoides trobats.
- Purificar la mostra amb selecció d'espermatozoides mitjançant Percoll 50% i eliminació de leucòcits amb Dynabeads® CD45, seguint els procediments detallats a la següent Secció 3.2. de Material i Mètodes.

3.2. Purificació dels espermatozoides

Uns dels requisits més importants i crítics a l'hora de fer un estudi de proteòmica és partir d'una mostra pura. S'ha de poder assegurar la correcta eliminació de cèl·lules contaminants per tal de poder relacionar la identificació d'una proteïna concreta al tipus cel·lular en estudi i no tenir artefactes o resultats esbiaixats. Les mostres de semen humà són una mescla heterogènia de cèl·lules diferents, i per cèl·lula contaminant entenem qualsevol cèl·lula diferent al propi espermatozoide, com per exemple leucòcits, cèl·lules epitelials o cèl·lules espermàtiques immadures. La proporció de cèl·lules contaminants és relativament petita en mostres normozoospèrmiques (al voltant d'un 2%), no obstant, pot arribar a ser elevada en mostres amb alteracions fenotípiques, arribant fins al 50% en mostres oligozoospèrmiques severes.

Les mostres que van ser objecte d'estudis de proteòmica en aquesta tesi van ser purificades a dos nivells:

- 1) Selecció d'espermatozoides mitjançant Percoll 50%
- 2) Exhaustiva eliminació de leucòcits residuals utilitzant boles magnètiques adherides a un anticòs que reconeix l'antigen CD45 present a les membranes dels leucòcits (*Dynabeads*[®] CD45).

La correcta purificació de les mostres es va confirmar amb microscopi òptic (Figura 3.1). Addicionalment, i complementant la confirmació visual, en alguns casos també es va confirmar la puresa mitjançant l'extracció i anàlisi d'RNA corresponent al marcador de leucòcits CD45.

3.2.1. Selecció d'espermatozoides amb Percoll 50%

El Percoll és un medi de densitat utilitzat per la preparació de cèl·lules, fraccions de cèl·lules o fins i tot grans virus. En quant a la purificació de mostres d'espermatozoides és comú realitzar un gradient de Percoll 40-80% (World of Health Organization, 2010), tot i que aquest procediment resulta en una selecció exhaustiva del millors espermatozoides presents a la mostra (amb més mobilitat i millor morfologia). No obstant, un estudi previ del nostre laboratori va demostrar en mostres normozoospèrmiques que una selecció de cèl·lules amb Percoll 50% era suficient per tal de purificar la mostra de cèl·lules contaminants i, a la vegada, mantindre una població representativa dels espermatozoides presents inicialment (Mengual *et al.*, 2003).

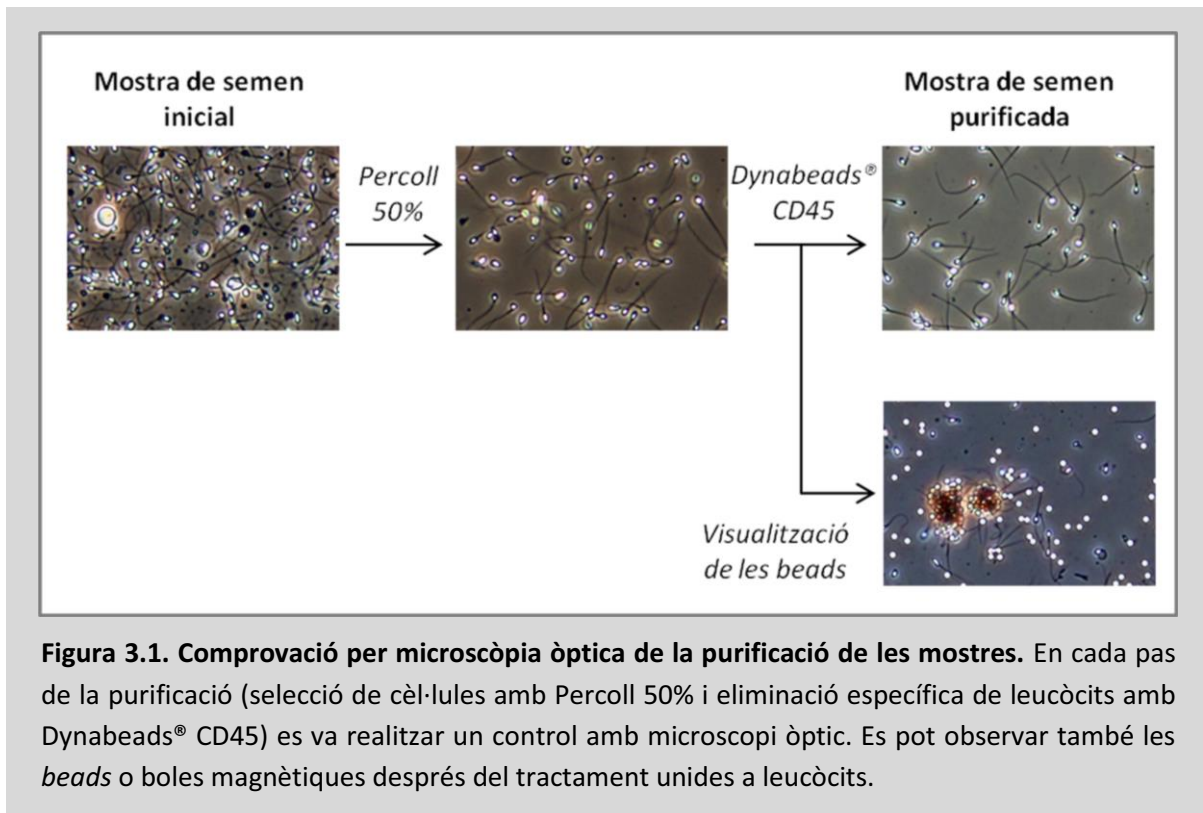


Figura 3.1. Comprovació per microscòpia òptica de la purificació de les mostres. En cada pas de la purificació (selecció de cèl·lules amb Percoll 50% i eliminació específica de leucòcits amb Dynabeads® CD45) es va realitzar un control amb microscopi òptic. Es pot observar també les *beads* o boles magnètiques després del tractament unides a leucòcits.

Per tant, en aquesta tesi es va realitzar Percoll al 50% de mostres d'espermatozoides prèviament rentades i sense plasma seminal (Veure Secció 3.1 de Material i mètodes).

Es va preparar 1 ml de Percoll al 50% isotònic per cada 50 milions d'espermatozoides. Els passos següents van ser els següents (Martinez-Heredia *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2013):

I. Preparació de la mostra d'espermatozoides:

- Calcular el volum que hauria de tenir la mostra d'espermatozoides per tal de tenir una concentració de 50×10^6 espermatozoides/ml.
- Diluir el sediment d'espermatozoides prèviament rentats (Veure Secció 3.1. de Material i Mètodes) en el volum necessari de Ham F10 1X- NaHCO₃ 2% calculat en el pas anterior.

II. Preparació del Percoll 50%:

- Preparar una solució *stock* de Percoll 100% isotònic.
NOTA: Aquesta solució és estable una setmana a 4 °C.

3. Material i mètodes

Percoll 100% isotònic:

87% Percoll™ (GE Healthcare, Uppsala, Suècia)
10% Ham F10 10x (Biological Industries, Haemek, Israel)
0,225% NaHCO₃

- A partir de la solució de Percoll 100% preparar la solució de Percoll 50%.

NOTA: Aquesta solució es prepara en el moment de l'ús.

Percoll 50% isotònic:

50% Percoll 100% isotònic
50% Ham F10 1x-2% NaHCO₃

- Posar 1 ml de Percoll 50% en cada tub de 15 ml.

NOTA: el número de tubs de Percoll 50% dependrà de la quantitat d'espermatozoides presents a la mostra, les condicions òptimes consistirien en posar 50 milions d'espermatozoides en cada tub.

III. Emplaçament de la mostra i selecció dels espermatozoides:

- Afegir 1 ml de mostra diluïda en Ham F10 1x- NaHCO₃ 2% en cada tub amb Percoll 50%.

NOTA: És important fer-ho amb cura i poc a poc per tal d'evitar que la mostra es barregi amb el Percoll. Una forma de fer-ho consistiria en recolzar la punta de la pipeta en la paret del tub i deixar anar molt a poc a poc la mostra, de manera que vagi relliscant per la paret del tub per situar-se sobre el coixí de Percoll 50%. En aquest punt es poden observar dues fases clarament visibles, el Percoll a la part de baix del tub i la mostra a sobre (Figura 3.2).

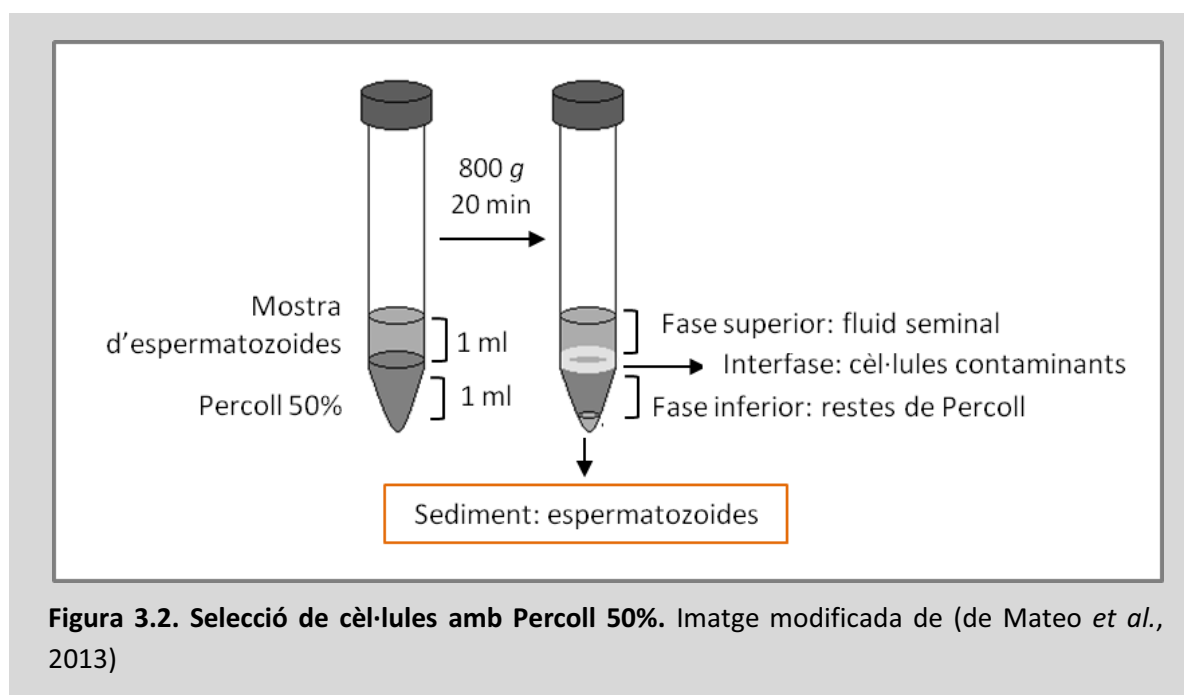


Figura 3.2. Selecció de cèl·lules amb Percoll 50%. Imatge modificada de (de Mateo et al., 2013)

- Posar amb cura els tubs en gel i deixar reposar 10 min.
NOTA: D'aquesta manera el canvi de fase no es donarà d'una manera tan brusca.
- Centrifugar a 800 g durant 20 min a 4 °C.
- Posar els tubs cuidadosament en gel. Després de la centrifugació han de ser visibles dues fases ben diferenciades: una interfase i un sediment (Figura 3.2).
NOTA: La fase superior correspon a restes de fluid seminal, a la interfase trobarem cèl·lules somàtiques i espermatozoides aberrants, i la fase inferior estarà formada per restes de Percoll. Es descarten les tres fases. En el sediment trobarem els espermatozoides purificats.
- Resuspendre el sediment d'espermatozoides en PBS (*Phosphate Buffered Saline*; Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) per tal de confirmar la correcta eliminació de cèl·lules contaminants mitjançant microscopi òptic (Figura 3.1).

3.2.2. Eliminació de leucòcits amb Dynabeads® CD45

L'eliminació de leucòcits residuals mitjançant boles magnètiques adherides a un anticòs que reconeix l'antigen CD45 present a les membranes de les cèl·lules blanques es va dur a terme amb el producte comercial Dynabeads® CD45 (Invitrogen, Dynal AS, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Oslo, Noruega), tal i com s'ha descrit en un estudi del nostre laboratori (Amaral *et al.*, 2013).

Es va fer el tractament amb 50 µl de Dynabeads®/tub de mostra. És aconsellable dividir la mostra en 6-10 tubs, depenent de la quantitat d'espermatozoides que es tingui (per exemple, uns 500×10^6 espermatozoides es dividrien en 10 tubs). Com menys quantitat d'espermatozoides tinguem per tub major serà l'eficiència de la purificació.

Primer de tot s'ha de procedir al rentat de les boles magnètiques i seguidament es podrà realitzar el tractament de la mostra.

I. Rentat de les Dynabeads® CD45:

- Agafar el pot comercial de Dynabeads® CD45 i fer un vòrtex per a que estigui ben barrejat.
- Agafar el volum necessari de Dynabeads® CD45 per tenir 50 µl/tub, transferir-lo a un tub de 1,5 ml i afegir fins a 1-1,25 ml del medi en el qual la nostra mostra es troba diluïda (per exemple, PBS).
- Fer vòrtex i posar el tub a l'imant durant 2 min.
- Sense treure els tubs de l'imant, descartar el sobrenedant.

- Resuspendre les boles magnètiques en un volum de medi (PBS o un altre) necessari per a que tinguem 50 µl/tub per tractar la mostra.

II. Tractament de la mostra amb les Dynabeads® pre-rentades:

- Dividir la mostra en 6-10 tubs i afegir medi (PBS o un altre) fins a obtenir 1ml/tub.
- Afegir 50 µl/tub de Dynabeads® CD45 pre-rentades amb el medi de la mostra.
- Fer vòrtex (aquest pas és crític i s'ha de fer sempre).
- Deixar els tubs en agitació a temperatura ambient durant 1 h.
- Posar els tubs a l'imant durant 2 min.
- Sense treure els tubs de l'imant, treure el sobrenedant i passar-lo a un tub nou.
- Posar 150 µl de medi (PBS o un altre) als tubs inicials on ha quedat el sediment de *beads*. Fer vòrtex i posar a l'imant durant 1 min. Sense treure els tubs de l'imant, treure el sobrenedant i ajuntar-lo amb l'anterior.

NOTA: És aconsellable resuspendre el sediment de beads en medi (PBS o un altre) per tal de fer un control amb microscopi òptic (Figura 3.1).

- Posar els tubs nous, que contenen els dos sobrenedants, a l'imant durant 2 min addicionals, per tal d'assegurar la correcta eliminació de les *beads*. Treure el sobrenedant i passar-lo a un tub nou.
- Centrifugar els tubs amb els sobrenedants a 2000 g durant 5 min a 4 °C. Ajuntar els sediments i dissoldre'ls en 1 ml de medi (PBS o un altre) per fer recompte dels espermatozoides amb la cambra Makler i control de la correcta eliminació dels leucòcits (Figura 3.1).

3.2.3. Comprovació de la puresa mitjançant extracció d'RNA i RT-PCR de CD45

Adicionalment al control de la contaminació en les mostres de semen mitjançant microscopi òptic, la puresa d'alguna de les mostres objecte d'estudis de proteòmica també va ser analitzada a partir d'una *reverse transcription* (RT)-PCR pel marcador específic de leucòcits CD45. Tant l'extracció del RNA d'espermatozoides i les condicions de la RT-PCR i PCR realitzades es van dur a terme seguint les indicacions publicades en un estudi previ del nostre grup (Jodar *et al.*, 2012) i a la tesi doctoral de la Dra. Meritxell Jodar (<http://hdl.handle.net/10803/119732>). El procediment seguit va ser el següent:

I. Extracció d'RNA d'espermatozoides:

- Partir d'un volum de la mostra purificada corresponent a 30×10^6 espermatozoides i treballar en tot moment a la campana i amb tubs pre-tractats per ser *RNAse Free*. Les solucions utilitzades, si no es diu lo contrari, pertanyen al *kit* miRNeasy (Qiagen GmDH, Hilden Alemanya).
- Centrifugar a 500 g durant 8 min a 4 °C i descartar el sobrenedant.
NOTA: descartar el màxim de sobrenedant possible.
- Afegir al sediment 600 µl de *Lysis Buffer* i 6 µl de β-mercaptoetanol (Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Alemanya). Amb una agulla de 25 Gauges (0,5 mm) unida a una xeringa estèril d'1 ml s'homogeneïtza la mostra agafant i deixant anar suaument volum de mostra uns 20-25 cops. D'aquesta manera també s'ajuda al trencament cel·lular.
- Guardar la mostra a -80 °C. Mantenir a aquesta temperatura com a mínim una nit (ajuda al trencament cel·lular).
NOTA: La mostra és estable a aquesta temperatura durant mesos.
- Deixar descongelar la mostra a temperatura ambient i deixar reposar durant 5 min addicionals.
- Afegir 140 µl de cloroform (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya) per tal d'iniciar la precipitació del RNA. Vortejar vigorosament durant 15 s.
- Deixar reposar el tub durant 3 min a RT.
- Centrifugar a 14000 g durant 15 min a 4 °C.
NOTA: S'obtidran 3 fases: una fase aquosa superior i transparent que conté l'RNA, una interfase blanquinosa amb restes cel·lulars i brutícia (és més petita que la que es trobaria en cèl·lules somàtiques) i una fase orgànica vermellosa a la part inferior, amb restes del lysis buffer, entre altres (Figura 3.3).

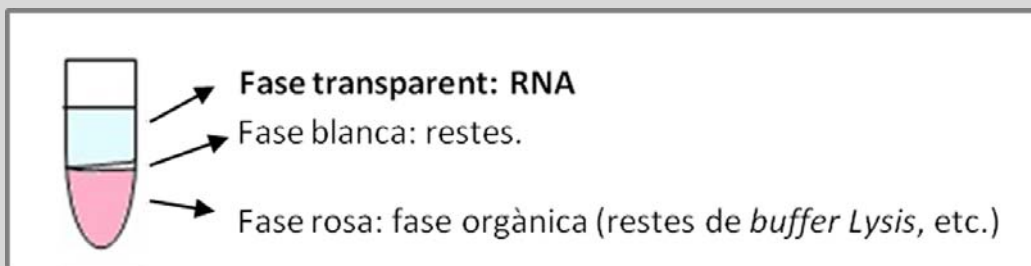


Figura 3.3. Fases obtingudes durant l'extracció d'RNA d'espermatozoides amb el *kit* mRNeasy.

3. Material i mètodes

- Transferir la fase transparent corresponent a l'RNA a un tub col·lector de 2 ml, en volums de 50 en 50 µl. Descartar si s'agafa una mica d'alguna de les altres dues fases.
- Afegir 1,5 volums d'etanol 100% (Merck KGaA) i barrejar bé amb la pipeta.
- Transferir poc a poc el volum a una columna disponible al *kit*.
- Centrifugar a més de 8000 *g* durant 15 s a temperatura ambient i descartar (abocant-lo) el fluid que ha passat per la columna i s'ha col·lectat al tub inferior.
- Afegir poc a poc a la columna 700 µl del *Buffer RWT* del *kit*. Centrifugar a més de 8000 *g* durant 15 s a temperatura ambient i descartar el fluid col·lectat al tub inferior.
- Afegir poc a poc a la columna 500 µl del *Buffer RPE* del *kit*. Centrifugar a més de 8000 *g* durant 15 s a temperatura ambient i descartar el fluid col·lectat al tub inferior.
- Repetir el pas anterior però centrifugant durant 2 min.
- Centrifugar a velocitat màxima durant 1 min a temperatura ambient i traspasar la columna a un tub nou.
- Afegir a la columna 50 µl d'aigua DEPC (lliure d'RNAses) pre-escalfada a 65 °C. Deixar reposar 5 min a temperatura ambient per a que l'aigua penetri.
- Centrifugar a més de 8000 *g* durant 1 a temperatura ambient. En el tub es recollirà el RNA. Mantenir en gel.
- Comprovar la concentració d'RNA obtinguda mitjançant la lectura de l'absorbància a 260 nm i constant 40 ng/µl.
NOTA: Concentracions correctes d'RNA extret d'espermatozoides es troben al voltant de 20-50 ng/µl.
- Utilitzar l'RNA per retrotranscriure'l a cDNA.

II. Retrotranscripció i PCR (RT-PCR):

La retrotranscripció (pas de RNA a cDNA) es va dur a terme utilitzant el *kit* comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA) i un volum final de reacció corresponent a 20 µl.

- Utilitzar 100 ng de RNA diluïts en volum de 10 µl.
- Preparar 10 µl de la mescla per la reacció de retrotranscripció i afegir al RNA.

Mescla reacció de retrotranscripció (10 µl):

2 µl Tampó
0,8 µl dNTPs
2 µl *Random primers*
1 µl Transcriptasa reversa
0,3 µl inhibidor d'RNAses
3,9 µl Aigua lliure d'RNAses

- Per dur a terme la retrotranscripció es va fer servir el termociclador PTC-100™ *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Quebec, Canadà) amb el següent programa:

Condicions del programa de retrotranscripció:

25 °C 10 min
37 °C 2 h (Temperatura òptima per l'enzim)
90 °C 10 min (inactivació de l'enzim)

Per tal de verificar l'absència de leucòcits, amb el cDNA obtingut es van realitzar dues PCR:

- 1) Amplificació del DNA corresponent al marcador específic de leucòcits CD45. Degut a que CD45 és l'antigen més comú dels leucòcits, si no s'obté amplificació es confirmarà l'absència de leucòcits.
- 2) Amplificació del DNA corresponent al gen de la Protamina 2 humana (PRM2). Donat que el gen de la protamina 2 es troba present en tots els espermatozoides, aquesta amplificació es va utilitzar com a control de la integritat del RNA extret.

Es va realitzar la PCR de la mostra de semen purificada i també d'RNA extret d'una mostra de semen amb una contaminació major d'1 milió de leucòcits/ml. Aquesta darrera mostra es va utilitzar com a control positiu de la contaminació.

Per tal de dur a terme la reacció de PCR es van utilitzar els encebadors i les condicions establertes a la tesi de la Dra. Meritxell Jodar (<http://hdl.handle.net/10803/119732>), les quals també es troben indicades a la taula 3.1.

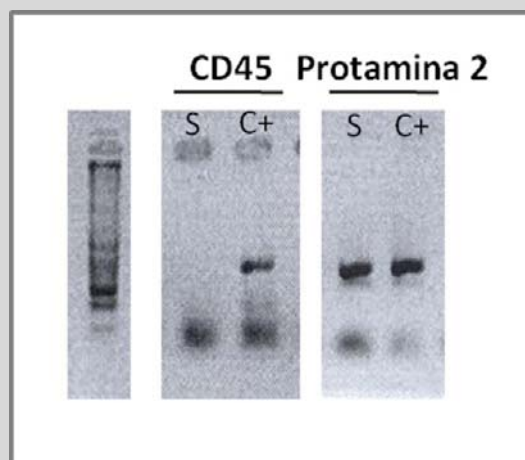
A la figura 3.4 es mostra el resultat de PCR d'una mostra d'espermatozoide correctament purificada.

3. Material i mètodes

Taula 3.1. Condicions de les PCRs realitzades pels gens CD45 i PRM2 per la comprovació de la puresa de la mostra.

Gen	Encebadors	Reactius (per 1 mostra)	Condicions de PCR	Cicles	Mida de l'amplificació de DNA (pb)
CD45	<p><i>Forward (F):</i> CCTTGAACCCGAAC ATGAGT</p> <p><i>Reverse (R):</i> ATCTTTGAGGGGGA TTCCAG</p>	<p>cDNA: 1µl Tampó 10x: 2,5 µl dNTPs: 2,5 µl Encebador F: 0,5 µl Encebador R: 0,5 µl Taq (Biotherm): 0,15 µl MgCl₂: 1,5 µl Aigua: 15,35 µl</p>	<p>96 °C 30 seg 60 °C 30 seg 72 °C 30 seg</p>	35	179
PRM2	<p><i>Forward (F):</i> TATAGGCGCAGACA CTGC</p> <p><i>Reverse (R):</i> GCCTTCTGCATGTT CTCT</p>	<p>cDNA: 1µl Tampó 10x: 2,5 µl dNTPs: 4 µl Encebador F: 0,5 µl Encebador R: 0,5 µl Taq (Roche): 0,1 µl Aigua: 15,4 µl</p>	<p>96 °C 30 seg 56 °C 30 seg 72 °C 60 seg</p>	35	149

Figura 3.4. Confirmació de la purificació de les mostres mitjançant extracció i RT-PCR de RNA de CD45. L'absència de cDNA de CD45 en la mostra de semen (S) verifica que s'ha realitzat una correcta purificació. C+ correspon a un control positiu constituït per una mostra d'espermatozoides amb 1×10^6 de leucòcits/ml. En paral·lel s'ha dut a terme una RT-PCR pel gen PRM2 per verificar la qualitat del RNA extret.



3.3. Estudi de les proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide humà

Tal i com s'ha comentat a la introducció (Veure Secció 1.2.3.), les protamines no es poden analitzar mitjançant extraccions proteiques convencionals ja que la seva elevada càrrega positiva fa que es requereixi de tractaments àcids exhaustius. A més a més, les característiques fisicoquímiques de les protamines provoquen la seva precipitació en gels convencionals d' SDS causant que no es puguin resoldre amb aquesta tècnica. Per aquests motius, i amb l'objectiu de poder estudiar específicament el contingut de protamines i altres proteïnes bàsiques de l'espermatozoide, s'han realitzat extraccions i electroforesis àcides, les condicions de les quals es descriuen a continuació.

3.3.1. Extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide humà

L'extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide s'ha dut a terme seguint el procediment establert pel nostre grup al 1993 (de Yebra and Oliva, 1993; de Yebra *et al.*, 1993) i adaptat més endavant (Mengual *et al.*, 2003; Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2009), amb algunes modificacions afegides. Els passos següents van ser els següents (si no es diu el contrari, totes les solucions necessàries es van usar en fresc):

- Partir d'una alíquota de 10×10^6 espermatozoides per a cada mostra, la qual ha d'haver sigut prèviament rentada de plasma seminal i cèl·lules contaminants. Es pot partir de mostres congelades que han estat conservades a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Veure secció 3.1. de Material i Mètodes).
- Realitzar un rentat addicional afegint a cada mostra el volum de Ham F10 1x- NaHCO_3 2% necessari per tal d'arribar a un volum de 300-500 μl i centrifugar a 8940 *g* durant 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Descartar el sobrenedant.

NOTA: Aquest pas es pot repetir tantes vegades com sigui necessari.

- Rentar el sediment amb 200 μl d'una solució de permeabilització constituïda per Tritó X-100 0,5%, Tris (pH 8) 20 mM i MgCl_2 2 mM. Centrifugar a 8940 *g* durant 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i descartar el sobrenedant amb la pipeta.

NOTA: En aquest pas es produeix la desestabilització de la membrana dels espermatozoides.

Per preparar 1ml de Solució de Permeabilització:

20 μl Tris (pH 8) 1 M (solució preparada amb Tris, USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA)

4 μl MgCl_2 0,5 M (solució preparada amb MgCl_2 , Merck, Darmstadt, Alemanya)

5 μl Tritó X-100 (Sigma-Aldrich)

971 μl Aigua miliQ

3. Material i mètodes

- Resuspendre el sediment en 143 µl d'una solució constituïda per PMSF 1mM. Centrifugar a 8940 g durant 5 min a 4 °C i descartar el sobrenedant amb la pipeta.
NOTA: Es produeix un xoc osmòtic que provoca el trencament de les cèl·lules espermàtiques. El PMSF és un inhibidor de proteases que evitarà la degradació de les proteïnes.

Per preparar 1ml de Solució de PMSF 1mM:

10 µl PMSF 100 mM (solució preparada amb PMSF, Sigma-Aldrich, diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)
990 µl Aigua miliQ

- Resuspendre el sediment en 36 µl d'una solució formada per EDTA 20 mM, PMSF 1 mM i Tris HCl (pH 8) 100 mM. Mesclar bé amb la pipeta.

Per preparar 1ml de Solució d'EDTA 20 mM:

40 µl EDTA 0,5 M (solució preparada amb EDTA, Merck KGaA)
10 µl PMSF 100 mM
100 µl Tris (pH 8) 1M
850 µl Aigua miliQ

- Afegir a la suspensió obtinguda al pas anterior un volum d'una solució formada per GuHCl 6 M i DTT 575 mM. Mesclar bé amb cops secs i sense utilitzar la pipeta.
NOTA: Es provoca la desnaturalització del DNA i el trencament de ponts disulfur. Per aquest motiu la solució es torna densa i viscosa.

Per preparar 0,5 ml de Solució desnaturalitzant:

0,04435 g DTT (Sigma-Aldrich)
Quantitat suficient de GuHCl 6 M per arribar a 0,5 ml (solució preparada amb GuHCl, Sigma-Aldrich)

- Aturar la reacció de desnaturalització afegint 5 volums d'etanol absolut conservat a -20 °C. Barrejar molt bé per inversió i utilitzant el vòrtex.
NOTA: s'observa l'aparició d'un filament blanquinós que correspon al DNA.
- Incubar la mostra a -20 °C per un mínim de 15 min.
NOTA: El protocol es pot aturar en aquest pas conservant la mostra a -20 °C durant un període llarg de temps.
- Centrifugar a 12880 g durant 15 minuts a 4 °C. Descartar el sobrenedant per decantació.
NOTA: utilitzar un paper absorbent per recollir les restes de sobrenedant que poden quedar a la vora del tub.
- Afegir 360 µl de HCl 0,5 M (solució preparada a partir de HCl fumant 37%, Merck KGaA) i barrejar amb vòrtex. Incubar les mostres durant 5 min a 37 °C. Barrejar amb

vòrtex i tornar a incubar durant 2 min a 37 °C. Centrifugar a 17530 g durant 10 min a 4 °C.

NOTA: Amb el tractament àcid s'alliberen les proteïnes bàsiques que es trobaven unides al DNA.

- Guardar el sobrenedant (amb les proteïnes dissoltes) en un tub nou pre-refredat i amb 89,3 µl d'àcid tricloracètic (TCA) 100% (p/v) (Preparat amb TCA, Merck KGaA), per tal d'obtenir una concentració final de TCA de 20% (v/v).

NOTA: El sediment correspon al DNA, el qual estarà altament degradat. Tot i així, conservar el sediment amb 500 µl d'àcid percloracètic (PCA) 0,5 N a 4 °C per tal de fer-lo servir més endavant (Veure secció 3.3.5. de Material i Mètodes)

- Incubar els tubs durant 10 min a 4 °C i agitant els tubs per inversió cada pocs minuts. Centrifugar a 17530 g durant 10 min a 4°C i descartar el sobrenedant per decantació utilitzant un paper absorbent.

NOTA: el tractament amb TCA 20% donarà lloc a la precipitació de les proteïnes.

- Sota la campana, afegir 500 µl d'una solució formada per β-mercaptoetanol 1% diluït en acetona i rentar les parets del tub amb cura. Centrifugar a 17530 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant per decantació.

NOTA: Les proteïnes es troben precipitades per les parets del tub i amb l'acetona es va recollint i diluint les proteïnes. El β-mercaptoetanol és un agent reductor que provoca el trencament addicional de ponts disulfur.

Per preparar 10 ml de Solució de β-mercaptoetanol 1%-acetona:

100 µl β-mercaptoetanol

Quantitat suficient d'acetona (Merck KGaA) per arribar a 10 ml

- Repetir el pas anterior una vegada més.
- Assecar el sediment de proteïnes bàsiques amb l'*speed-vacuum* durant 5-10 min.
NOTA: una vegada s'obté el sediment de proteïnes sec, les mostres es poden conservar a -20 °C directament o bé ja diluïdes en tampó de mostra àcid (veure pas següent).
- Diluir les proteïnes obtingudes en 14,3 µl del tampó de mostra àcid òptim per a dur a terme l'electroforesi àcida (Veure secció 3.3.2. de Material i Mètodes). Conservar a -20 °C.

Per preparar 1 ml de Tampó de mostra àcid:

0,330 g Urea (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hercules, California, USA)

200 µl β-mercaptoetanol

50 µl Àcid acètic glacial (Merck KGaA)

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 1 ml

3.3.2. Electroforesi àcida

Tal i com s'ha comentat anteriorment, les protamines no es poden resoldre en electroforesis d' SDS convencionals. Per aquest motiu, per tal de poder visualitzar-les, s'ha de dur a terme una electroforesi àcida, la qual separarà les proteïnes per càrrega. El procediment es pot dividir en 4 parts: preparació del gel àcid de poliacrilamida i urea, pre-electroforesi, electroforesi i tinció del gel.

I. Preparació del gel àcid de poliacrilamida i urea:

- Preparar la solució al moment seguint el següent ordre:

Per preparar 15 ml de solució (suficient per 2 gels):

2,25 g Urea

771 µl Àcid acètic glacial

7,5 ml Acrilamida 30% (p/v) - Bisacrilamida 0,2% (p/v) *

2-3 ml Aigua mili Q

* Solució preparada amb acrilamida (Sigma-Aldrich) i bis acrilamida (Sigma-Aldrich), filtrada i degassificada durant 3 hores.

- Agitar fins que la solució es torni transparent i afegir la quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 15 ml.
- Degassificar la solució durant 30-40 min.
- Afegir els agents gelificants a la solució anterior poc a poc i sense bombolles.

Agents gelificants:

80 µl TEMED (GE Healthcare, Life Sciences, Uppsala, Suècia)

800 µl persulfat amònic (PSA) 10% (p/v) (Preparat amb PSA, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanya, i diluït en aigua miliQ)

- Posar la solució del gel amb cura i sense fer bombolles entre dos vidres que han estat prèviament rentats amb etanol. Col·locar immediatament una pinta amb 15 pouets, amb cura i sense fer bombolles.
- Deixar gelificar la solució durant mínim 1 hora.
- Treure la pinta i rentar els pouets amb aigua destil·lada sota l'aixeta.

II. Pre-electroforesi:

La pre-electroforesi és duu a terme per tal d'assegurar una correcta eliminació d'ions que puguin alterar el desenvolupament correcte de l'electroforesi.

- Posar els vidres amb els gels en el suport específic del sistema d'electroforesi vertical del que es disposa.

- Omplir la cubeta d'electroforesi amb el tampó d'electroforesi d'àcid acètic 0,9 N.

Per preparar 2,5 L de tampó d'electroforesi d'àcid acètic 0,9 N:

128,43 ml Àcid acètic (Panreac Applichem, Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, Espanya)

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 2,5 L

- Connectar els elèctrodes amb la font d'electroforesi de forma invertida (vermell amb negre i negre amb vermell).

NOTA: la col·locació dels elèctrodes de manera invertida és molt important per la correcta migració dels ions i de les proteïnes.

- Iniciar la pre-electroforesi a 150 V durant 1 hora i 30 min.

NOTA: Durant la pre-electroforesi l'amperatge anirà canviant. En primer lloc pujarà fins a un màxim, a partir del qual disminuirà fins tornar-se constant. En aquest punt és quan es pot assegurar la correcta eliminació dels ions.

III. Electroforesi:

- Descartar el tampó d'electroforesi utilitzat a la pre-electroforesi.
- Posar els vidres amb els gels en el suport específic del sistema d'electroforesi vertical del que es disposa i introduir-ho a la cubeta.
- Omplir la cubeta amb tampó d'electroforesi nou.
- Rentar els pouets dels gels amb l'ajuda d'una xeringa i tampó d'electroforesi per tal d'eliminar urea que ha pogut quedar precipitada.
- Carregar 2,5 µl de mostra diluïda en tampó de mostra àcid (Veure secció 3.3.1. de Material i Mètodes).
NOTA: Reservar 4 pouets a cada gel per tal de carregar 4 quantitats conegudes d'estàndard de protamines (Veure secció 3.3.3. de Material i Mètodes), el qual serà necessari per quantificar (Veure secció 3.3.4. de Material i Mètodes).
- Carregar en el primer i últim pou de cada gel 2,5 µl de verd de metil diluït en tampó de mostra àcid, per tal de poder seguir el progrés de l'electroforesi.
- Iniciar l'electroforesi a 150 V amb els elèctrodes connectats a la font de forma invertida.
- Aturar l'electroforesi quan la banda blava corresponent al verd de metil arribi a les 3 quartes parts del gel (aproximadament 55 min).

IV. Tinció del gel amb EZBlue™:

Els gels de poliacrilamida àcids van ser tenyits amb EZBlue™ *Gel Staining Reagent* (Sigma-Aldrich), el qual conté *Comassie Brilliant Blue G-250* i permet una detecció ultra sensible de proteïnes en gels de poliacrilamida i membranes de nitrocel·lulosa o PVDF. Entre les avantatges que presenta l'ús d'aquest agent, en comparació amb altres tincions també basades en *Comassie*, s'inclouen l'obtenció de menys *background*, una durada de tinció menor i la no necessitat de fer un pas de decoloració. El procediment de tinció es va fer seguint les recomanacions del fabricant:

- Fixar les proteïnes amb una solució formada per metanol (Panreac) 50% i àcid acètic glacial (Panreac) 10% durant un mínim de 15 min en agitació i temperatura ambient.
- Rehidratar el gel amb aigua miliQ durant 15 min en agitació i temperatura ambient.
- Tenyir el gel amb EZBlue™ durant un mínim d'1 h en agitació i temperatura ambient.
- Deixar el gel amb aigua miliQ durant tota la nit (O/N) per assegurar la correcta eliminació del *background* (excés de colorant).

3.3.3. Preparació d'un estàndard de protamines humanes

La preparació d'un estàndard de protamines purificades de concentració coneguda s'ha realitzat amb 2 objectius:

- 1) Incorporar-lo en els gels de poliacrilamida i urea àcids per tal de tenir un control intern que ens permeti quantificar, per extrapolació, els µg de protamina 1 i protamina 2 extrets de cadascuna de les mostres analitzades. Això és degut a que els mètodes convencionals de quantificació de proteïnes (per exemple Bradford, veure Secció 3.5.2. de Material i mètodes) no permeten obtenir una quantificació fiable de les protamines.
- 2) Obtenir un extracte nuclear enriquit en protamines humanes per tal d'analitzar la seva composició amb espectrometria de masses i detectar possibles modificacions post-traduccionals presents (Veure Secció 3.3.6. de Material i mètodes).

L'estàndard de protamines humanes s'ha elaborat seguint el protocol establert amb anterioritat en el nostre grup (Mengual *et al.*, 2003) i descrit a la tesi de la Dra. Lourdes Mengual, amb alguna modificació. El procediment detallat que es va seguir va ser el següent:

I. Preparació d'un *pool* de mostres:

Es va preparar un *pool* format per 13 mostres d'espermatozoides prèviament rentades, per tal d'extreure el plasma seminal, i conservades en presència de Ham F10 1x – Glicerol 7% a -20 °C (Veure secció 3.1. de Material i Mètodes).

Per mantenir la homogeneïtat del *pool* i obtenir un estàndard representatiu, es van utilitzar només mostres normozoospèrmiques, les quals presentaven una concentració mitja de $88,6 \times 10^6$ espermatozoides/ml (rang $34,2 - 187,7 \times 10^6$ espermatozoides/ml), volum mig de 3,78 ml (rang 1,3 – 6,5 ml) i una velocitat progressiva ràpida mitja de 76,4 % (rang 57,4 – 87,4). La quantitat total d'espermatozoides present al *pool* va ser de $2999,76 \times 10^6$ espermatozoides (Taula 3.2).

Les mostres van ser descongelades individualment i centrifugades a 3000 g durant 10 min a 4 °C. Després van ser resuspeses en 500 µl de Ham F10 1x- NaHCO₃ 2% i ajuntades en un tub de 15 ml. Del *pool* preparat es va extreure una alíquota corresponent a uns 10 milions d'espermatozoides, per tal de realitzar una extracció de protamines convencional, paral·lelament a la preparació de l'estàndard, seguint el procediment descrit a la secció 3.3.1. i així poder utilitzar-lo com a control en la validació de l'estàndard que es farà més endavant (Veure apartat *Visualització i comprovació de l'estàndard en gels de poliacrilamida àcids* d'aquesta secció; Figura 3.5).

Taula 3.2. Resum de mostres i característiques seminals utilitzades com a material de partida per realitzar l'estàndard de protamines.

Mostra	Conc. x 10 ⁶ /ml	Vol. ml	Mob. A %	Mob. B %	Mob. C %	Mob. progressiva (A + B) %	Espermato- zoides emprats per fer l'estàndard x 10 ⁶	Espermato- zoides totals de l'estàndard x 10 ⁶
4276	58,1	3,6	36,1	35,8	15,5	71,9	209,16	
4294	101,5	5,4	26,1	54,4	11,7	80,5	274,05	
4323	187,7	3,0	26,9	60,6	10,0	87,5	281,55	
4328	58,3	4,0	30,5	43,8	13,3	74,3	233,2	
4870	126,0	1,7	33,8	47,6	14,2	81,4	214,2	
4872	155,9	1,3	25,8	53,7	17,5	79,5	202,67	
5182	172,9	1,6	32,4	53,4	12,4	85,8	276,64	2999,76
5186	43,4	5,0	30,8	26,6	19,0	57,4	217	
5189	50,0	5,0	57,5	29,9	7,8	87,4	250	
5228	46,3	4,5	42,1	32,6	17,7	74,7	208,35	
5252	74,4	2,7	28,2	40,1	23,0	68,3	200,88	
5296	43,7	4,8	25,2	37,0	12,2	62,2	209,76	
5323	34,2	6,5	39,8	43,1	5,2	82,9	222,3	
Promig	88,6	3,8	33,5	43,0	13,8	76,4		

3. Material i mètodes

II. Extracció i purificació de protamines:

- Centrifugar el tub amb el *pool* de mostres d'espermatozoides normozoospèrmics a 800 g durant 10 min a 4°C. Descartar el sobrenedant.
- Rentar el sediment amb 3750 µl d'una solució que conté MgCl₂ 3 mM, PMSF 1mM i Tritó X-100 0,25%. Separar la suspensió en dos tubs de 15 ml (1875 µl/tub) i centrifugar a 800 g durant 10 min a 4 °C. Descartar els sobrenedants. Repetir el rentat un cop més.

Per preparar 5ml de solució de MgCl₂ 3 mM, PMSF 1mM i Tritó X-100 0,25%:

30 µl MgCl₂ 0,5M

50 µl PMSF 100 mM (diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)

12,5 µl Tritó X-100

4907,5 µl Aigua mili Q

- Resuspendre el sediment en 4690 µl/tub de HCl 0,5 M. Agitar amb vòrtex i incubar a 37 °C durant 10 min. Centrifugar a 2000 g durant 20 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant. Repetir aquest tractament dues vegades més.

NOTA: El sobrenedant obtingut després de realitzar aquest tractament àcid es trobarà format per les proteïnes bàsiques presents a la mostra (diferents a les protamines) diluïdes en HCl. Degut a que aquest tractament àcid es duu a terme sense un previ trencament de ponts disulfur (no s'ha utilitzat cap agent reductor), no es donarà lloc a l'extracció de les protamines i els seus precursors, els quals romandran en el sediment. Per tal de comprovar la correcta eliminació de proteïnes bàsiques diferents a les protamines de la mostra, es conservarà una alíquota del sobrenedant obtingut en aquest pas, que es processarà i es visualitzarà més endavant en el gel àcid de poliacrilamida i urea (Figura 3.5).

- Resuspendre les cèl·lules recollides en el sediment en 375 µl/tub d'una solució formada per EDTA 20 mM, PMSF 1 mM i Tris-HCl 100 mM (pH 8). Dividir el material de cada tub en dos tubs de 2 ml, per tal de poder centrifugar a velocitats elevades. Per tant, a partir d'ara es té 4 tubs de 2 ml amb 187,5 µl de solució a cadascun.

NOTA: en aquest punt és molt important controlar el pH de la mostra, el qual ha de ser pH8. Si la mostra no té aquest pH, s'ha de centrifugar a 8940 g durant 5 min a 4 °C i repetir aquest pas tantes vegades com sigui necessari fins que es basifiqui. Una vegada s'obtingui la solució a pH8, es pot continuar sense centrifugar amb el pas següent.

Per preparar 1ml de solució de EDTA 20 mM:

40 µl EDTA 0,5 M

10 µl PMSF 100 mM (diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)

100 µl Tris-HCl 1 M (pH8)

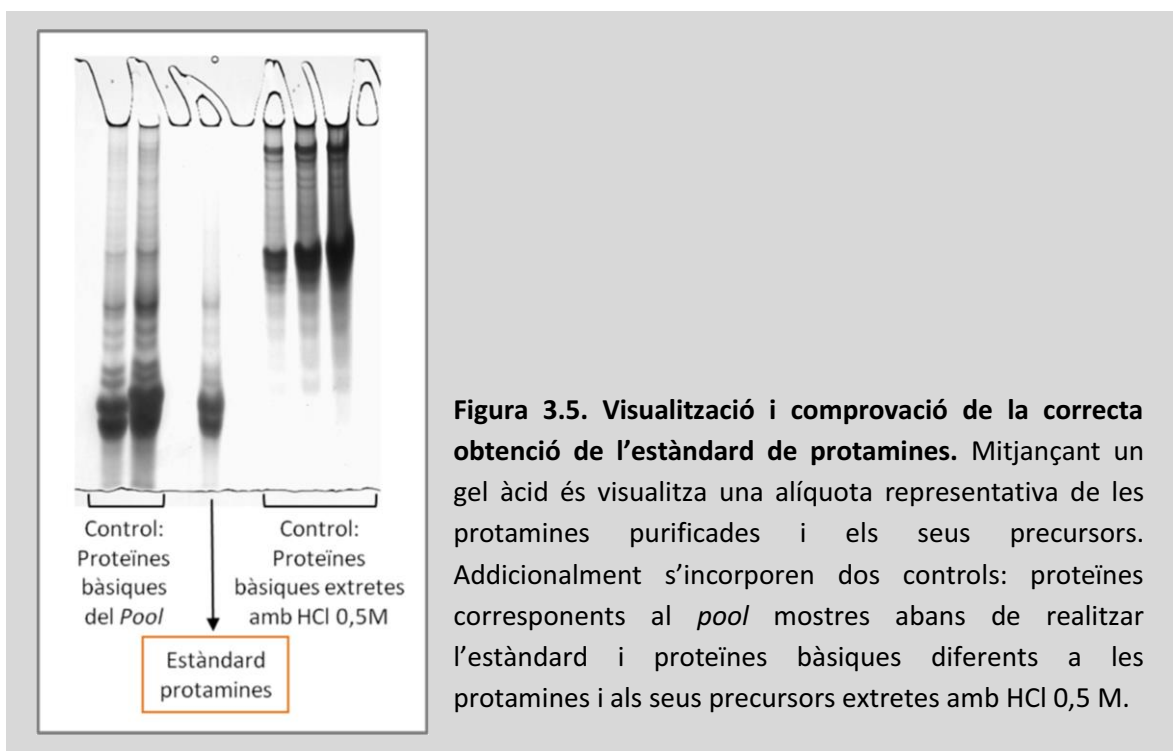
850 µl Aigua mili Q

- Procedir igual que al protocol d'Extracció de proteïnes bàsiques de l'espermatozoide humana (Veure secció 3.3.1 de Material i Mètodes) a partir de la incorporació de la solució desnaturalitzant formada per GuHCl 6 M i DTT 575 mM, ajustant en tot moment els volums de forma proporcional a la quantitat total d'espermatozoides amb la qual s'està treballant. Conservar la mostra en forma de proteïna seca (tal i com s'obté després de l'*Speed-vacuum*) per fer la quantificació, i diluir només una part representativa en tampó de mostra àcid per tal de comprovar la qualitat de l'estàndard en un gel àcid de poliacrilamida i urea.

III. Visualització i comprovació de l'estàndard en gels àcids de poliacrilamida i urea:

Comprovar la correcta obtenció de l'estàndard de protamines d'espermatozoides normozoospermics mitjançant la seva visualització en un gel àcid de poliacrilamida i urea (Veure secció 3.3.2. de Material i Mètodes). Incorporar al gel dos controls per confirmar la puresa de l'estàndard obtingut (Figura 3.5):

- 1) Les proteïnes corresponents a l'alíquota extreta inicialment del *pool* de mostres (obtingudes seguint el procediment indicat a la secció 3.3.1. de Material i Mètodes). Aquest control mostrarà totes les proteïnes bàsiques presents als espermatozoides constituents del *pool*, abans de dur a terme la purificació de protamines.
- 2) Les proteïnes corresponents a l'alíquota extreta del sobrenedant obtingut després del primer tractament amb HCl 0.5 M (obtingudes a partir de la precipitació amb TCA 20% i els passos posteriors indicats a la secció 3.3.1. de Material i Mètodes). Aquest control mostrarà totes les proteïnes bàsiques diferents a les protamines i els seus precursors que s'han eliminat durant la purificació.



IV. Quantificació d'aminoàcids:

Per tal d'estimar la quantitat total de protamina 1 i protamina 2 purificades presents a l'estàndard preparat, es va requerir dels serveis de la Unitat de Tècniques Separatives i Síntesi de Pèptids dels Centres Científics i Tecnològics de la UB (CCiTUB). Aquest servei va dur a terme una quantificació d'aminoàcids totals d'una alíquota representativa de l'estàndard amb el mètode AccQTag Waters, després d'hidrolitzar les proteïnes amb HCl.

Una vegada obtinguts els resultats de la quantificació per part dels CCiTUB, part de l'estàndard es va mantenir en forma de proteïna seca (amb l'objectiu d'analitzar-lo per MS, veure Secció 3.3.6. de Material i Mètodes) i part es va dissoldre en tampó de mostra àcid obtenint dues concentracions diferents de protamina total: 0,145µg/µl i 0,725µg/µl, per ser incorporats a les electroforesis àcides (Veure Secció 3.3.2. de Material i Mètodes).

3.3.4. Quantificació del contingut de protamines i càlcul de la relació P1/P2

La determinació de la quantitat de protamines present en cadascuna de les mostres analitzades es va dur a terme mitjançant la determinació de la densitat òptica de les bandes dels gels àcids de poliacrilamida amb el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories Ltd, USA). El procediment seguit va ser el següent:

- Escanejar els gels de poliacrilamida àcids tenyits amb EzBlue™ amb un escàner GS-800 (Bio-Rad Laboratories Ltd).
- Obrir la imatge del gel amb el programa Quantity One i ajustar-la fins que quedi vertical i recta.
- Amb la eina *Volume Rect Tool* establir una àrea de requadre vàlida per a totes les bandes a quantificar. Reproduir el requadre tantes vegades com sigui necessari per tal de tenir un requadre per a cada banda de P1 i de P2 de cada mostra problema i estàndard. Col·locar el requadre en cada banda de manera que la englobi.
- Reproduir un requadre de la mateixa mida de l'anterior per a cada línia del gel per tal de quantificar la densitat òptica del *background* per a cada mostra problema i estàndard.
- Seleccionar la opció *Volume Analysis Report* per tal d'exportar les quantificacions de les àrees. Obrir les dades com un arxiu Excel.
- Calcular la densitat òptica per a cadascuna de les bandes de P1 i P2 de cada mostra utilitzant el valor *Density OD/mm²* i restant la densitat del seu *background*.

- Amb la densitat òptica obtinguda pels estàndards incorporats a cadascun dels gels (Veure Seccions 3.3.2 i 3.3.3. de Material i Mètodes) i la quantitat de P1 i P2 coneguda per a cadascun d'ells, elaborar una recta de regressió que serveixi per extrapolar les densitats òptiques de les mostres problema (Figura 3.6).

NOTA: es considera correcta la recta de regressió si presenta un valor d' $R^2 > 0,96$.

- Calcular les quantitats de P1 i P2 (en μg) de cadascuna de les mostres problema carregades al gel. Extrapolar a la quantitat total de protamines extretes en el procediment, per tal d'obtenir la quantitat total (en μg) de P1, P2 i protamina total (P1+P2) presents en els 10×10^6 espermatozoides utilitzats en l'extracció de protamines (Veure Secció 3.3.1. de Material i Mètodes). Utilitzar aquests valors per calcular les relacions P1/P2 i les relacions Protamina/DNA (Veure Secció 3.3.5. de Material i Mètodes).

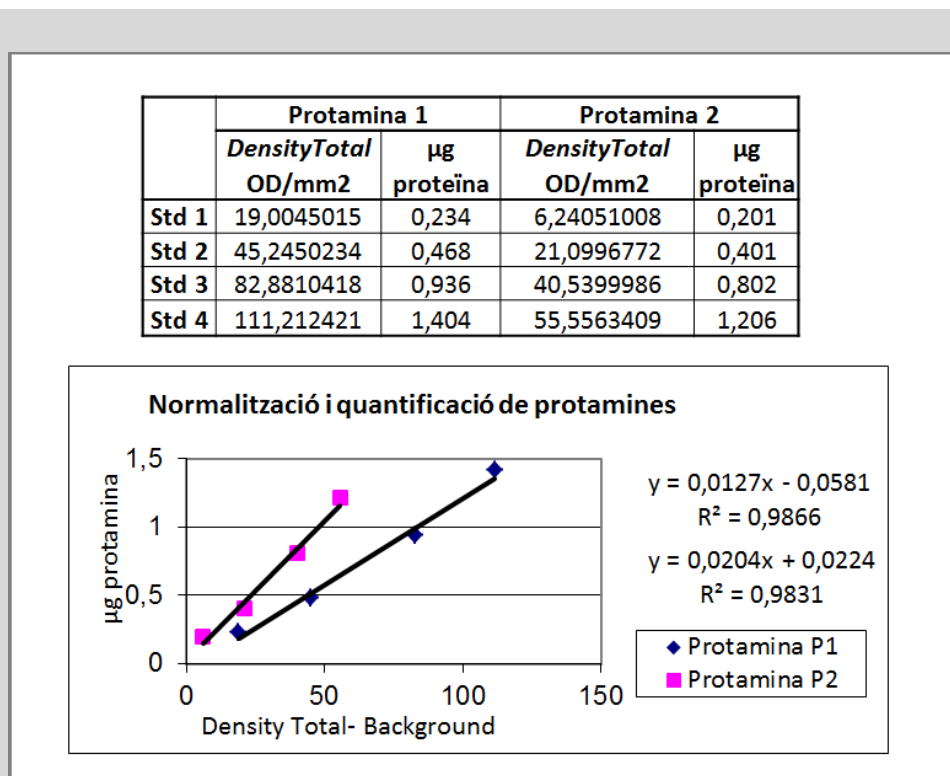


Figura 3.6. Quantificació de protamines mitjançant la determinació de la densitat òptica de les bandes de l'estàndard de protamines. En cada gel àcid es van incorporar 4 quantitats conegudes de l'estàndard de protamines i es van mesurar la densitat òptica de les bandes (part superior de la figura). D'aquesta manera, es va elaborar una recta de regressió que va permetre extrapolar les densitats òptiques de les mostres problemes i quantificar P1 i P2 (part inferior de la figura).

3.3.5. Hidròlisi i quantificació del DNA procedent de l'extracció de proteïnes bàsiques d'espermatozoides i càlcul de les relacions Protamina/DNA

El sediment corresponent al DNA obtingut durant l'extracció de proteïnes bàsiques de l'espermatzoide (Veure Secció 3.3.1. de Material i Mètodes), tot i estar altament degradat, es va fer servir per tal de quantificar-lo i calcular les relacions P1/DNA, P2 DNA i protamina total (P1+P2)/DNA. Aquestes relacions, a diferència de la relació P1/P2, permetran la comparació de la quantitat de P1 i P2 de forma independent i conjunta entre les diferents mostres analitzades.

Per tal de fer la quantificació del DNA, primer s'ha de dur a terme una hidròlisi. Tots els passos que es van seguir estan detallats a continuació:

- Agafar els tubs amb el DNA obtingut durant l'extracció de proteïnes nuclears bàsiques (Veure Secció 3.3.1. de Material i Mètodes) i que es troba conservat a la nevera en 500 µl de PCA 0,5 N (preparat a partir de PCA, Merck KGaA) i centrifugar a 17530 g durant 5 min a 4 °C. Descartar sobrenedant.
NOTA: incloure un tub nou amb 500 µl de PCA 0,5 N amb el qual es faran tots els passos i que ens servirà de blanc en la quantificació per lectura d'absorbància.
- Afegir a cada tub 500 µl de PCA 0,5 N i fer vòrtex.
NOTA: Els sediments de DNA no s'han de dissoldre.
- Realitzar la hidròlisi del DNA mitjançant la incubació dels tubs en el bany a 90 °C durant 20 min i amb agitació suau. Invertir els tubs cada 5 min.
- Posar els tubs ràpidament en gel i centrifugar a 4420 g durant 10 min a 4 °C.
- Traspasar els sobrenedants a tubs nous tenint cura de no agafar sediment. Tenir constància del volum de sobrenedant recuperat per cada mostra.
- Quantificar el DNA de cada mostra mitjançant la lectura de l'absorbància a 260 nm. Calcular la concentració de DNA multiplicant l'Absorbància obtinguda per la constant de 38 ng/µl (obtinguda a la tesi del Dr. Rafael Oliva; <http://hdl.handle.net/10803/1144>).
- Calcular la quantitat total de DNA en µg tenint en compte el volum de sobrenedant obtingut després de la hidròlisi.
- Calcular les relacions P1/DNA, P2/DNA i (P1+P2)/DNA a partir dels µg totals obtinguts en aquesta secció i en la secció 3.3.4. de Material i Mètodes.

3.3.6. Identificació de modificacions post-traduccionals de protamines mitjançant espectrometria de masses

La identificació de PTMs de protamines mitjançant espectrometria de masses es va dur a terme a partir d'un extracte proteic de protamines purificades (Veure Secció 3.3.3 de Material i mètodes) el qual va ser introduït a l'aparell de MS sense digestió prèvia. Les proteïnes van ser sotmeses a una cromatografia líquida, seguidament es van ionitzar i analitzar per calcular la relació m/z de cadascun dels components detectats (Veure Secció 1.4.1. de la Introducció i 3.5.5. de Material i Mètodes. Una vegada obtinguts els espectres i les relacions m/z experimentals amb $z=1$, es va procedir de la següent manera:

- Comparar les masses experimentals amb els pesos moleculars teòrics de la protamina 1 i de tots els components, madurs i immadurs, de la família de la protamina 2, segons la informació continguda a la base de dades disponible de forma gratuïta a Internet UniProt KB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>) de l'ExPASy. Donar una associació com positiva si l'error es < 200 ppm.
- Calcular la incorporació de massa obtinguda en cada pic del cromatograma a partir de la diferència de D_a entre les masses experimentals i les masses teòriques de la Protamina 1 i dels components de la Protamina 2.
- Relacionar les incorporacions de masses calculades amb les masses de PTMs obtingudes a partir de la base de dades disponible de forma gratuïta a Internet Unimod (http://www.unimod.org/modifications_list.php). Donar una associació com positiva si l'error es < 200 ppm.

3.4. Determinació del dany en el DNA amb l'assaig del Comet alcalí

El dany en el DNA espermàtic va ser avaluat en les mostres dels pacients infèrtils procedents del laboratori d'andrologia de la *Queen's University of Belfast* (Veure Secció 3.1 de Material i Mètodes) i la va realitzar íntegrament el grup d'investigació de la Dra Sheena Lewis, més específicament el seu llavors doctorant Luke Simon. Per tal de proveir informació completa sobre el tractament de les mostres utilitzades en aquesta tesi doctoral, s'ha cregut oportú fer una breu descripció del procediment que es va realitzar per avaluar el dany en el DNA.

Es va utilitzar l'assaig *alkaline single-cell gel electrophoresis* o també anomenat Comet, en la versió alcalina, degut a les avantatges que presenta:

- Té una elevada sensibilitat, presentant valors de DNA danyat que poden variar de 0 a 100%. D'aquesta manera es possible identificar tant un dany extens com mínim.
- Presenta una gran capacitat predictiva en els resultats de les tècniques de reproducció assistida (Simon *et al.*, 2010, 2011b).
- A diferència d'altres tests, es pot dur a terme amb una quantitat petita de cèl·lules.

La fragmentació del DNA espermàtic es va avaluar seguint els procediments publicats amb anterioritat (Hughes *et al.*, 1997; Donnelly *et al.*, 1999) amb algunes modificacions. Les alíquotes corresponents als dos tipus de mostres obtingudes, les *native samples* i *DGC samples* (veure Secció 3.1 de Material i Mètodes), van ser diluïdes amb PureSperm fins arribar a una concentració de 6×10^6 espermatozoides/ml. Els següents passos es van desenvolupar a 18 °C en una cambra amb temperatura controlada i llum groga, per tal d'evitar un dany addicional al DNA.

Els valors de dany en el DNA es van expressar com el percentatge de la cua de DNA danyat observat amb el microscopi.

3.5. Identificació del proteoma nuclear mitjançant espectrometria de masses

L'estratègia seguida per tal d'identificar el proteoma associat als nuclis dels espermatozoides consisteix en la realització d'un subfraccionament de la cèl·lula que ens permetrà enriquir l'abundància relativa de proteïnes minoritàries presents en la nostra mostra.

En aquesta tesi s'ha dut a terme subfraccionament a dos nivells de complexitat:

- 1) Aïllament i purificació de nuclis espermàtics.
- 2) Fraccionament de la cromatina de nuclis espermàtics aïllats i purificats.

En aquest apartat es descriu detalladament els procediments duts a terme per fer els subfraccionaments, l'extracció i visualització de les proteïnes nuclears corresponents, la seva identificació per espectrometria de masses, la interpretació de les dades obtingudes i la validació de les proteïnes caracteritzades mitjançant anticossos.

3.5.1. Aïllament de nuclis d'espermatozoides humans amb CTAB 1%

L'aïllament de nuclis d'espermatozoides humans es va dur a terme a partir de mostres de semen normozoospèrmiques, les quals van ser purificades i utilitzades en fresc (Veure Seccions 3.1. i 3.2. de Material i Mètodes). Es va usar el mètode del CTAB 1% seguint les indicacions publicades amb anterioritat (Wykes and Krawetz, 2003) i descrites també a la tesi doctoral de la Dra. Sara de Mateo (<http://hdl.handle.net/10803/1141>), incloent alguna modificació. El procediment detallat és el següent:

I. Preparació de la mostra:

- Partir d'una mostra d'espermatozoides correctament purificada de la qual s'ha fet un recompte d'espermatozoides. Si la mostra es troba diluïda en PBS o en qualsevol altre medi, centrifugar a 3000 g durant 5 min a 4 °C i descartar sobrenedant.
- Diluir el sediment en 1 ml per cada 100×10^6 espermatozoides d'una solució formada per NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH8) 10 mM, EDTA 1 mM i PMSF 0,1 mM. Centrifugar a 3000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar sobrenedant.

NOTA: Dividir la mostra en tants tubs d'1,5 ml com siguin necessaris per tal de tenir uns 100×10^6 espermatozoides per tub. Portar cada tub a un volum final d'1 ml.

3. Material i mètodes

Per preparar 5 ml de solució de NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH8) 10 mM, EDTA 1 mM i PMSF 0,1 mM:

500 µl NaCl 1M (solució preparada amb NaCl, Merck KGaA)
50 µl Tris-HCl (pH8) 1M
10 µl EDTA 0,5 M
5 µl PMSF 100 mM (diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)
4435 µl Aigua mili Q

II. Decapitació dels espermatozoides:

- Diluir el sediment anterior amb 1 ml/tub d'una solució formada per DTT 10 mM i Tris-HCl pH8 50 mM.

Per preparar 5 ml de solució de DTT 10 mM i Tris-HCl (pH8) 50 mM:

50 µl DTT 1M (solució preparada amb DTT i conservada a -20 °C)
250 µl Tris-HCl (pH8) 1M
4700 µl Aigua mili Q

- Incubar els tubs en gel durant 15 min.
- Afegir a cada tub 0,01 g de CTAB (Sigma-Aldrich) per tal d'arribar a una concentració final de CTAB 1% (p/v).
NOTA: El CTAB és un detergent que és molt difícil de diluir en aigua i no es pot preparar una solució stock més concentrada. En incorporar el CTAB sòlid als tubs veurem que no es dissol completament i que per gravetat va formant un sediment. És important agitar els tubs mecànicament (no amb la pipeta) per assegurar la correcta actuació del CTAB.
- Incubar els tubs en gel durant 30 min. Anar agitant cada cinc minuts. Centrifugar a 3000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant.
NOTA: és molt important anar agitant cada pocs minuts per no permetre la precipitació del CTAB. En el sobrenedant obtingut en aquest pas trobarem les cues que s'han separat dels nuclis dels espermatozoides. Tant aquest sobrenedant com els que s'obtingran en els següents passos es poden conservar a -20 °C per si es volen utilitzar en futurs experiments.

III. Rentats i valoració dels nuclis espermàtics aïllats:

- Diluir el sediment de nuclis d'espermatozoides obtingut en el pas anterior amb 1 ml/tub d'una solució formada per CTAB 1% (p/v), Tris-HCl (pH8) 10 mM i digitonina 0,05% (p/v). Centrifugar a 3000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant (o guardar-lo a -20 °C) i seguir amb el sediment.
NOTA: Agitar bé la solució per formar una suspensió i no permetre la precipitació del CTAB. La digitonina s'incorpora a la solució per evitar l'agregació dels nuclis.

Per preparar 10 ml de solució de CTAB 1%, Tris-HCl (pH8) 10 mM i digitonina 0,05%:

0,1 g CTAB
 100 µl Tris-HCl (pH8) 1 M
 0,005 g digitonina (Sigma-Aldrich)
 9900 µl Aigua mili Q

- Repetir el pas anterior un cop més.
- Diluir el sediment amb 1 ml/tub d'una solució formada per Tris-HCl (pH8) 10 mM, NaCl 100 mM i digitonina 0,05% (p/v). Centrifugar a 3000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant (o guardar-lo) i seguir amb el sediment.

Per preparar 10 ml de solució de Tris-HCl (pH8) 10 mM, NaCl 100 mM i digitonina 0,05%:

100 µl Tris-HCl (pH8) 1 M
 1000 µl NaCl 1 M
 0,005 g digitonina
 8900 µl Aigua mili Q

- Repetir el pas anterior al menys 3 vegades més per tal d'assegurar la correcta eliminació de restes de CTAB que poden quedar als tubs, ja que podrien interferir en anàlisis posteriors.

NOTA: abans de fer l'última centrifugació, observar els nuclis aïllats amb el microscopi òptic i fer recompte dels nuclis obtinguts. S'estima que aquest procediment presenta una eficiència del 99% i una pèrdua d'espermatozoides al voltant del 40% (Figura 3.7).

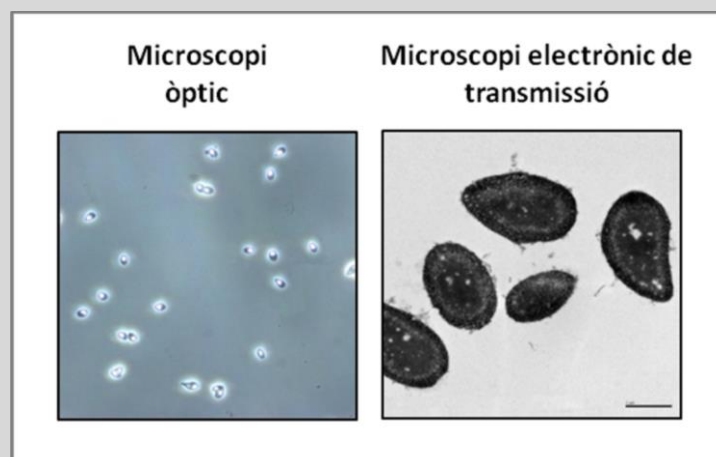


Figura 3.7. Visualització de nuclis d'espermatozoides purificats. A la esquerra es poden observar nuclis d'espermatozoides aïllats mitjançant el mètode del CTAB amb microscopi òptic. A la dreta es mostra la representació dels nuclis amb microscopi electrònic de transmissió. Es pot observar com no hi ha restes de cues, mitocondries o acrosoma. Imatge modificada de (de Mateo *et al.*, 2011) (Annex 8.2).

- Ajuntar els sediments de nuclis d'espermatozoides obtinguts en els diferents tubs en un de sol. Procedir depenent de l'estudi que es vol fer. En cas d'utilitzar el sediment per fer estudi de proteòmica del nucli total amb MS o estudis de *Western Blot*, es procedirà a la lisi dels nuclis i extracció i quantificació de les proteïnes (Veure Secció 3.5.2. de Material i mètodes). En el cas d'utilitzar els nuclis per tal de seguir amb un fraccionament de la cromatina espermàtica, es procedirà al tractament amb NaCl 0.65 M (Veure Secció 3.5.3.1 de Material i Mètodes).

3.5.2. Lisi de nuclis d'espermatozoides, extracció de proteïnes i quantificació

Les mostres de nuclis d'espermatozoides normozoospèrmics destinades a ser visualitzades en gels d' SDS o àcids (Veure Secció 3.3.2. i 3.5.4. de Material i Mètodes) per ser després analitzades per MS (Veure Secció 3.5.5. de Material i Mètodes) o bé per experiments de *Western Blot* (Veure Secció 3.6.1. de Material i Mètodes), van ser primerament sotmeses a una lisi per tal d'alliberar les proteïnes, les quals van ser posteriorment extretes i quantificades. Els procediments seguits es detallen a continuació.

I. Lisi de nuclis d'espermatozoides i extracció de les proteïnes:

Els nuclis purificats d'espermatozoides (Veure Secció 3.5.1. de Material i Mètodes) es lisaran en presència del Medi de Lisi descrit en un treball previ del nostre grup (Martinez-Heredia *et al.*, 2006). Aquest Medi de Lisi està format per Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 1% (p/v) , N-octilglucopiranòxid 1 % (p/v), DTT 18 mM i PMSF 2,4 µM. Es pot preparar una solució *stock* de Medi de Lisi que es pot conservar a -20 °C. Aquesta solució *stock* pot contenir tots els components del Medi de Lisi exceptuant el DTT i el PMSF, els quals s'han d'afegir en el moment de l'ús (ja que es degraden en presència perllongada d'aigua).

Per preparar 10 ml de Solució Stock de Medi de Lisi:

4,2 g Urea
1,52 g Tiourea (Merck KGaA)
0,1 g CHAPS (Bio-Rad Laboratories Ltd)
0,1 g N-octilglucopiranòxid (Sigma-Aldrich)
Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 10 ml

En el moment de l'ús, descongelar la solució *stock* del Medi de Lisi necessària i incorporar el DTT i el PMSF.

Per preparar 1 ml de Medi de Lisi:

958 µl de Solució Stock de Medi de Lisi
18 µl de DTT 1M
24 µl de PMSF 100 mM

Una vegada preparat el Medi de Lisi, procedir de la següent manera:

- Resuspendre els nuclis d'espermatozoides aïllats amb la quantitat suficient de medi de lisi per tal d'obtenir una concentració final aproximadament de $2300-2500 \times 10^6$ nuclis/ml.

NOTA: és important tenir una concentració elevada de nuclis per a que la solució de proteïnes que s'obtingui després de la lisi estigui dintre dels límits de detecció del mètode de quantificació.

- Incubar durant 1 h a temperatura ambient i agitació constant, per permetre la lisi dels nuclis.
- Centrifugar a 3000 g durant 5 min a 4 °C. El sobrenedant contindrà les proteïnes solubles al medi de lisi i el sediment les insolubles (majoritàriament protamines) juntament amb el DNA i restes cel·lulars dels nuclis. Transferir el sobrenedant a un tub nou i guardar les dues fraccions.

NOTA: es poden conservar les dues fraccions de proteïnes directament a -20 °C i continuar els passos següents més endavant. No obstant, es recomana conservar el sediment en solució o processar-lo directament, ja que la resuspensió després de la congelació és difícil.

- Precipitar les proteïnes del sobrenedant afegint la quantitat necessària d'Acetona 100 % freda (conservada a -20 °C) per tal de tenir una concentració final del 80% (v/v). Incubar durant un mínim de 10 min a -20 °C. Centrifugar a 17530 g durant 10 min a 4 °C i descartar el sobrenedant per decantació. Deixar assecar els tubs uns minuts a RT. Diluir les proteïnes (es trobaran per les parets del tub) amb el tampó de mostra adequat per a la electroforesi que es vulgui dur a terme (Veure secció 3.3.2. i 3.5.4. de Material i Mètodes).

NOTA: abans de fer la precipitació amb Acetona 80% freda, separar una alíquota representativa del sobrenedant i precipitar-la a part. Aquesta alíquota s'usarà per fer la quantificació (Veure l'apartat següent "Quantificació de les proteïnes utilitzant el mètode del Bradford").

- Diluir les proteïnes del sediment amb la solució formada per EDTA 20 mM, PMSF 1 mM i Tris-HCl 100 mM (pH8). Procedir igual que al protocol d'Extracció de proteïnes bàsiques de l'espermatzoide humà (Veure Secció 3.3.1 de Material i Mètodes) a partir de la incorporació de la solució desnaturalitzant formada per GuHCl 6 M i DTT 575 mM, per tal de separar el DNA i extreure les proteïnes. Diluir les proteïnes amb el tampó de mostra adequat per a la electroforesi que es vulgui dur a terme (Veure secció 3.3.2. i 3.5.4. de Material i Mètodes).

NOTA: Després del tractament amb HCl 0,5 M (Veure Secció 3.3.1. de Material i Mètodes), separar una alíquota representativa de la mostra, precipitar-la a part amb TCA 20 % i seguir amb el procediment normal. Aquesta alíquota s'usarà per fer

3. Material i mètodes

la quantificació (Veure l'apartat següent "Quantificació de les proteïnes utilitzant el mètode del Bradford").

II. Quantificació de les proteïnes utilitzant el mètode del Bradford:

La quantitat de proteïnes presents al sobrenedant i sediment de la lisi de nuclis espermàtics es va dur a terme amb el producte comercial *Quick Start Bradford Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories Ltd). Es tracta d'una reacció colorimètrica, el procediment de la qual va ser el següent:

- Preparar una sèrie d'estàndards amb diferents concentracions de sèrum d'albumina bovina (BSA, Bio-Rad Laboratories Ltd.) per tal d'elaborar una recta de regressió.
NOTA: La sèrie d'estàndards variarà depenent de la mostra amb la que es treballa. La que es va fer servir per quantificar proteïnes dels nuclis es detalla a la Taula 3.3.

Taula 3.3. Sèrie d'estàndards preparats per la quantificació de proteïnes d'una mostra de nuclis espermàtics.

Estàndard	μl BSA 2 mg/ml	μl Aigua miliQ (fins 40 μl)	μl medi de la mostra (ex: Medi de Lisi o Aigua)	Concentració final de l'estàndard ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	0	40	10	0
2	1,5	38,5	10	0,06
3	2,5	37,5	10	0,1
4	5	35	10	0,2
5	7,5	32,5	10	0,3
6	10	30	10	0,4
7	12,5	27,5	10	0,5

- Diluir la mostra en un volum final de 10 μl de medi i afegir 40 μl d'aigua miliQ. El volum final de les mostres i els estàndards ha de ser 50 μl .
NOTA: el medi en el qual es dilueix la mostra pot ser Medi de Lisi, aigua o qualsevol altre que sigui compatible amb el reactiu Bradford. La llista de compatibilitats dels reactius es troba indicada en les instruccions comercials de l'assaig.
- Afegir a cada mostra i estàndard 950 μl del reactiu Bradford.
NOTA: Treure el reactiu Bradford de la nevera uns minuts abans i deixar a temperatura ambient.
- Esperar 5 min a RT i mesurar l'absorbància amb la opció específica del Bradford que té el NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, Delaware, USA).

- Calcular la quantitat de proteïnes de cada mostra a partir de la recta estàndard i tenint en compte que el volum de la mostra és de 50 µl.

La quantificació exacta d'extractes proteics de nuclis d'espermatozoides és una tasca difícil, degut a les característiques peculiars de les protamines. És necessari poder disposar d'una gran quantitat de proteïna inicial per tal d'obtenir uns valors de quantificació exactes i fiables. Però això no és sempre possible, ja que moltes vegades partim de quantitats limitades de cèl·lules. Per aquest motiu, durant el desenvolupament d'aquesta tesi es va intentar establir la quantitat mitjana de proteïna (tant la soluble en el Medi de Lisi com la insoluble) present en un nucli espermàtic, per tal d'utilitzar aquests valors per realitzar la quantificació de proteïnes nuclears. Es va efectuar la quantificació de proteïnes amb el mètode del Bradford d'una sèrie de mostres abundants en nuclis aïllats i es va calcular el promig. Els valors obtinguts es mostren a la Taula 3.4.

Taula 3.4. Picograms de proteïna / nucli d'espermatozoide normozoospèrmic

Fracció proteïca	Promig Picograms proteïna/nucli espermatozoide normozoospèrmic
Sobrenedant Lisi	0,398
Sediment Lisi	2,203

3.5.3. Fraccionament de la cromatina espermàtica i extracció de proteïnes

Amb l'objectiu d'obtenir dues fraccions diferents de la cromatina espermàtica per tal de ser analitzades per MS, es va realitzar el fraccionament de la cromatina seguint dos mètodes diferents: el mètode del NaCl 0,65 M i el mètode de la Nucleasa Micrococal. En ambdós casos el protocol que es va seguir està basat en una publicacions anteriors (Gardiner-Garden *et al.*, 1998; Zalenskaya *et al.*, 2000; Wykes and Krawetz, 2003; Arpanahi *et al.*, 2009) però adaptant alguns passos i incloent modificacions. Els fraccionaments es van dur a terme en mostres de semen de pacients normozoospèrmics pre-tractades per eliminar la presència de cèl·lules contaminants (Veure Secció 3.2. de Material i Mètodes). Els procediments detallats es troben descrits a continuació, com també a les figures 3.8. (mètode del NaCl 0,65 M) i 3.9. (mètode de la Nucleasa Micrococal).

3.5.3.1. Fraccionament amb NaCl 0,65 M

El tractament salí amb NaCl 0,65 M permet la dissociació de les histones (i altres proteïnes nuclears) del DNA. Els passos següents són els següents (Figura 3.8):

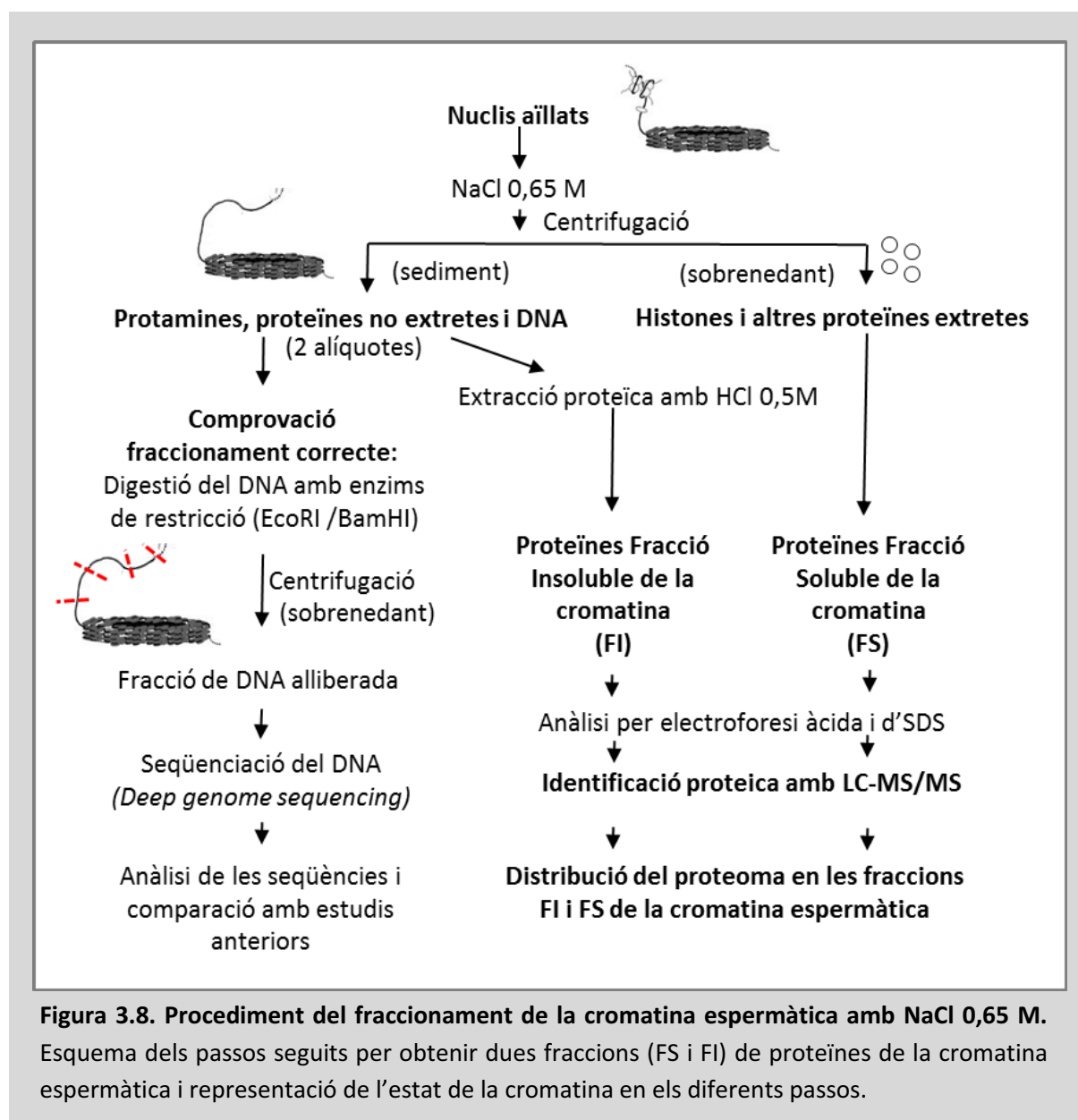


Figura 3.8. Procediment del fraccionament de la cromatina espermàtica amb NaCl 0,65 M. Esquema dels passos seguits per obtenir dues fraccions (FS i FI) de proteïnes de la cromatina espermàtica i representació de l'estat de la cromatina en els diferents passos.

- Partir d'un mínim de 200×10^6 de nuclis aïllats de mostres normozoospèrmiques purificades (Veure Secció 3.5.1. de Material i Mètodes) per tal d'extreure suficient quantitat de proteïna per analitzar-la per MS.
- Dividir la mostra de nuclis aïllats en tants tubs com siguin necessaris per tal de tenir 100×10^6 de nuclis per tub.
- Diluir els nuclis en 1 ml/tub d'una solució formada per NaCl 0,65 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl (pH8) 10 mM, PMSF 0,1 mM i digitonina 0,05% (p/v).

Per preparar 5 ml de solució de NaCl 0,65 M:

3250 µl NaCl 1 M
10 µl EDTA 0,5 M
50 µl Tris-HCl (pH8) 1 M
5 µl de PMSF 100 mM (diluint en isopropanol i conservat a -20 °C)
0,0025 g digitonina
1685 µl Aigua miliQ

- Incubar durant 15 min en gel. Anar agitant els tubs cada pocs minuts.
- Centrifugar a 3000 g durant 2 min a 4 °C. Decantar el sobrenedant en un tub nou. Conservar sobrenedant i sediment.

NOTA: El sobrenedant conté les histones i altres proteïnes extretes amb el tractament salí i forma l'anomenada Fracció Soluble (FS), el sediment, en canvi, conté les protamines i altres proteïnes no extretes amb el tractament salí i forma l'anomenada Fracció Insoluble (FI). Després de la centrifugació és possible que el sediment estigui poc consistent i es mescli amb restes de sobrenedant que queden al tub després de la decantació. En aquests casos, tornar a centrifugar el sediment a 3000 g durant 2 min a 4 °C i treure el sobrenedant amb pipeta i descartar-lo.

- Precipitar les proteïnes presents a la FS (sobrenedant) amb TCA 20% (v/v) i procedir amb els passos posteriors indicats a la secció 3.3.1. *Extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide* de Materials i Mètodes, fins obtenir la proteïna seca. Diluir part de l'extracte proteic obtingut en tampó de mostra àcid per analitzar-lo per electroforesi àcida (Veure Secció 3.3.2. de Material i Mètodes) i part en tampó de mostra d'SDS per analitzar-lo per electroforesi d'SDS (Veure Secció 3.5.4. de Material i Mètodes).
- Precipitar les proteïnes presents a la FI (sediment) amb etanol absolut fred (-20 °C) i procedir amb els passos posteriors indicats a la secció 3.3.1. *Extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide* de Materials i Mètodes, fins obtenir la proteïna seca. Diluir part de l'extracte proteic obtingut en tampó de mostra àcid per analitzar-lo per electroforesi àcida (Veure Secció 3.3.2. de Material i Mètodes) i part en tampó de mostra d'SDS per analitzar-lo per electroforesi d'SDS (Veure Secció 3.5.4. de Material i Mètodes).

NOTA: Per tal de confirmar el correcte fraccionament de la cromatina espermàtica abans de procedir amb l'anàlisi per MS, part d'aquest sediment es va utilitzar per fraccionar el DNA, seqüenciar els gens presents en cadascuna de les fraccions i comparar els resultats amb estudis anteriors (Arpanahi et al., 2009; Hammoud et al., 2009). Aquests resultats es troben a la tesi del Dr. Rubén Azpiazu (Distribució diferencial de gens en la cromatina espermàtica i detecció de proteïnes presents en una abundància alterada en pacients infèrtils. Juny 2014, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona). Resumidament, el procediment es va basar en una

3. Material i mètodes

publicació anterior (Wykes and Krawetz, 2003) i va constar en digerir el sediment amb els enzims de restricció Eco RI i Bam HI (100 U/100 x 10⁶ nuclis de cadascun). El DNA de les dues fraccions resultants es va incubar amb 200 µg/ml de Proteïnasa K (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a 55 °C O/N , i es va extreure amb fenol-cloroform i es va precipitar amb etanol. Seguidament es va procedir a la seqüenciació per Deep Genome Sequencing a la Unitat de Ultraseqüenciació de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Els resultats van ser analitzats per la bioinformàtica Dra. Tanya Vavouri de l'Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer (IMPPC).

3.5.3.2. Fraccionament amb Nucleasa Micrococal

La Nucleasa Micrococal (NM) és un enzim que digereix el DNA, tant de doble cadena com de cadena simple, amb preferència per les regions riques en AU i AT, de manera que permet l'alliberació dels nucleosomes. Els passos següents són els següents (Figura 3.9):

- Partir d'un mínim de 250 x 10⁶ d'espermatozoides de mostres normozoospermiques purificades (Veure Secció 3.2. de Material i Mètodes) per tal d'extreure suficient quantitat de proteïna per analitzar-la per MS.
- Diluir els espermatozoides purificats en 1 ml de PBS complementat amb PMSF 0,5 mM. Centrifugar a 2000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant.

Per preparar 1 ml de solució de PBS-PMSF 0,5 mM:

995 µl PBS

5 µl de PMSF 100 mM (diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)

- Permeabilitzar els espermatozoides diluint el sediment en 1 ml de PBS-Tritó X-100 0,5% (v/v), PMSF 0,5 mM i SDS 1% (v/v). Barrejar amb vòrtex i incubar en gel durant 20 min. Centrifugar a 2000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar el sobrenedant.
NOTA: el sediment obtingut es pot diluir en 1 ml de PBS per tal de controlar la quantitat d'espermatozoides recuperada amb la cambra Makler i el microscopi òptic. El número d'espermatozoides serà important per tal de calcular la quantitat de NM que utilitzarem en la digestió.

Per preparar 1 ml de solució de PBS-Tritó X-100 0,5%, PMSF 0,5 mM i SDS 1%:

990 µl PBS-Tritó X-100 0,5%

5 µl de PMSF 100 mM (diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)

5 µl SDS 20 % (Bio-Rad Laboratories Ltd)

- Diluir el sediment en 1 ml de PBS, PMSF 0,5 mM i DTT 10 mM. Incubar en el bany a 37 °C durant 5 min amb agitació suau. Centrifugar a 2000 g durant 5 min a 4 °C. Descartar sobrenedant i repetir aquest pas dues vegades addicionals.

NOTA: Aquesta incubació és d'utilitat per tal de descartar aquelles proteïnes que s'extreuen per l'acció de la temperatura i que podrien alterar els resultats del nostre experiment. Es pot conservar el sobrenedant obtingut en la primera incubació i visualitzar-lo en un gel d'electroforesi per tal de veure les proteïnes extretes.

Per preparar 1 ml de solució de PBS, PMSF 0,5 mM i DTT 10 mM:

985 µl PBS-Tritó X-100 0,5%

5 µl de PMSF 100 mM (diluït en isopropanol i conservat a -20 °C)

10 µl DTT 1M

- Diluir el sediment en 1 ml de PBS, PMSF 0,5 mM i DTT 10 mM i separar en dos alíquotes de 500 µl. Una de les alíquotes es farà servir com a control de la digestió, per tant, s'incorporaran tots els reactius exceptuant la NM i es faran tots els passos iguals que amb la segona alíquota. Afegir als dos tubs 500 µl de PBS, PMSF 0,5 mM i DTT 10 mM per arribar a un volum final de 1 ml.

NOTA: les proteïnes que siguin extretes del control no correspondran a aquelles proteïnes extretes per l'acció de la NM, per tant, també seran analitzades per MS per tal d'eliminar-les del llistat de proteïnes que s'identifiqui en aquest experiment.

- Incubar els tubs en el bany a 37 °C durant 2 min amb agitació suau. Afegir a cada tub CaCl_2 0,06 mM (31 µl de CaCl_2 20 mM preparat a partir de CaCl_2 , Merck) i 0,07 U NM (Sigma-Aldrich) per cada milió d'espermatozoide que hi hagi al tub (al control posarem el mateix volum d'aigua). Incubar en el bany a 37 °C durant 5 min amb agitació suau.

NOTA: S'incorpora CaCl_2 ja que la NM necessita ions divalents per donar lloc a la reacció.

- Parar la reacció addicionant EDTA 5 mM (10 µl EDTA 0,5 M) als tubs i incubant en el bany a 37 °C durant 5 min amb agitació suau.
- Centrifugar els tubs a 5000 g durant 10 min a 4 °C i decantar el sobrenedant a un tub nou. Conservar sobrenedant i sediment.

NOTA: El sobrenedant conté les histones i altres proteïnes extretes unides al DNA corresponent als nucleosomes i forma l'anomenat Sobrenedant de la NM (Micrococcal Nuclease Supernatant, MNS), el sediment, en canvi, conté les protamines i altres proteïnes no extretes i unides al DNA corresponent als toroides i forma l'anomenat Pellet de la NM (Micrococcal Nuclease Pellet, MNP).

- Extreure les proteïnes presents al MNS (sobrenedant) amb HCl 0,5 M i procedir amb els passos posteriors indicats a la secció 3.3.1. *Extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide* de Materials i Mètodes, fins obtenir la proteïna seca.

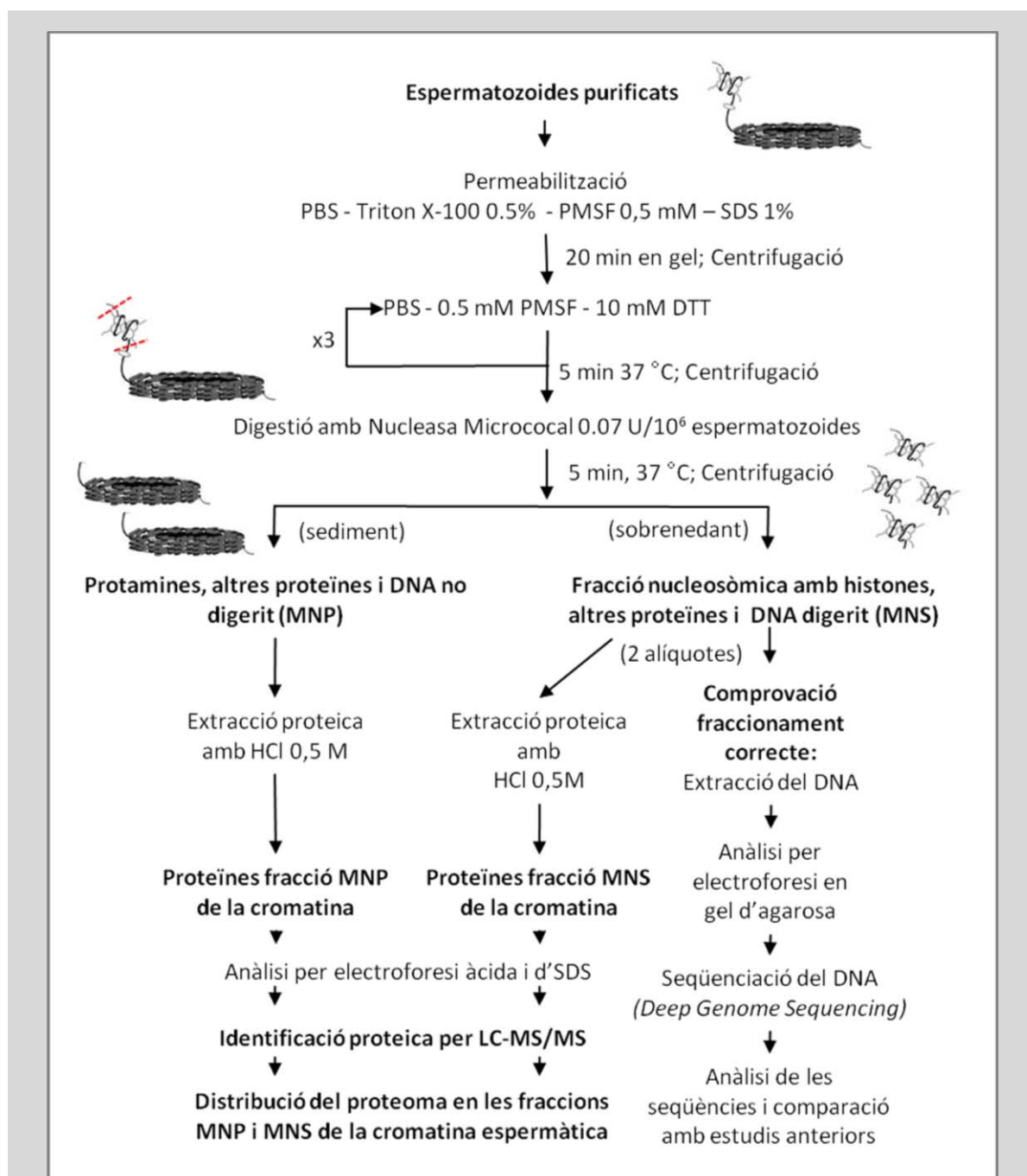


Figura 3.9. Procediment del fraccionament de la cromatina espermàtica amb Nucleasa Micrococcal. Esquema dels passos seguits per obtenir dues fraccions (MNP i MNS) de proteïnes de la cromatina espermàtica i representació de l'estat de la cromatina en els diferents passos.

- Diluir part de l'extracte proteic obtingut en tampó de mostra àcid per analitzar-lo per electroforesi àcida (Veure Secció 3.3.2. de Material i Mètodes) i part en tampó de mostra d' SDS per analitzar-lo per electroforesi d' SDS (Veure Secció 3.5.4. de Material i Mètodes).

NOTA: Per tal de confirmar el correcte fraccionament de la cromatina espermàtica abans de procedir amb l'anàlisi per MS, part d'aquest sobrenedant es va utilitzar per

fraccionar el DNA, seqüenciar els gens presents en cadascuna de les fraccions i comparar els resultats amb estudis anteriors (Arpanahi et al., 2009; Hammoud et al., 2009). Aquests resultats es troben a la tesi del Dr. Rubén Azpiazu (Distribució diferencial de gens en la cromatina espermàtica i detecció de proteïnes presents en una abundància alterada en pacients infèrtils. Juny 2014, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona). Resumidament, el procediment es va basar en una publicació anterior (Nazarov et al., 2008) i va constar en incubar amb 200 µg/ml de Proteinasa K a 55 °C O/N, extreure el DNA amb fenol-cloroform i precipitar-lo amb etanol. El DNA obtingut es va analitzar en electroforesi amb gel d'agarosa 1,5%. Les bandes obtingudes es van tallar i el DNA es va extreure amb Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen GMDH) seguint les indicacions del fabricant. Seguidament es va procedir a la seqüenciació per Deep Genome Sequencing a la Unitat de Ultraseqüenciació de l'IDIBAPS. Els resultats van ser analitzats per la bioinformàtica Dra. Tanya Vavouri de l'IMPPC.

- Extreure les proteïnes presents al MNP (sediment) diluint el sediment en una solució d'EDTA 20 mM, PMSF 1 mM i Tris-HCl 100 mM (pH8) i incorporant un volum de GuHCl 6M – DTT 575 mM, tal i com s'indica a la secció 3.3.1. *Extracció de proteïnes nuclears bàsiques de l'espermatozoide* de Materials i Mètodes. Procedir amb els passos descrits a la secció indicada fins obtenir la proteïna seca. Diluir part de l'extracte proteic obtingut en tampó de mostra àcid per analitzar-lo per electroforesi àcida (Veure Secció 3.3.2. de Material i Mètodes) i part en tampó de mostra d' SDS per analitzar-lo per electroforesi d' SDS (Veure Secció 3.5.4. de Material i Mètodes).

3.5.4. Separació de proteïnes espermàtiques per electroforesi d' SDS

L'electroforesi en gels de poliacrilamida d' SDS o SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis*) és una forma convencional de separació i visualització de proteïnes. El gel necessari consta de dues parts: el gel preparador a la part de dalt, que prepara les proteïnes per a que es separin de forma adequada, i el gel separador a la part de baix, amb un pH superior que permet la separació de les proteïnes segons el pes molecular.

El procediment es detalla a continuació:

I. Preparació del gel:

- Preparar la solució del gel preparador de 12% d'acrilamida en presència de Tris 0,375 M (pH8) i SDS 0,1%. Posar els diferents components en el següent ordre:

Per preparar 15 ml de solució (suficient per 2 gels):

6 ml 30% Acrilamida - Bisacrilamida (29:1) (Bio-Rad)

3,75 ml 1,5M Tris-HCl (pH8) – 0,4% SDS

5,25 ml Aigua mili Q

3. Material i mètodes

- Desgassificar la solució durant 10-15 min.
- Afegir els agents gelificants a la solució anterior poc a poc i sense bombolles.

Agents gelificants:

12,5 µl TEMED

55 µl persulfat amònic (PSA) 10% (p/v)

- Posar la solució del gel preparador amb cura i sense fer bombolles entre dos vidres que han estat prèviament rentats amb etanol. Omplir fins a 0,5 mm per sota del nivell on estarien els pouets.
- Afegir immediatament 2-butanol saturat en aigua a sobre de la solució del gel separador.

NOTA: El 2-butanol permet que el gel s'anivelli a la part de dalt i gelidifiqui de forma recta.

Per preparar 50 ml de 2-butanol saturat en aigua:

25 ml 2-butanol (Merck KGaA)

25 ml Aigua miliQ

- Deixar gelificar la solució durant mínim 1 hora.
- Preparar la solució del gel preparador de 3,9% d'acrilamida en presència de Tris 0,375 M (pH 6,8) i SDS 1%. Posar els diferents components en el següent ordre:

Per preparar 5 ml de solució (suficient per 2 gels):

0,65 ml 30% Acrilamida - Bisacrilamida (29:1) (Bio-Rad Laboratories Ltd)

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH6,8) – 0,4% SDS

3,05 ml Aigua mili Q

- Desgassificar la solució durant 10-15 min.
- Afegir els agents gelificants a la solució anterior poc a poc i sense bombolles.

Agents gelificants:

7,5 µl TEMED

30 µl PSA 10% (p/v)

- Treure el 2-butanol del gel preparador i rentar els gels amb aigua sota l'aixeta. Assecar i posar la solució del gel separador amb cura i sense fer bombolles sobre el gel preparador. Col·locar immediatament una pinta, amb cura i sense fer bombolles.
- Deixar gelificar la solució durant mínim 3 hores. Conservar a 4 °C, mínim 24 h.
- Treure la pinta i rentar els pouets amb aigua destil·lada sota l'aixeta.

II. Preparació de les mostres:

- Diluir els extractes proteics en Tampó de Mostra d' SDS que conté SDS 2,2% (p/v), Glicerol 5% (v/v), Tris-HCl (pH 6,8) 60 mM, DTT 0,1 M i blau de bromofenol.

Per preparar 1 ml de Tampó de Mostra d' SDS:

22 mg SDS (Calbiochem, EMD Biosciences, Inc, La Jolla, Califòrnia, USA)

50 µl Glicerol

40 µl Tris-HCl (pH 6,8) 0,5 M (Bio-Rad Laboratories Ltd)

15,42 mg DTT

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 1 ml

Quantitat suficient de blau de bromofenol (Sigma-Aldrich) per a que sigui visible (s'ha de posar molt poc)

- Pre-escalfar les mostres a 90 °C durant 5-10 min abans de carregar-les al gel.
- Posar les mostres en gel immediatament després de la incubació.

III. Electroforesi:

- Omplir la cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi d' SDS o TGS 1X. Aquest tampó es prepara a partir d'una solució de TGS 10X i es conserva a 4 °C.

Per preparar 1 L de tampó d'electroforesi d' SDS o TGS 10X (conservar a 4 °C):

30 g Tris

144 g Glicina (Sigma-Aldrich)

10 g SDS

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 1 L

- Carregar les mostres diluïdes en Tampó de Mostra d' SDS i pre-escalfades en els gels.
- Iniciar la electroforesi a 5-10 mA/gel fins que les mostres arribin al inici del gel separador. Després augmentar a 20-30 mA/gel fins al final de la electroforesi.

NOTA: com més baixos siguin el voltatge i la temperatura, major serà la resolució de les bandes al gel.

IV. Tinció dels gels:

En aquesta tesi els gels d' SDS es van tenyir amb EzBlue™ o amb la tinció fluorescent de Flamingo™. La tinció amb EzBlue™ es troba detallada a la Secció 3.3.2. de Material i Mètodes i es va fer servir principalment per fer comprovacions. La tinció de Flamingo™ es va fer servir en aquells gels que anaven destinats a ser analitzats per MS, ja que l' EzBlue™ pot presentar interferències. A més a més, la tinció de Flamingo™ és fluorescent i més sensible, per tant és capaç de detectar quantitats menors de proteïna. Aquesta tinció es va dur a terme tal i com es detalla a continuació:

3. Material i mètodes

- Fixar els gels amb una solució d'Etanol 40% (v/v) i Àcid acètic 10 (v/v) durant mínim 1 h.
- Tenyir els gels amb la solució *FlamingoTM fluorescent gel stain* (Bio-Rad Laboratories Ltd) durant 3-8 h.
- Deixar els gels en contacte amb aigua miliQ.

3.5.5. Identificació de proteïnes per espectrometria de masses

La identificació de les proteïnes es va dur a terme mitjançant cromatografia líquida seguida d'espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS). Per tal de preparar les proteïnes per la seva identificació, primerament es van escindir la totalitat dels carrils dels gels àcids i d' SDS on es trobaven les proteïnes d'interès en bandes d'aproximadament 1 mm d'amplada (Figura 3.10). Posteriorment, la LC-MS/MS i la interpretació de les dades de MS es van dur a terme a la Unitat de Proteòmica dels CCiTUB. Els procediments que van seguir a la Unitat de Proteòmica es troben explicats breument a continuació:

I. LC-MS/MS:

- Les bandes escindides dels gels àcids i d' SDS van ser independentment digerides amb 100-150 ng de tripsina (Promega) a 37 °C O/N, seguint les indicacions del fabricant.
- Els pèptids obtinguts van ser separats per nano cromatografia líquida (nLC) utilitzant una Proxeon EASY-nLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) amb una velocitat de flux de 500 nL/min. Es va fer servir una columna trampa EASY C18 (5 µm, 120 Å, 75 µm de diàmetre intern i 2 cm de llargada) i una columna analítica EASY C18 (3 µm, 120 Å, 75 µm de diàmetre intern i 10 cm de llargada). Es va utilitzar el solvent B (97% d'acetonitril i 0,1% d'àcid fòrmic) i el solvent A (3% d'acetonitril i 0,1% d'àcid fòrmic) per dur a terme un gradient lineal de solvent B 5%-40% durant 35 min i 40-100% durant 5 min.
- L'anàlisi amb MS en tàndem (MS/MS) es va realitzar amb l'aparell LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) amb una font d'ions de nanoelectropulverització amb selecció de precursors d'ions a l'Orbitrap, a 30000 de resolució. Es van seleccionar els 10 precursors d'ions més intensos, amb una energia de col·lisió de 35 en el mode d'ions positiu. L'adquisició de les dades de MS/MS va ser completada amb Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific).

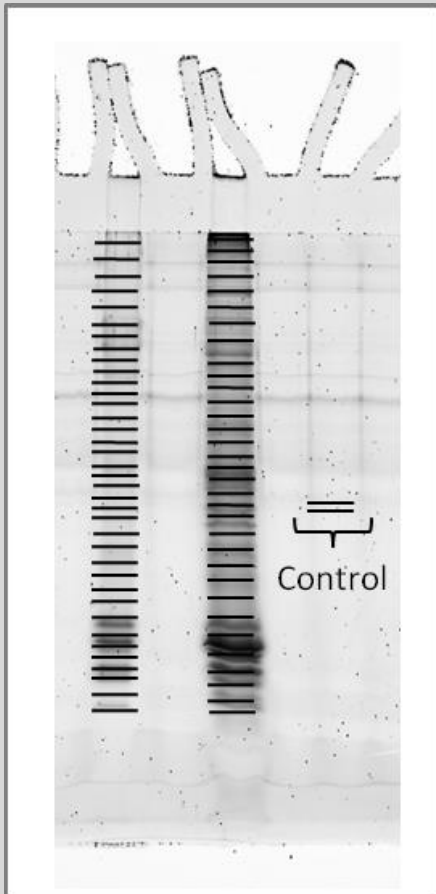


Figura 3.10. Representació esquemàtica de bandes escindides en un gel d'SDS pel posterior anàlisi amb LC-MS/MS. Exemple de dos carrils d'un gel d'SDS escindits en bandes d'1 mm d'amplada aproximadament. També s'escindeix una banda d'una part del gel sense proteïna per fer un control de proteïnes contaminants.

II. Interpretació de les dades de MS:

- Les dades de MS/MS van ser processades utilitzant el programa Proteome Discoverer versió 1.3.0.339 (Thermo Fisher Scientific) i es van enviar a la base de dades *in-house* UniProtKB/Swiss-Prot per *Homo sapiens* publicada al desembre del 2010 (amb 20.247 entrades) utilitzant el programa SEQUEST versió 28.0 (Thermo Fisher Scientific).
- Per realitzar la cerca es van utilitzar els següents paràmetres: un màxim de dues divisions perdudes per la tripsina, carbamidometilació com a modificació fixa dels pèptids, oxidació de metionines com a modificació variable dels pèptids, una tolerància de massa del pèptid de 25 ppm i una tolerància dels fragments dels ions de 0,8 Da.
- Els criteris d'inclusió seguits per acceptar una identificació van incloure el *Min Xcorr* (1,6 per 2+, 1,9 per 3+, 2 per 4+, 2,5 per 5+ i 2,75 per 6+), un FDR de 0,05 i una identificació mínima de 2 pèptids per proteïna, un dels quals havia de ser únic.

3.5.6. Anàlisi de les proteïnes espermàtiques identificades

Per tal d'obtenir informació i estudiar els proteomes obtinguts a partir de nuclis o subfraccions de nuclis, d'espermatozoides humans, les proteïnes identificades per LC-MS/MS van ser analitzades de dues maneres diferents: manualment amb la informació disponible a la base de dades UniProt KB/Swiss-Prot i amb l'ús de les eines bioinformàtiques DAVID v6.7 i GOminer.

I. Anàlisi manual amb UniProt KB/Swiss-Prot:

A partir del codi d'accés UniProt KB que ens va proporcionar la Unitat de Proteòmica dels CCiTUB per cadascuna de les proteïnes identificades, es va procedir a fer una cerca manual i individualitzada de la informació disponible a la mateixa base de dades accessible de forma gratuïta a Internet, la UniProt KB/Swiss-Prot de l'ExpASy.

Es va recollir per a cada proteïna informació referent a la seva localització cel·lular, expressió en teixits i la (o les) funció(ns) biològica(ques) descrites.

II. Anàlisi amb DAVID v6.7 o GOminer:

Després de realitzar un primer anàlisi manual de les proteïnes identificades, es va procedir a un segon anàlisi utilitzant les eines bioinformàtiques disponibles gratuïtament a Internet DAVID v6.7 (*Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery*; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al., 2009a; 2009b) i GOminer (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/index.jsp>) (Zeeberg et al., 2003). Aquestes eines ens van permetre identificar els termes de *Gene Ontology* (GO) relacionats amb *Cellular Component* (CC) i *Biological Process* (BP) que es trobaven sobrerrepresentats en els nostres llistats de proteïnes.

En ambdós casos, la significança de l'anàlisi d'enriquiment va ser calculada pel programa a partir d'un EASE Score, el qual correspon a un *one-tail Fisher Exact P-value*.

3.6. Determinació de l'expressió de proteïnes a l'espermatozoide

L'estudi concret de l'expressió de proteïnes a l'espermatozoide seleccionades a partir dels proteomes obtinguts en aquesta tesi es va dur a terme a partir d'estudis amb anticossos, el que va incloure anàlisis per *Western blot* i per immunofluorescència.

3.6.1. Western blot

Els anàlisis per *Western blot* es van efectuar per determinar l'expressió de dues nucleoproteïnes concretes: la proteïna SET (SET/I2PP2A) i la histona H2A.X (H2A.X). Es van utilitzar extractes proteics corresponents a nuclis d'espermatozoides (Veure Secció 3.5.2. de Material i Mètodes) i a les fraccions FS i FI de la cromatina espermàtica (Veure Secció 3.5.3.1. de Material i Mètodes) obtinguts a partir de mostres independents d'espermatozoides normozoospèrmics purificats (Veure Secció 3.2. de Material i Mètodes).

Una quantitat aproximada de 35 µg dels diferents extractes proteics va ser primerament separada per electroforesi d' SDS (Veure Secció 3.5.4. de Material i Mètodes) i seguidament es va iniciar el procediment del *Western blot*:

I. Preparació:

Manipular tot amb pinces i tenir totes les solucions fredes.

- Preparar amb anterioritat el tampó de transferència constituït per Tris 25 mM, Glicina 0,2 M i Metanol 15% (v/v) i conservar a 4 °C fins al moment de l'ús.

Per preparar 2 L de tampó de transferència (conservar a 4 °C):

6,06 g Tris

30,03 g Glicina

300 ml Metanol

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 2 L

- Preparar una membrana de nitrocelulosa (NYTRAN Plus, Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Alemanya), de la mida adequada pel nostre gel, humitejant-la amb metanol durant 1 min en agitació. Hidratar la membrana amb aigua miliQ, en agitació, i seguidament humitejar-la amb tampó de transferència durant 10-15 min.
- Tallar 4 papers Whatman (Whatman International Ltd, Maidstone, Regne Unit) de la mida adequada pel nostre gel i humitejar-los amb tampó de transferència fins al moment de l'ús.

3. Material i mètodes

- Humitejar 2 coixinets o *blotting pads* (Bio-Rad Laboratories Ltd) amb tampó de transferència fins al moment de l'ús.
- Agafar el gel després de la electroforesi d'SDS (sense fer la tinció) i humitejar-lo amb tampó de transferència fins al moment de l'ús.

II. Transferència:

- Col·locar els diferents components de la transferència, prèviament humitejats amb tampó de transferència, en el bloc de transferència o *sandwich* en el següent ordre:

PLACA NEGRA (Pol negatiu)

1 coixinet/*blotting pad*

2 papers Whatman

Gel (amb molta cura i vigilat la orientació en la que es posa)

Membrana (es pot fer una marca per saber la seva orientació)

2 papers Whatman

1 coixinet/*blotting pad*

PLACA TRANSPARENT (Pol positiu)

- Agafar una recipient i posar una mica de gel a la part de sota. Col·locar la cubeta del sistema de *Western blot* a sobre, ben anivellada.
- Posar el *sandwich* dins de la cubeta del sistema de *Western blot* juntament a un bloc de gel. Omplir la cubeta amb tampó de transferència fred i posar la tapa.
- Acabar d'omplir el recipient on es troba la cubeta del sistema de *Western blot* amb gel.
- Iniciar la transferència a 100 mA durant 1 h 15 min.
- Obrir el *sandwich* i mirar si hi ha hagut transferència.
NOTA: Per comprovar si la transferència s'ha donat correctament es pot tenyir la membrana amb tinció Ponceau. Una altra possibilitat pot ser tenyir el gel després de la transferència i veure si encara hi ha proteïna que no s'ha transferit.

III. Immuno-tinció:

- Incubar la membrana amb *Tris-buffered saline* (TBS) 1X-Tween 20 0,1% (v/v) (conservat a 4 °C) durant 15 min en agitació constant.

Per preparar 1L de TBS 1X- Tween 20 0,1% (conservar a 4 °C):

100 ml TBS 10X (preparació indicada més abaix)

5 ml Tween 20 20% (v/v) (preparat a partir de Tween 20, Sigma-Aldrich)

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 1 L

Per preparar 1L de TBS 10X (conservar a 4 °C):

24 g Tris

80 g NaCl

Ajustar pH a 7,6

Quantitat suficient d'aigua miliQ per arribar a 1 L

- Efectuar el bloqueig de la membrana mitjançant la seva incubació amb TBS 1X-Tween 20 0,1% i llet desnatada 5% (p/v) (solució de bloqueig) durant 3 h a temperatura ambient.

NOTA: El bloqueig de la membrana és necessari per evitar unions inespecífiques de l'anticòs. El temps de bloqueig pot variar entre 1 h i O/N depenent de l'anticòs i del grau d'inespecificitat que obtinguem al final del Western blot.

Per preparar 50 ml de solució de bloqueig:

2,5 g llet desnatada en pols (Nestlé, Vevey, Suïssa)

Quantitat suficient de TBS 1X-Tween 20 0,1% per arribar a 50 ml

- Esbandir la membrana dues vegades amb TBS 1X-Tween 20 0,1%.
- Afegir l'anticòs primari diluït en TBS 1X-Tween 20 0,1% a la dilució adequada i incubar O/N a 4 °C.

NOTA: La temperatura i el temps d'incubació dependrà de l'anticòs que s'utilitzi. Les dilucions dels anticòs primaris utilitzades en aquesta tesi van ser 1:500 d'anticòs anti-I2PP2A (sc-25564; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) i 1:1000 d'anticòs anti-Histone H2A.X (ab11175; Abcam, Cambridge, Regne Unit). Es van preparar entre 5 i 10 µl de cadascun, depenent de la grandària de la membrana.

- Esbandir la membrana 2 vegades amb TBS 1X-Tween 20 0,1% i rentar 3 vegades amb TBS 1X-Tween 20 0,1% durant 10 min.
 - Afegir l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig a la dilució adequada i incubar durant 1 h a temperatura ambient.
- NOTA: En aquesta tesi es va utilitzar l'anticòs secundari Amersham™ ECL™ Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, Regne Unit) diluït 1:2500.*
- Esbandir la membrana 2 vegades amb TBS 1X-Tween 20 0,1% i rentar 3 vegades amb TBS 1X-Tween 20 0,1% durant 10 min.

IV. Revelat:

Les membranes es van revelar directament amb el producte WesternBright™ ECL Western Blotting Detection kit (Advansta, Melo Park, Califòrnia, USA) seguint les indicacions del fabricant.

3. Material i mètodes

Les imatges es van capturar utilitzant LAS-3000 *imaging system* (Fujiifilm, Tokyo, Japó).

3.6.2. Immunofluorescència

Els anàlisis per immunofluorescència es van efectuar per determinar l'expressió de la nucleoproteïna *Histone demethylase PHF8* (PHF8) i la ribonucleoproteïna *60S ribosomal protein L9* (RPL9) en espermatozoides normozoospèrmics purificats. El procediment seguit es va basar en articles publicats (Amaral *et al.*, 2007, 2013) i va ser el següent:

- Agafar una alíquota d'uns 10 µl corresponent a $4 - 10 \times 10^6$ d'espermatozoides purificats i dissolts en PBS i posar-la sobre un portaobjectes amb *polylysine* (*Polylysine-coated microscope slides*; Thermo Fisher Scientific). Repartir les cèl·lules pel centre del portaobjectes amb una punta de pipeta.

NOTA: La polylysine permet que les cèl·lules s'adhereixin de forma correcta al portaobjectes. Si no es disposa de portaobjectes amb polylysine comercials, es poden preparar tal i com es descriu a la tesi de la Dra. Sara de Mateo (<http://hdl.handle.net/10803/1141>). És recomanable preparar més portaobjectes en cas que sigui necessari fer repeticions o optimitzacions del protocol. Un dels portaobjectes addicionals es pot utilitzar com a control negatiu de la fluorescència, en el qual no s'afegeix anticòs primari.

- Realitzar la fixació de les cèl·lules submergint els portaobjectes en una solució de PBS amb paraformaldehid (PFA) 2% (v/v). Incubar durant 40 min a temperatura ambient.

NOTA: la solució de fixació s'ha de preparar al moment.

Per preparar 50 ml de solució de fixació:

2,7 ml PFA (Merck KGaA)

Quantitat suficient de PBS per arribar a 50 ml

- Realitzar la permeabilització de les cèl·lules submergint els portaobjectes en una solució de PBS amb Tritó 1% (v/v). Incubar durant 20 min a temperatura ambient.

NOTA: la permeabilització de les cèl·lules és necessària per permetre la penetració de l'anticòs a les cèl·lules.

Per preparar 50 ml de solució de permeabilització:

0,5 ml Tritó X-100

Quantitat suficient de PBS per arribar a 50 ml

- Realitzar el bloqueig submergint els portaobjectes en una solució de PBS amb BSA 1 mg/ml i Glicina 100 mM. Incubar un mínim de 30 min a temperatura ambient.

NOTA: Aquest pas és necessari per evitar reaccions inespecífiques, ja que el PFA pot formar radicals que es poden unir de forma inespecífica a l'anticòs. El protocol es pot aturar en aquest pas guardant a 4 °C els portaobjectes en una caixa amb solució de bloqueig fins que es pugui continuar. Tancar bé la caixa amb parafilm per a que no es produeixi pèrdua de solució.

Per preparar 50 ml de solució de bloqueig:

50 mg BSA (Sigma-Aldrich)

375 mg Glicina

Quantitat suficient de PBS per arribar a 50 ml

- Incubar O/N a 4 °C els portaobjectes amb 100-150 µl de l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig. Utilitzar una cambra humida (*Humid Chamber*, Sigma-Aldrich) i cobrir cada portaobjectes amb parafilm (tallat amb la mida del portaobjectes) per assegurar que l'anticòs es reparteix uniformement.

NOTA: La temperatura i el temps d'incubació dependrà de l'anticòs primari que s'utilitza. La dilució de l'anticòs primari anti-PHF8 (ab36068; Abcam) i anti-RPL9 (H00006133-M01; Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) utilitzat en aquesta tesi va ser de 1:200 i 1:100, respectivament. En el cas del control negatiu, afegir el mateix volum de solució de bloqueig sense cap anticòs.

- Rentar els portaobjectes amb una solució de PBS amb Tritó 0,1% (v/v). Incubar durant 30 min a temperatura ambient.

Per preparar 50 ml de solució de rentat:

50 µl Tritó X-100

Quantitat suficient de PBS per arribar a 50 ml

- Incubar durant 1 h a 37 °C els portaobjectes amb l'anticòs secundari adequat diluït 1:200 en solució de bloqueig. Utilitzar una cambra humida i cobrir cada portaobjectes amb parafilm per assegurar que l'anticòs es reparteix uniformement.

NOTA: L'anticòs secundari utilitzat en aquesta tesi va ser Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen™, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK).

- Rentar els portaobjectes amb solució de rentat. Incubar durant 30 min a temperatura ambient.

- Muntar els cobreobjectes sobre els portaobjectes amb el medi de muntatge *Vectashield mounting medium with DAPI* (Vector Laboratories, Burlingame, Califòrnia, USA). Segellar els cobreobjectes amb pinta angles.

NOTA: El medi de muntatge que es va utilitzar contenia DAPI per poder visualitzar els nuclis amb fluorescència.

- Observar els portaobjectes en el microscopi de fluorescència.

NOTA: En aquesta tesi es va utilitzar un microscopi BX50 (Olympus, Hamburg, Alemanya) equipat amb tres filtres fluorescents i una càmera fotogràfica Olympus DP71.

3.7. Anàlisis estadístics

Els anàlisis estadístics efectuats en aquesta tesi doctoral es van realitzar amb el programa SPSS versió 16.0 (SPSS Corp, Chicago, Illinois, USA) i es va considerar significatiu valors de $P < 0,05$.

Es van utilitzar els següents tests estadístics:

- El test no paramètric de *Mann-Whitney* per tal de detectar diferències entre els promitjos de les variables quantitatives (recompte espermàtic, relació P1/P2, relacions protamina/DNA i dany en el DNA) entre mostres *Native Samples* i mostres *DGC Samples* (Veure Seccions 3.1 de Material i Mètodes i 4.1.1. de Resultats). També va ser utilitzat per detectar diferències en el dany al DNA de mostres estratificades segons si presentaven una relació P1/P2 baixa, mitja o elevada (Veure Secció 4.1.1. de Resultats).
- El test no paramètric d'*Spearman* per tal de detectar correlacions entre el dany en el DNA i les relacions protamina/DNA en mostres *Native Samples* i *DGC Samples* (Veure Secció 4.1.1. de Resultats).
- El test del chi-quadrat (χ^2) per avaluar la incidència d'un dany al DNA significativament elevat en diferents categories de mostres segons el valor de protamina/DNA (Veure Secció 4.1.1. de Resultats).

L'estadística aplicada per la identificació de proteïnes a partir de les dades obtingudes de l'espectrometre de masses va ser realitzada mitjançant el programa Proteome Discoverer (versió 1.3.0.339) i es troba descrita a l'últim apartat de la secció 3.5.5. de Material i Mètodes.

De la mateixa manera, l'anàlisi estadístic aplicat per la identificació de termes GO enriquits en els llistats de proteïnes obtinguts es van realitzar amb els programes DAVID v6.7 i GOMiner i es troben descrits a la Secció 3.5.6. de Material i Mètodes. En el cas de l'enriquiment en el proteoma total del nucli de l'espermatozoide i en el subgrup de les proteïnes identificades en la fracció soluble de la cromatina espermàtica, es van aplicar les correccions de Benjamini i Bonferroni, respectivament (Veure Seccions 4.2.2 i 4.3 de Resultats).

4. Resultats

4.1. Anàlisi del contingut de protamines d'espermatozoides humans madurs i de la seva implicació en l'estat de la cromatina espermàtica.

Degut a la funció de protecció que exerceixen les protamines en el material genètic patern, l'anàlisi de la protaminació d'espermatozoides en pacients que presenten dificultats reproductives és una bona eina per observar l'estat de la cromatina espermàtica. Per altra banda, la protaminació és considerada una forma de regulació epigenètica i, de la mateixa manera que les histones, podrien estar formant un codi basat en modificacions post-traduccionals. Els resultats dels anàlisis duts a terme en aquesta tesi per tal de resoldre aquests aspectes es mostren a continuació.

4.1.1. Relació entre els quocients P1/P2 i P/DNA amb el grau de fragmentació del DNA en mostres de semen de pacients infèrtils⁴

Per realitzar aquest anàlisi es van recol·lectar un total de 66 mostres procedents de pacients infèrtils que van visitar el laboratori d'andrologia de la *Queen's University of Belfast* juntament amb les seves parelles per un problema de infertilitat encara desconegut en aquell moment (Veure Secció 3.1 de Material i mètodes). Les mostres incloses en aquest estudi presentaven els següents valors promitjos (\pm desviació estàndard) pels diferents paràmetres seminals valorats de forma rutinària:

- *Volum de l'ejaculat*: $3,6 \pm 1,3$ ml (Rang: 1-8 ml).
- *Concentració espermàtica*: $80,0 \times 10^6 \pm 47,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml (Rang: 7-200 $\times 10^6$ espermatozoides/ml).
- *Mobilitat espermàtica progressiva*: $54,0 \pm 17,1$ % (Rang: 12-90%).
- *Morfologia*: $21,5 \pm 10,5$ % formes normals (Rang: 0-50%formes normals)

Per a cadascuna de les mostres de semen incloses en aquest estudi (anomenades *Native Samples*) es va valorar el percentatge de dany en el DNA mitjançant la tècnica del Comet. A més a més, es va procedir a l'extracció de les protamines que es van analitzar amb electroforesis àcides, per tal d'establir les relacions P1/P2 per a cada pacient. A més a més, també es van quantificar els continguts de P1 i P2 per separat (en μ g), els quals es van relacionar amb la quantitat de DNA (en μ g) per calcular les diferents relacions de Protamina/DNA (P1/DNA, P2/DNA i P1+P2/DNA; Taula 4.1). Es van valorar possibles

⁴ Els resultats exposats en aquest apartat de la secció de resultats es troben publicats a l'article **Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S., and Oliva, R. (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J. Androl.* 32, 324–332**, que es troba a l'Annex 8.1.

4. Resultats

correlacions entre aquests paràmetres però no es va observar cap relació significativa entre els nivells de protaminació i la integritat del DNA espermàtic en *Native Samples* (Figura 4.1).

Degut a que pacients que presenten aquestes característiques cursen tractaments de reproducció assistida i que, a més a més, les mostres de semen són per naturalesa heterogènies, es va repetir l'anàlisi utilitzant per cadascuna de les mostres només la fracció espermàtica destinada a tècniques de RA. Aquestes fraccions es van obtenir mitjançant gradients de Puresperm i es van anomenar *Density Gradient Centrifuged Samples (DGC Samples)*. Aquest procediment va permetre obtenir una selecció d'espermatozoides que presentava nivells de fragmentació de DNA menors a la seva corresponent *Native Sample* (Taula 4.1). A més a més, tot i que no es van observar diferències en la relació P1/P2 en les mostres abans i després de realitzar el Puresperm, les *DGC Samples* si que presentaven nivells de P1, P2 i P1+P2 menors (Taula 4.1).

Taula 4.1. Efecte de la preparació de les mostres amb Puresperm en els nivells de protamines i dany del DNA espermàtic (n=66). DS= desviació estàndard, NS= relació no significativa. P-value obtingut amb el test no paramètric de Mann-Whitney.

	<i>Native Samples</i>		<i>DGC Samples</i>		P-value
	Promig ± DS	Rang	Promig ± DS	Rang	
P1/P2	0,93 ± 0,13	0,63-1,24	0,97 ± 0,18	0,62-1,62	NS
µg P1+P2/µg DNA	0,44 ± 0,12	0,23-0,80	0,38 ± 0,15	0,12-0,91	<0,05
µg P1/µg DNA	0,21 ± 0,06	0,10-0,42	0,19 ± 0,08	0,06-0,56	<0,05
µg P2/µg DNA	0,23 ± 0,06	0,12-0,38	0,20 ± 0,08	0,05-0,42	<0,05
Dany DNA (%)	46,0 ± 19,5	11,3-82,8	33,1 ± 20,4	0,6-77,3	<0,001

Els nivells de protamines en les fraccions utilitzades per RA van mostrar una correlació negativa significativa amb el percentatge de dany al DNA ($P < 0,05$; Figura 4.1). Aquest resultat ens va portar a estratificar els pacients en primer lloc d'acord amb les seves relacions P/DNA, segons si presentaven valors anormalment baixos (quartil menor), valors mitjans (quartils centrals) i valors anormalment elevats (quartil major). En segon lloc, els pacients van ser estratificats segons el grau de dany al DNA detectat, en mostres amb baix % de dany ($\leq 25\%$) i mostres amb elevat % de dany ($> 25\%$) (Figura 4.1 i Taula 4.2). D'aquesta manera, la correlació negativa detectada en les *DGC Samples* entre el dany al DNA i els nivells de protamines va ser confirmada a través de la detecció d'un nombre de pacients amb elevat dany al DNA significativament major en tots els grups que presentaven relacions P1/DNA, P2/DNA i P1+P2/DNA disminuïdes (quartils menors; Taula 4.2).

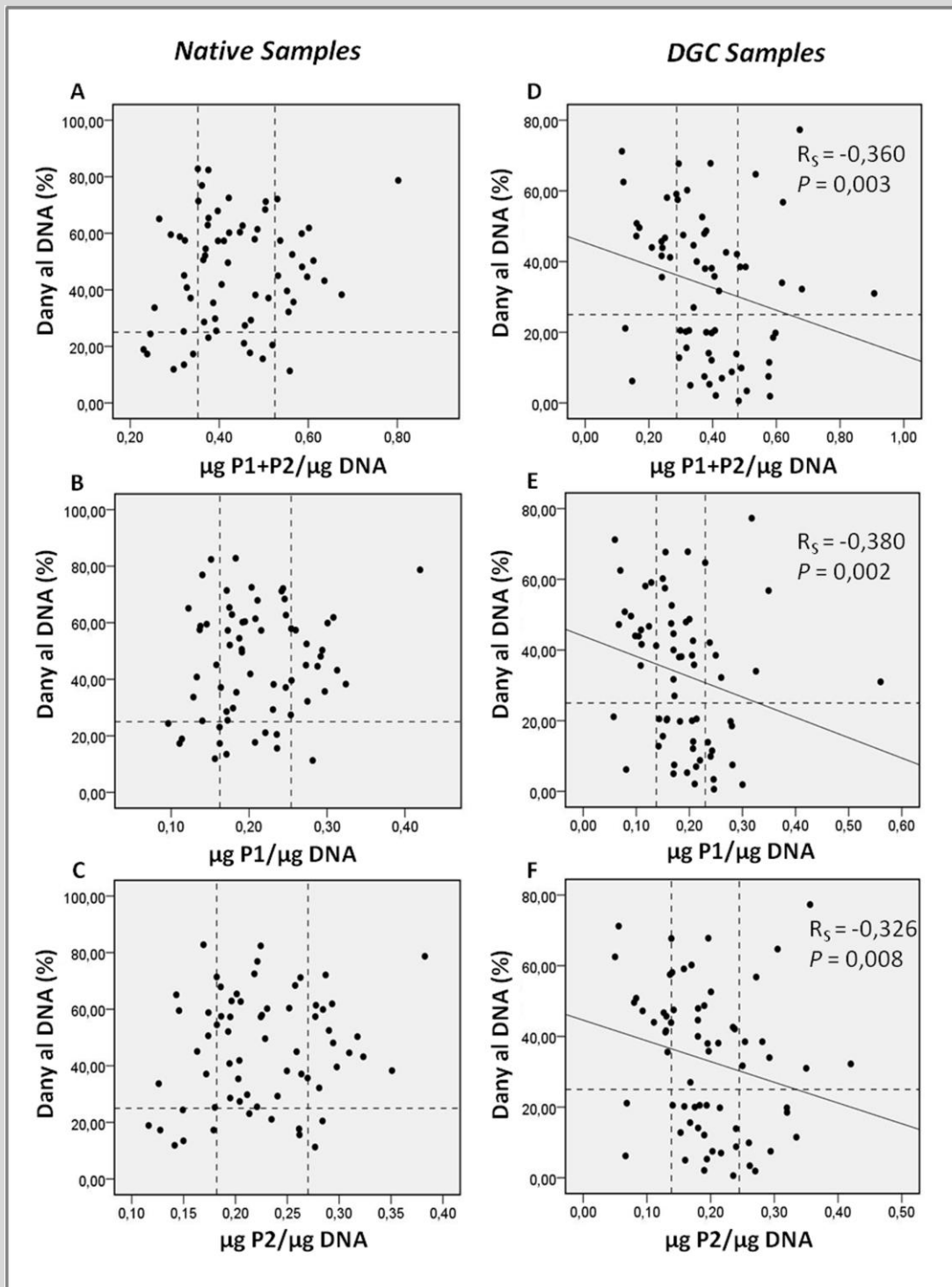


Figura 4.1. Correlació entre el dany en el DNA espermàtic i el contingut de P1, P2 i protamina total (P1+P2) en mostres de pacients infèrtils. Els diagrames de punts A, B i C corresponen a les dades obtingudes a partir de *Native Samples*, i els D, E i F de *DGC Samples*. Les línies puntejades verticals estratifiquen les mostres segons nivells de protamina/DNA anormalment baixos (quartil menor), mitjans (quartils centrals) i anormalment elevats (quartil major). Les línies puntejades horitzontals estratifiquen les mostres segons nivells de dany al DNA baixos ($\leq 25\%$) o elevats ($>25\%$). Les correlacions mostrades van resultar significatives mitjançant el test estadístic d'Spearman.

Taula 4.2. Correlació entre el dany al DNA i les diferents categories de Protamina/DNA establertes en les mostres de semen analitzades (n=66). NS= relació no significativa. P-value obtingut amb el test χ^2 . * Quartil menor comparat amb els quartils centrals.

	Quartils Protamina/DNA	Nº mostres amb dany al DNA		P-value
		>25%	≤25%	
<i>Native samples</i>				
µg P1+P2/µg DNA	Menor	10	6	NS
	Centrals	29	5	
	Major	15	1	
µg P1/µg DNA	Menor	10	6	NS
	Centrals	29	5	
	Major	15	1	
µg P2/µg DNA	Menor	10	6	NS
	Centrals	30	4	
	Major	14	2	
<i>DGC samples</i>				
µg P1+P2/µg DNA	Menor	14	2	<0,05*
	Centrals	17	17	
	Major	8	8	
µg P1/µg DNA	Menor	14	2	<0,05*
	Centrals	18	16	
	Major	7	9	
µg P2/µg DNA	Menor	14	2	<0,05*
	Centrals	16	18	
	Major	9	7	

Adicionalment, també es va dur a terme una estratificació de les *DGC Samples* segons les relacions P1/P2 seguint les mateixes condicions anteriors. En aquest cas, i a diferència de les respectives *Native Samples*, es va veure que el promig de dany al DNA que presentaven els pacients era significativament major en espermatozoides amb relacions P1/P2 anormalment baixes (quartil menor; 41,5% ± 15,6%; n=16), comparat amb el grup que contenien relacions P1/P2 en un nivell considerat mitjà (quartils centrals; 29,9% ± 20,5%; n=34; Figura 4.2).

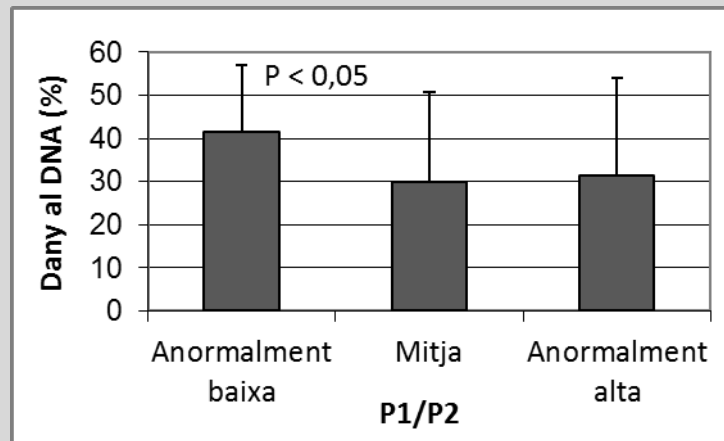


Figura 4.2. Dany al DNA en *DGC Samples* segons el nivell de P1/P2. Representació del % de dany al DNA espermàtic en les fraccions d'espermatozoides usades per reproducció assistida, segons si presenten P1/P2 anormalment baixa (quartil menor), mitjana (quartils centrals) o anormalment alta (quartil major). P-value <math>< 0,05</math> en P1/P2 anormalment baixa en comparació amb P1/P2 mitja (test de Mann-Whitney).

4.1.2. Identificació de la presència de modificacions post-traduccionals en les seqüències de les protamines humanes mitjançant espectrometria de masses

A partir de l'anàlisi amb espectrometria de masses d'un extracte proteic format per protamines purificades (Veure Secció 3.3.3. de Material i Mètodes) i sense digestió prèvia, s'han obtingut una sèrie d'espectres que relacionen l'abundància relativa dels components detectats amb la seva corresponent relació massa/càrrega. Establint una càrrega d'1, s'ha observat un pic (6691,5 Da) corresponent a la seqüència de P1 intacta, la qual té una massa teòrica de 6691,80 Da (Figura 4.3). A més a més, s'han obtingut pics addicionals que presentaven una incorporació de massa respecte a la de la P1. Utilitzant la informació continguda a la base de dades Unimod, disponible a través d'Internet (<http://www.unimod.org/login.php?message=expired>), s'ha pogut obtenir informació sobre diferents PTMs i les seves masses, per així relacionar-les amb les incorporacions obtingudes (establint un error de massa màxim de 200 ppm). D'aquesta manera, s'ha observat la presència d'un pic corresponent a la P1 fosforilada (incorporació aproximadament de 80 Da) i trifosforilada (incorporació aproximadament de 240 Da; Figura 4.3 i Taula 4.3).

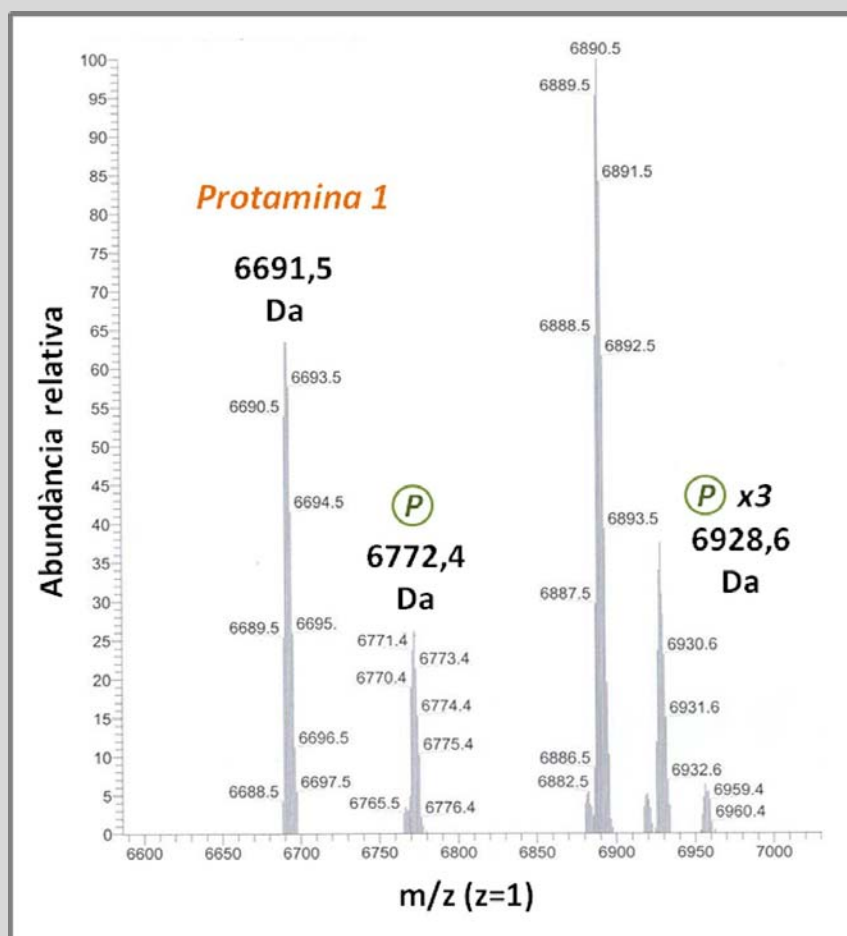


Figura 4.3. Detecció de la P1 i P1 fosforilada mitjançant espectrometria de masses. Es mostra un espectre representatiu en el qual s'observa la detecció de pics corresponents a la massa de la P1 intacta i a la incorporació de massa deguda a una fosforilació i a una triple fosforilació (Error < 200 ppm).

A més a més, també s'han detectat increments de massa coincidents amb diacetilacions combinades amb metilacions (aproximadament 98 Da; Taula 4.3).

Taula 4.3. Incorporacions de masses detectades en la seqüència aminoacídica de la Protamina 1 humana corresponents a possibles modificacions post-traduccionals. Error < 200 ppm.

Protamina 1: 6691.80 Da				
Modificació	Massa teòrica modificació (Da)	Massa experimental detectada (Da)	Incorporació de massa detectada (Da)	Error (ppm)
Acetilació x 2 + Metilació	98,1034	6790,44	98,64	-68,89
Fosforilació	79,98	6772,4	80,60	-57,25
Fosforilació x 3	239,94	6931,49	239,69	-181,42

Pel que fa a la família de la P2, mitjançant espectrometria de masses s'ha detectat únicament el component P3 intacte, amb una massa de 7258,4 Da. S'han detectat pics corresponents a l'addició d'1 o 2 grups acetils (aproximadament 42 i 84 Da, respectivament), com també la incorporació de massa coincident amb un grup metil (aproximadament 14 Da; Taula 4.4). Per altra banda, s'ha detectat un component amb massa corresponent a la forma immadura de la protamina 2 HPS1 (9017,72 Da, Error 100,91 ppm), i a les modificacions fosforilació (80,26 Da, Error -83,49 ppm) i trifosforilació (240,88 Da, Error -10.76 ppm) en la seva seqüència.

Taula 4.4. Incorporacions de masses detectades en la seqüència aminoacídica del component P3 de la família de la Protamina 2 corresponents a possibles modificacions post-traduccionals. Error < 200 ppm.

Component P3 de la protamina 2: 7258,40 Da				
Modificació	Massa teòrica modificació (Da)	Massa experimental detectada (Da)	Incorporació de massa detectada (Da)	Error (ppm)
Metilació	14,03	7272,6	14,20	-120,24
Acetilació	42,04	7301,3	42,90	-25,86
Acetilació x 2	84,08	7344,4	86,00	119,65

4.2. Anàlisi del proteoma nuclear d'espermatozoides humans normals mitjançant espectrometria de masses i la distribució en diferents compartiments de la cromatina espermàtica

Mitjançant el subfraccionament de la cèl·lula espermàtica per tal d'obtenir nuclis aïllats, es pot enriquir l'abundància relativa de proteïnes presents en aquest compartiment i, per tant, s'augmenta la probabilitat de poder-les identificar amb espectrometria de masses. A més a més, estudiar si les proteïnes associades a la cromatina es troben distribuïdes d'una determinada manera ha permès obtenir més informació sobre la contribució paterna en la fertilització. Els resultats detallats obtinguts en aquest apartat es detallen a continuació.

4.2.1. Descripció del contingut proteic del nucli de l'espermatozoide humà madur normozoospèrmic⁵

A partir de nuclis aïllats d'un *pool* de 4 mostres de semen normozoospèrmiques procedents d'homes sans es van extreure les proteïnes espermàtiques, les quals van ser posteriorment analitzades tant amb gels d'acrilamida d' SDS com gels d'acrilamida àcids. Seguidament es va procedir a l'escissió de les bandes, per tal de digerir les proteïnes i obtenir els pèptids corresponents, que es van analitzar per MS. Aquesta estratègia va permetre identificar un total de 403 proteïnes diferents (el llistat complet de proteïnes forma part de la *Supporting Information* de l'article (de Mateo *et al.*, 2011) i es troba a l'Annex 8.2). D'aquestes, gairebé la meitat (43,4%) no havien estat identificades anteriorment com part de l'espermatozoide humà, ni a partir de mètodes de detecció proteica convencional ni mitjançant tècniques basades en espectrometria de masses.

Utilitzant la informació continguda a la base de dades *Uniprot Knowledgebase* (UniprotKB) es va obtenir informació sobre la localització cel·lular de cadascuna de les proteïnes identificades. Es va observar com el 42,6% (159 proteïnes) es descriuen com específicament nuclears o bé podien trobar-se tant al nucli com en altres compartiments cel·lulars (Figura 4.4).

Utilitzant l'eina bioinformàtica *GOminer* es va realitzar un anàlisi dels termes de *Gene Ontology* referents a *Biological process* (GO BP) enriquits en el llistat de proteïnes obtingut.

⁵ Part dels resultats exposats en aquesta secció es troben publicats a l'article de Mateo, S., Castillo, J., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2011). *Proteomic characterization of the human sperm nucleus*. *Proteomics* 11, 2714–2726, que es troba a l'Annex 8.2. La part de l'article no inclosa en aquesta tesi doctoral va formar part de la tesi de la Dra. Sara de Mateo (<http://hdl.handle.net/10803/1141>).

Aquest anàlisi va permetre veure el nombre de proteïnes corresponents a un procés biològic concret que es trobaven al nucli de l'espermatozoide humà i quina proporció representaven en comparació amb totes les proteïnes que pertanyen al procés. D'aquesta manera, es va destacar la presència en el nucli de l'espermatozoide humà del 61% de totes les proteïnes conegudes que participen en processos metabòlics, el 30% de les proteïnes involucrades en la organització de components cel·lulars, el 24% de proteïnes relacionades amb processos del desenvolupament, el 10% de les proteïnes amb funcions associades a la reproducció, el 7% de totes les proteïnes que realitzen papers en la transcripció i el 7% de les proteïnes associades a la generació del gàmeta masculí, entre d'altres (Figura 4.5).

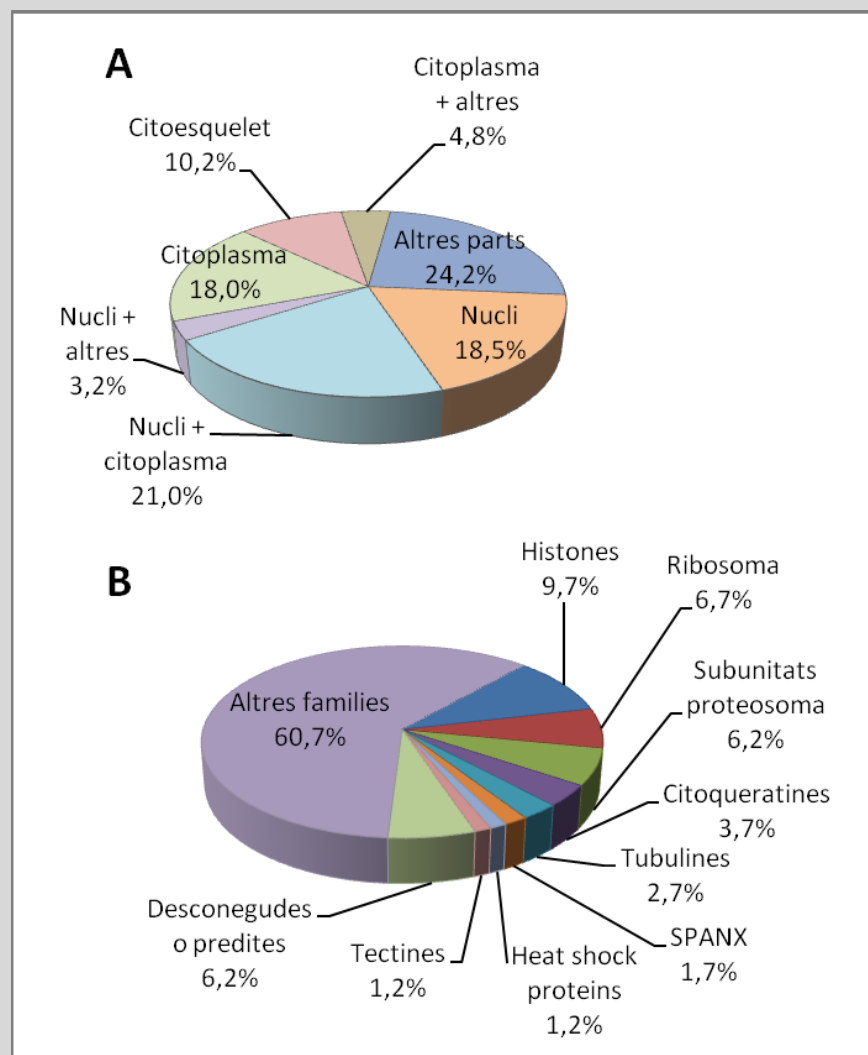


Figura 4.4. Localització cel·lular i famílies de proteïnes espermàtiques nuclears identificades. A: anàlisi de la distribució subcel·lular de les proteïnes identificades a partir de la informació de la base de dades UniprotKB. B: Representació de les famílies de proteïnes més abundants identificades amb localització nuclear descrita.

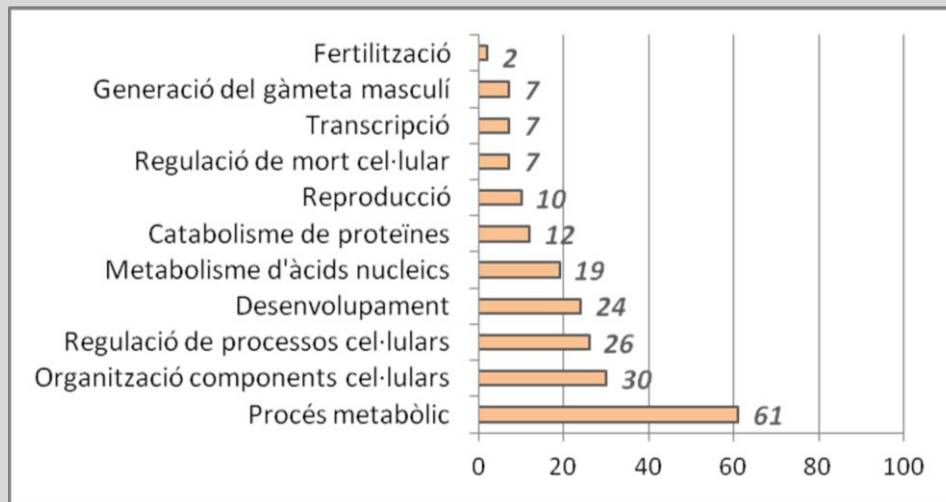


Figura 4.5. Termes de *Gene Ontology* (GO) relacionats amb processos biològics enriquets en el catàleg de proteïnes del nucli de l'espermatozoide. Selecció dels termes de GO *Biological process* més representatius. Es mostra el percentatge de proteïnes identificades al proteoma espermàtic nuclear respecte al total de proteïnes que pertany a cada procés biològic concret, segons l'eina bioinformàtica GOMiner.

Per altra banda, es va observar com conjunts de famílies destacables de proteïnes concretes es trobaven representades en el subgrup de proteïnes amb localització nuclear descrita en el moment de l'anàlisi. La família més abundant correspon a les histones (9,7%), seguida de proteïnes del ribosoma (6,7%), subunitats del proteasoma (6,2%), citoqueratines (3,7%), tubulines (2,7%), proteïnes SPANX (1,7%), *heat shock proteins* (1,2%) i tectines (1,2%). A més a més, es va identificar un grup de proteïnes (6,2%) catalogades com desconegudes (*Unknown*) o predites (*predicted*) (Figura 4.4; Annex 8.2).

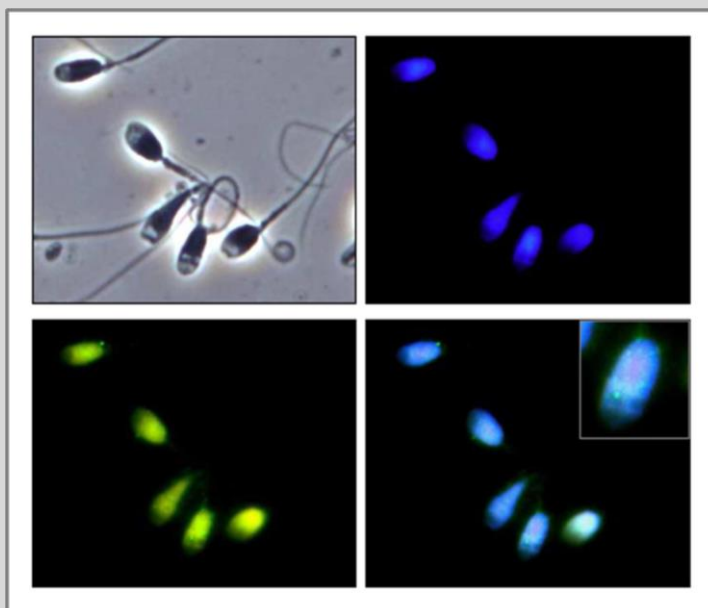


Figura 4.6. Detecció de la proteïna ribosòmica RPL9 en espermatozoides humans. La proteïna es troba detectada amb fluorescència verda, mentre que el DNA s'observa amb fluorescència blava. La última imatge correspon a una superposició de les dues anteriors. La imatge adquirida per contrast de fases es mostra en primer lloc.

Degut a que la presència d'un grup abundant de proteïnes del ribosoma va resultar inesperat, es va decidir comprovar la presència d'aquesta família al nucli de l'espermatozoide humà madur mitjançant la detecció d'una proteïna representativa del grup per immunofluorescència. D'aquesta manera, es va escollir la proteïna *60S ribosomal protein L9* (RPL9). El resultat de la immunodetecció va confirmar la presència de la proteïna, i per tant de la família, en el nucli dels espermatozoides (Figura 4.6).

4.2.2. Caracterització de la distribució de proteïnes en diferents compartiments de la cromatina espermàtica en espermatozoides normozoospèrmics⁶

Per tal de resoldre la segona part d'aquest segon objectiu es va fraccionar la cromatina espermàtica de nuclis aïllats d'espermatozoides normozoospèrmics utilitzant dos mètodes diferents: dissociació d'histones mitjançant incubació amb NaCl 0,65 M, per una banda, i digestió amb nucleasa micrococal (NM), per l'altra. Seguidament es va procedir a l'extracció de les proteïnes corresponents a cadascuna de les fraccions obtingudes: FS i FI pel mètode NaCl 0,65M i MNS i MNP pel mètode la NM (Veure Secció 3.5.3. de Material i Mètodes).

Utilitzant el mètode del NaCl 0,65 M, la separació de les proteïnes a través d'electroforesis d'SDS i àcides van mostrar dos patrons de bandes ben diferenciats entre la fracció proteica FS i la FI, tal i com s'observa a la figura 4.7. A més a més, el resultat de l'electroforesi àcida posa de manifest la presència de bandes de protamines en la FI, mentre que aquestes són absents en la FS. Aquest fet va suggerir que s'havien aconseguit dos grups de proteïnes diferents. Per altra banda, i de forma paral·lela, es va procedir a extreure el DNA associat a la fracció de la cromatina rica en histones per tal de digerir-lo amb enzims de restricció i analitzar-lo mitjançant *Deep Genome Sequencing*. Aquesta estratègia va mostrar un enriquiment d'aquesta fracció de gens en categories de GO BP relacionades amb processos transcripcionals i del desenvolupament, com són els termes *embryonic morphogenesis* i *regulation of transcription from RNA polymerase II promoter* (Taula 4.5). Aquests resultats van ser coincidents amb aquells ja publicats anteriorment per altres grups (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009) i, per tant, van permetre confirmar la correcta dissecció de la cromatina espermàtica amb aquest mètode. D'aquesta manera, es va decidir iniciar la identificació proteòmica de les proteïnes extretes, la qual va resultar en la caracterització d'un total de 495 proteïnes diferents (Figura 4.9 i Taula

⁶ Els resultats que es descriuen en aquest apartat formen part del manuscrit *Genomic and proteomic dissection and characterisation of the human sperm chromatin* (Castillo J., Amaral A., Azpiazu R., Vavouri T., Estanyol J.M., Ballescà J.L., and Oliva R), el qual es troba en fase de revisió actualment.

4. Resultats

suplementària 8.3.1 de l'Annex 8.3). Aquest resultat va mostrar una bona eficiència d'identificació proteica mitjançant LC-MS/MS.

Per altra banda, mitjançant el segon mètode de fraccionament, amb NM, per una qüestió metodològica la quantitat de proteïna obtinguda va ser molt menor, el que dificultava assegurar una diferenciació clara pel que fa als patrons proteics obtinguts per les fraccions MNS i MNP mitjançant gel d'electroforesi d' SDS (Figura 4.8). Tot i això, la seqüenciació del DNA associat a histones sí que va mostrar un bon fraccionament de la cromatina (Taula 4.5).

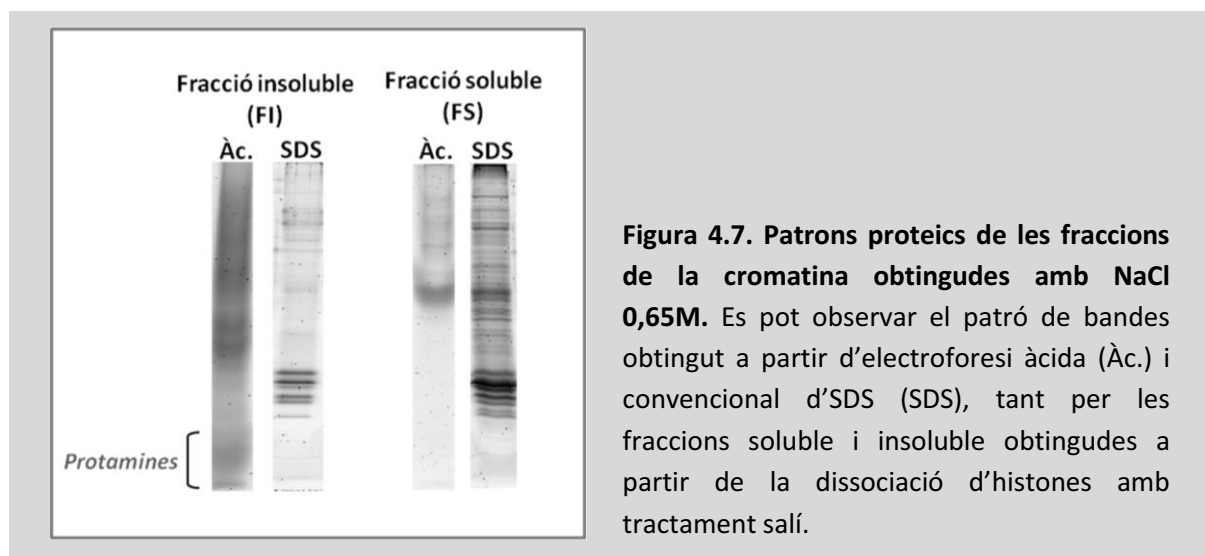


Figura 4.7. Patrons proteics de les fraccions de la cromatina obtingudes amb NaCl 0,65M. Es pot observar el patró de bandes obtingut a partir d'electroforesi àcida (Àc.) i convencional d' SDS (SDS), tant per les fraccions soluble i insoluble obtingudes a partir de la dissociació d'histones amb tractament salí.

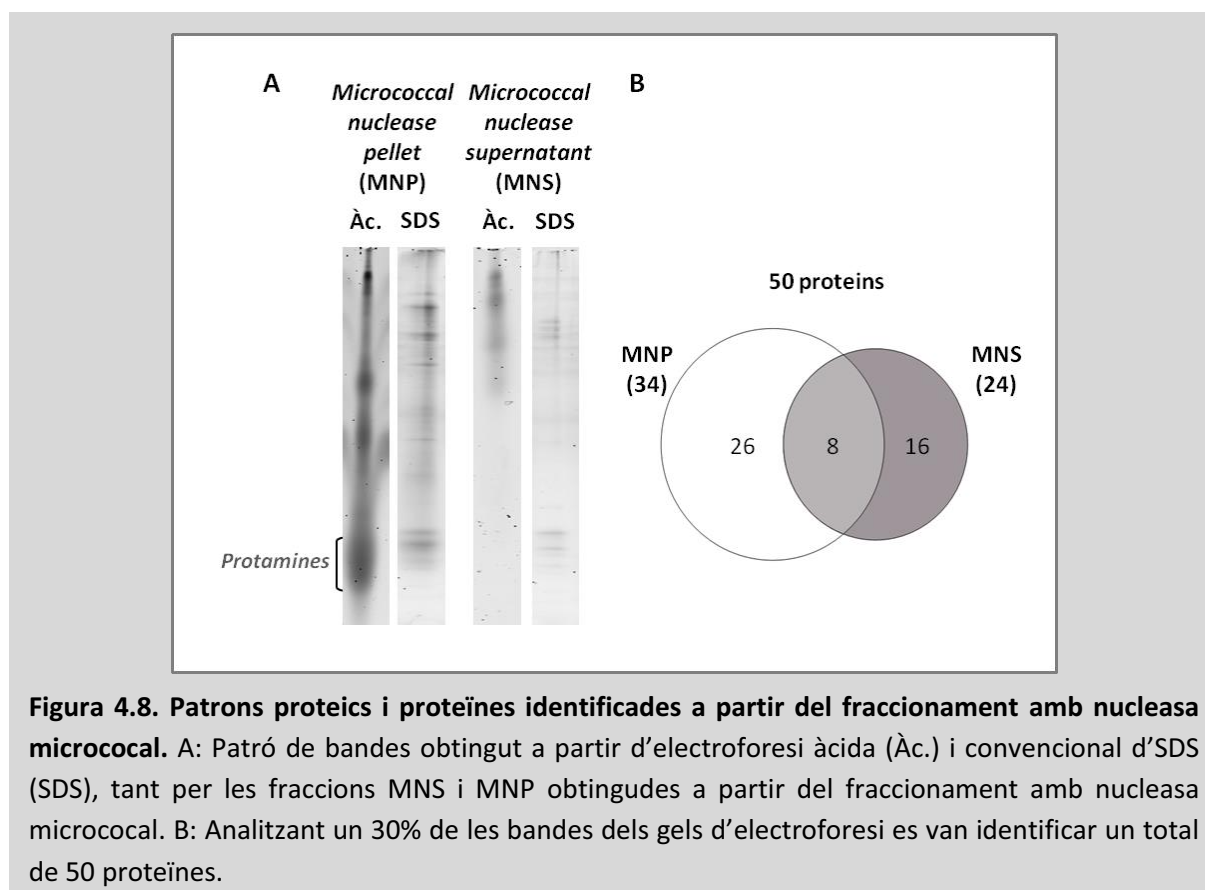


Figura 4.8. Patrons proteics i proteïnes identificades a partir del fraccionament amb nucleasa micrococcal. A: Patró de bandes obtingut a partir d'electroforesi àcida (Àc.) i convencional d' SDS (SDS), tant per les fraccions MNS i MNP obtingudes a partir del fraccionament amb nucleasa micrococcal. B: Analitzant un 30% de les bandes dels gels d'electroforesi es van identificar un total de 50 proteïnes.

Taula 4.5. Selecció de termes de Gene Ontology Biological Process enriquets en les regions de DNA associades a histones obtingudes a partir de NaCl 0,65 M i enzims de restricció o nucleasa micrococcal. La llista completa de termes es troba a la tesi del Dr. Rubén Azpiazu (Distribució diferencial de gens en la cromatina espermàtica i detecció de proteïnes presents en una abundància alterada en pacients infèrtils. Juny 2014, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona).

Identificació GO	Terme GO BP	Nombre de gens	%	P-value
NaCl 0,65 M i enzims de restricció				
GO:0048598	<i>embryonic morphogenesis</i>	72	3,20	3,95E-08
GO:0006357	<i>regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>	138	6,14	4,93E-08
GO:0060537	<i>muscle tissue development</i>	37	1,65	3,99E-07
GO:0030182	<i>neuron differentiation</i>	90	4,00	4,53E-07
GO:0009792	<i>embryonic development ending in birth or egg hatching</i>	73	3,25	5,94E-07
GO:0048562	<i>embryonic organ morphogenesis</i>	38	1,69	7,13E-07
GO:0045941	<i>positive regulation of transcription</i>	108	4,80	1,10E-06
GO:0007389	<i>pattern specification process</i>	61	2,71	1,23E-06
GO:0007519	<i>skeletal muscle tissue development</i>	24	1,07	1,36E-06
GO:0051270	<i>regulation of cell motion</i>	48	2,13	1,69E-06
GO:0045935	<i>positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process</i>	116	5,16	1,96E-06
Nucleasa micrococcal				
GO:0048598	<i>embryonic morphogenesis</i>	86	3,44	2,37E-11
GO:0030182	<i>neuron differentiation</i>	108	4,32	2,53E-10
GO:0006796	<i>phosphate metabolic process</i>	191	7,65	2,86E-08
GO:0030030	<i>cell projection organization</i>	87	3,48	1,28E-07
GO:0048562	<i>embryonic organ morphogenesis</i>	42	1,68	1,53E-07
GO:0000904	<i>cell morphogenesis involved in differentiation</i>	63	2,52	3,60E-07
GO:0003002	<i>Regionalization</i>	54	2,16	3,72E-07
GO:0007389	<i>pattern specification process</i>	67	2,68	4,51E-07
GO:0007242	<i>intracellular signaling cascade</i>	226	9,05	1,81E-06
GO:0010628	<i>positive regulation of gene expression</i>	119	4,76	1,97E-06
GO:0032989	<i>cellular component morphogenesis</i>	88	3,52	1,99E-06
GO:0048812	<i>neuron projection morphogenesis</i>	55	2,20	2,17E-06

D'aquesta manera, es va decidir procedir a identificar de forma pilot el 30% de les bandes corresponents al gel d' SDS de les dues fraccions, per tal de poder confirmar si s'havia obtingut o no dues fraccions proteiques diferents. Aquest experiment preliminar va donar lloc a la caracterització de només 50 proteïnes (Figura 4.8; Taula suplementària 8.3.2 de l'Annex 8.3), indicant que l'eficiència d'identificació era molt menor que aquella que s'havia aconseguit amb el mètode del NaCl 0,65 M. Per tant, en aquesta tesi doctoral,

4. Resultats

l'estudi complet de la caracterització de la distribució de proteïnes nuclears relacionat amb la cromatina espermàtica i comparació entre fraccions es va dur a terme només a partir dels resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi proteòmic complet de totes les proteïnes extretes de la FS i la FI amb el mètode de NaCl 0,65M.

La identificació completa mitjançant LC-MS/MS per les fraccions FS i FI de la cromatina espermàtica va resultar en la caracterització de 393 proteïnes exclusives de la FS, 20 de la FI i 82 comunes a les dues fraccions (Figura 4.9 i Taula suplementària 8.3.1 de l'Annex 8.3), el que va acabar de confirmar la presència d'una composició proteica diferent, tal i com s'havia pensat en un primer moment a partir de la visualització dels gels d'acrilamida (Figura 4.7). El fet d'identificar proteïnes en comú entre les dues fraccions podria ser degut a una afinitat intermèdia de les mateixes amb la cromatina espermàtica. Tot i així, també s'han de tenir en compte possibles causes metodològiques, com per exemple la possible presència de restes de sobrenedant en el sediment una vegada realitzat el fraccionament.

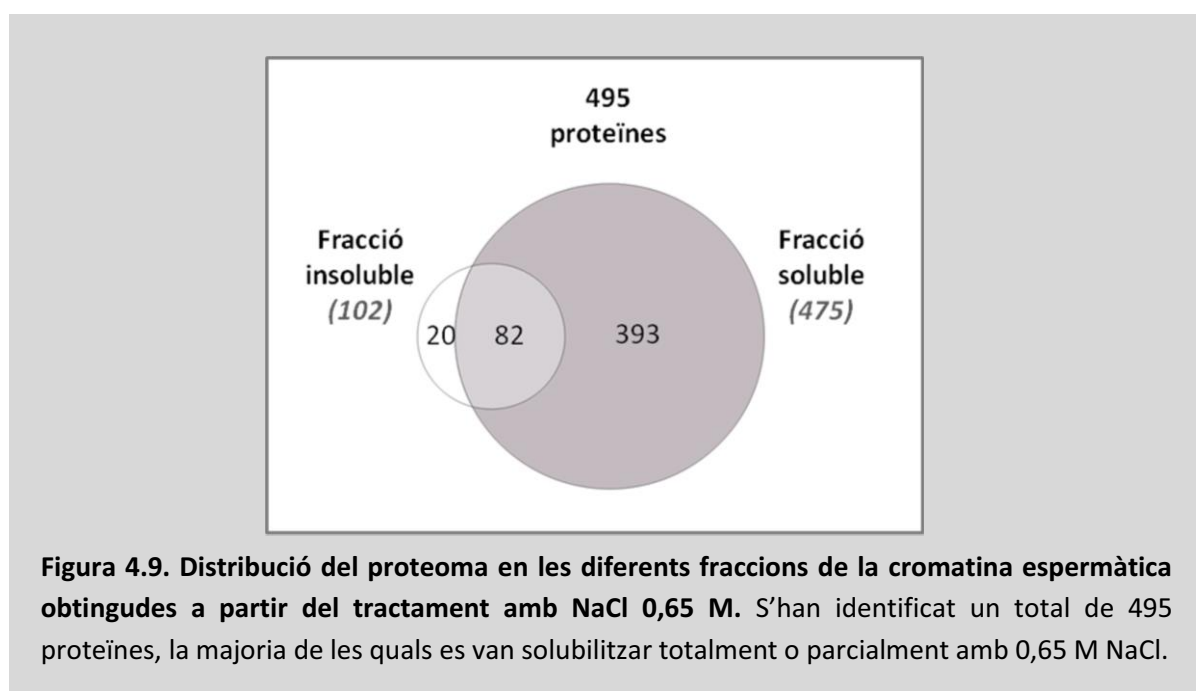


Figura 4.9. Distribució del proteoma en les diferents fraccions de la cromatina espermàtica obtingudes a partir del tractament amb NaCl 0,65 M. S'han identificat un total de 495 proteïnes, la majoria de les quals es van solubilitzar totalment o parcialment amb 0,65 M NaCl.

En qualsevol cas, el mètode del NaCl 0,65 M va permetre observar dos grups de proteïnes que presentaven una afinitat diferent pel DNA espermàtic:

- 1) Totes les proteïnes que han sigut solubilitzades en presència de NaCl 0,65 M, ja sigui totalment o parcialment, i que, per tant, s'han trobat a la FS. Es tracta d'un total de 475 proteïnes diferents (393 úniques de la FS + 82 en comú amb la FI = 475), les quals a partir d'ara es consideraran totes com FS (Figura 4.9 i Taula suplementària 8.3.1 de l'Annex 8.3).

- 2) Proteïnes que no es solubilitzen en presència de NaCl 0,65 M i que, per tant, només s'han detectat a la FI. Es tracta d'un total de 20 proteïnes diferents, les quals a partir d'ara seran les úniques considerades com FI (Figura 4.9 i Taula suplementària 8.3.1 de l'Annex 8.3)

L'anàlisi comparatiu de les funcions cel·lulars en les que es troben involucrades les proteïnes presents en els dos conjunts proteics detectats es va dur a terme de forma manual mitjançant la informació continguda a la base de dades UniprotKB. Es va observar com els tres grups de proteïnes més abundants a la FS es trobaven relacionats amb metabolisme de proteïnes (25%), activitat catalítica (21%) i empaquetament del DNA, unió a DNA/RNA i transcripció (12%; Figura 4.10). De forma contrària, el grup més abundant en la FI va consistir en proteïnes que presentaven una funció estructural (50%; Figura 4.10). Aquests resultats van ser confirmats seguidament mitjançant un anàlisi d'enriquiment de categories GO BP mitjançant l'eina bioinformàtica DAVID v6.7 (Taula 4.6 i Taula suplementària 8.3.3 de l'Annex 8.3). D'aquesta manera, es va observar com la fracció proteica FS es trobava enriquida de forma significativa (P-value amb correcció de Bonferroni <0,001) en termes de processos biològics relacionats amb metabolisme de proteïnes, com per exemple *regulation of protein ubiquitination*, i activitat catalítica, com és *generation of precursor metabolites and energy*. A més a més, es va observar també un enriquiment en les categories de *DNA packaging*, *nucleosome assembly*, *chromatin assembly*, *protein-DNA complex assembly* i *nucleosome organization* (Taula 4.6 i Taula suplementària 8.3.3 de l'Annex 8.3). En canvi, el mateix anàlisi dut a terme amb les proteïnes presents a la FI no va mostrar cap associació estadísticament significativa.

Mitjançant la informació continguda a la base de dades UniprotKB es va observar com 182 proteïnes de les 495 identificades presentaven una localització nuclear descrita i confirmada (180 de la FS i 2 de la FI; Taula 4.7 i Figura 4.11). La resta, o presentaven altres localitzacions o bé aquesta era desconeguda. Entre aquestes proteïnes considerades, sense cap dubte, com nuclears, es van identificar 18 variants d'histones diferents. Tot i haver utilitzat un mètode específic de dissociació d'histones, 1 variant es va identificar exclusivament a la FI. La histona que va resultar ser resistent al tractament salí corresponia a la H2A.X i la seva presència específica a la FI va ser confirmada mitjançant experiments de Western Blot (Taula 4.7 i Figura 4.11). Per altra banda, entre les proteïnes nuclears associades a la FS es van identificar diferents factors de transcripció i proteïnes contenidores de dominis *zinc finger* (Taula 4.7 i Figura 4.11). Pertanyent a aquest últim grup es troba la proteïna *Histone lysine demethylase PHF8*, la qual no havia estat identificada com a part del gàmeta masculí en cap estudi realitzat anteriorment. Per aquest motiu, la seva expressió en el nucli espermàtic es va confirmar mitjançant immunofluorescència (Figura 4.12).

4. Resultats

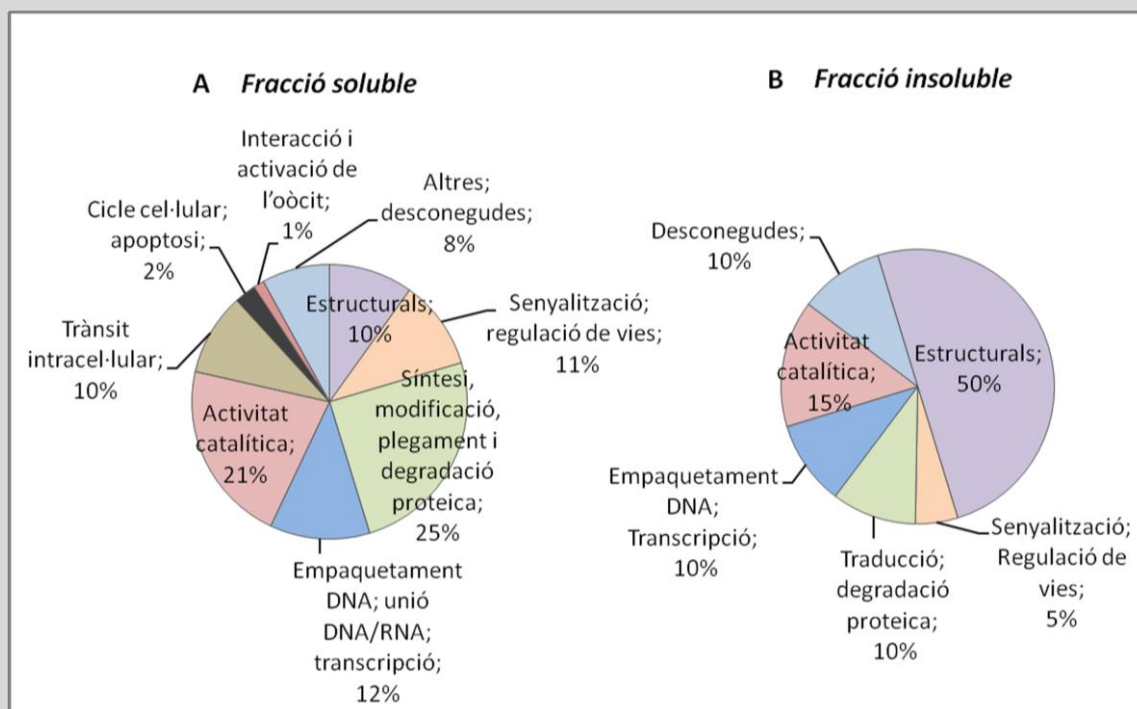


Figura 4.10. Categories funcionals de les proteïnes identificades mitjançant el fraccionament de la cromatina amb NaCl 0,65 M. Les funcions es van determinar d'acord amb la informació establerta a la base de dades UniprotKB. A: proteïnes de la fracció soluble. B: proteïnes de la fracció insoluble.

Taula 4.6. Termes Gene Ontology Biological Process més representatius enriquits en la fracció soluble de la cromatina espermàtica. P-values amb la correcció de Bonferroni < 0,001, obtinguts amb l'eina DAVID v6.7 (llista completa a la taula suplementària 8.3.3. de l'Annex 8.3).

Identificació GO	Terme GO BP	Nombre proteïnes	%	P-value	Bonferroni
GO:0031396	<i>Regulation of protein ubiquitination</i>	34	7.28	2.61E-26	4.46E-23
GO:0006091	<i>Generation of precursor metabolites and energy</i>	41	8.78	2.43E-15	4.16E-12
GO:0031399	<i>Regulation of protein modification process</i>	39	8.35	9.77E-15	1.67E-11
GO:0030163	<i>Protein catabolic process</i>	56	12	1.19E-13	2.02E-10
GO:0005996	<i>Monosaccharide metabolic process</i>	30	6.42	1.14E-11	1.94E-08
GO:0006508	<i>Proteolysis</i>	72	15.4	1.52E-11	2.59E-08
GO:0006323	<i>DNA packaging</i>	22	4.71	2.00E-11	3.41E-08
GO:0007049	<i>Cell cycle</i>	55	11.8	1.91E-09	3.25E-06
GO:0051186	<i>Cofactor metabolic process</i>	25	5.35	2.42E-09	4.13E-06
GO:0006461	<i>Protein complex assembly</i>	39	8.35	8.03E-08	1.37E-04
GO:0034613	<i>Cellular protein localization</i>	34	7.28	1.35E-07	2.31E-04
GO:0006457	<i>Protein folding</i>	21	4.5	2.21E-07	3.78E-04
GO:0019953	<i>Sexual reproduction</i>	35	7.49	5.47E-07	9.33E-04

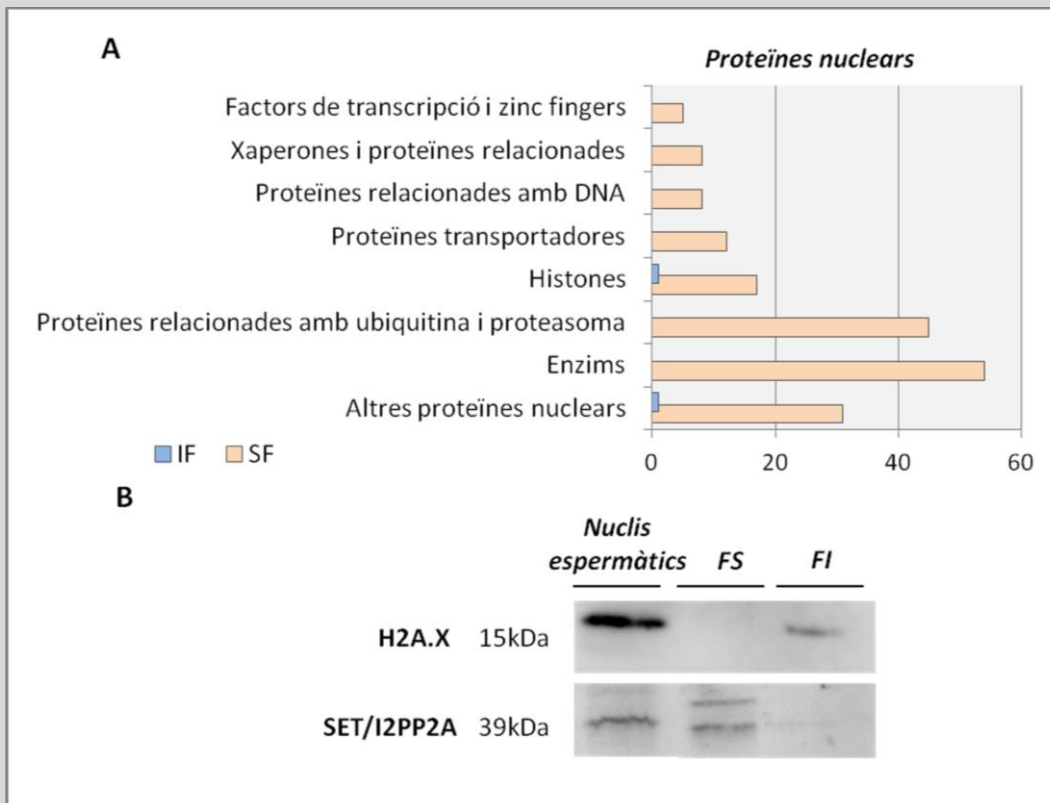


Figura 4.11. Proteïnes nuclears obtingudes mitjançant el fraccionament de la cromatina amb NaCl 0,65M i immunodetecció de dos representants. A: Categories de les proteïnes segons la informació de la base de dades UniprotKB. B: detecció de la histona H2A.X i la proteïna SET/I2PP2A en extractes de nuclis espermàtics normozoospèrmics i en les fraccions soluble (FS) i insoluble (FI) de la cromatina.

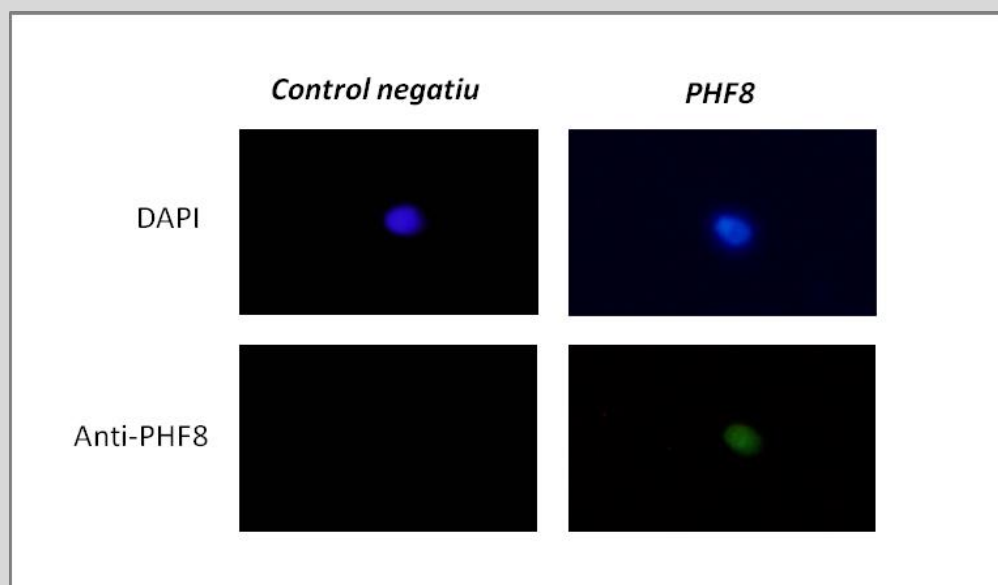


Figura 4.12. Expressió de PHF8 en mostres d'espermatozoides normozoospèrmics. Detecció per immunofluorescència de PHF8 (verd) en espermatozoide. El control negatiu es va dur a terme en absència d'anticòs primari. El nucli cel·lular es troba tenyit amb DAPI (blau).

Taula 4.7. Proteïnes nuclears amb possibles papers reguladors o participació en embriogènesi identificats en la fracció soluble (FS) i insoluble (FI) de la cromatina espermàtica.

Nombre d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Gen	Paper regulador	FS/FI
Histones				
O60814	<i>Histone H2B type 1-K</i>	HIST1H2BK	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
P04908	<i>Histone H2A type 1-B/E</i>	HIST1H2AB/AE	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
POC0S5	<i>Histone H2A.Z</i>	H2AFZ	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
POC5Y9	<i>Histone H2A-Bbd type 1</i>	H2AFB1	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
POC5Z0	<i>Histone H2A-Bbd type 2/3</i>	H2AFB2	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
P16104	<i>Histone H2A.x</i>	H2AFX	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FI
P22492	<i>Histone H1t</i>	HIST1H1T	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
P23527	<i>Histone H2B type 1-O</i>	HIST1H2BO	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
P58876	<i>Histone H2B type 1-D</i>	HIST1H2BD	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
P62805	<i>Histone H4</i>	HIST1H4A	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
P84243	<i>Histone H3.3</i>	H3F3A	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q16777	<i>Histone H2A type 2-C</i>	HIST2H2AC	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q6NXT2	<i>Histone H3.3C</i>	H3F3C	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q75WM6	<i>Testis-specFlic H1 histone</i>	H1FNT	Empaquetament de DNA i transició NH-NP	FS
Q8IU66	<i>Histone H2A type 2-B</i>	HIST2H2AB	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q96A08	<i>Histone H2B type 1-A</i>	HIST1H2BA	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q96KK5	<i>Histone H2A type 1-H</i>	HIST1H2AH	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q96QV6	<i>Histone H2A type 1-A</i>	HIST1H2AA	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Factors de transcripció i proteïnes contenidores de zinc fingers				
O43298	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 43</i>	ZBTB43	Regulació transcripcional	FS
P58340	<i>Myeloid leukemia factor 1</i>	MLF1	Regulació transcripcional	FS
P68104	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	EEF1A1	Regulació transcripcional	FS
Q9BWX1	<i>PHD finger protein 7</i>	PHF7	Regulació transcripcional	FS
Q9UPP1	<i>Histone lysine demethylase PHF8</i>	PHF8	Regulació transcripcional	FS
Proteïnes relacionades amb el DNA				
P18754	<i>Regulator of chromosome condensation</i>	RCC1	Empaquetament del DNA	FS

P55209	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	NAP1L1	Empaquetament del DNA	FS
Q01105	<i>Protein SET</i>	SET	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q99733	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 4</i>	NAP1L4	Empaquetament del DNA	FS
Proteïnes relacionades amb proteasoma i ubiquitina				
O14818	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	PSMA7	Regulació transcripcional	FS
P60900	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>	PSMA6	Regulació transcripcional	FS
Q13618	<i>Cullin-3</i>	CUL3	Divisió cèl·lules mare embrionàries	FS
Q13620	<i>Cullin-4B</i>	CUL4B	Divisió cèl·lules mare embrionàries	FS
Q93009	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7</i>	USP7	Desenvolupament embrionari	FS
Enzims				
O75928	<i>E3 SUMO-protein ligase PIAS2</i>	PIAS2	Regulació transcripcional	FS
P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	Regulació transcripcional	FS
P06733	<i>Alpha-enolase</i>	ENO1	Regulació transcripcional	FS
P19784	<i>Casein kinase II subunit alpha</i>	CSNK2A2	Regulació transcripcional	FS
P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	NME2	Regulació transcripcional	FS
P49841	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>	GSK3B	Regulació transcripcional	FS
P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>	TPI1	Desenvolupament embrionari	FS
P63279	<i>SUMO-conjugating enzyme UBC9</i>	UBE2I	Arquitectura nuclear i segregació cromosòmica	FS
P68400	<i>Casein kinase II subunit alpha</i>	CSNK2A1	Regulació transcripcional	FS
Q86YW0	<i>bisphosphate phosphodiesterase zeta-1</i>	PLCZ1	Desenvolupament embrionari	FS
Q96SB4	<i>Serine/threonine-protein kinase SRPK1</i>	SRPK1	Empaquetament del DNA	FS
Q9BXA6	<i>Testis-specFlic serine/threonine-protein kinase 6</i>	TSSK6	Empaquetament del DNA	FS
Altres proteïnes nuclears				
P06702	<i>Protein S100-A9</i>	S100A9	Regulació transcripcional	FS
P27348	<i>14-3-3 protein theta</i>	YWHAQ	Regulació transcripcional	FS
P62826	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	RAN	Empaquetament de DNA i regulació transcripcional	FS
Q04727	<i>Transducin-like enhancer protein 4</i>	TLE4	Regulació transcripcional	FS
Q86VP6	<i>Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1</i>	CAND1	Regulació transcripcional	FS
Q9Y230	<i>RuvB-like 2</i>	RUVBL2	Histone modFlication and Regulació transcripcional	FS
Q9Y265	<i>RuvB-like 1</i>	RUVBL1	Histone modFlication and Regulació transcripcional	FS

4. Resultats

A més a més de factors de transcripció, en aquest estudi també es van identificar altres proteïnes relacionades amb el DNA que podrien presentar funcions reguladores, les quals pertanyien totes a la FS de la cromatina espermàtica (Figura 4.11 i Taula 4.7). Un exemple representatiu d'aquest grup de proteïnes és la proteïna SET, també anomenada *Phosphatase 2A inhibidor* (I2PP2A), la qual es trobaria involucrada en la formació dels nucleosomes, entre d'altres processos, tot i que no existeixen estudis que l'estudiïn en detall en l'espermatozoide. D'aquesta manera, es va confirmar la distribució diferencial de la proteïna SET/I2PP2A, com a representant de la FS, mitjançant experiments de Western Blot (Figura 4.11).

També cal destacar la identificació d'un grup d'enzims i proteïnes relacionades amb ubiquitina/proteasoma amb localització nuclear i d'altres nucleoproteïnes que, segons la informació d'UniprotKB, es trobarien relacionades amb processos de regulació de la transcripció, empaquetament del DNA, modificació d'histones o desenvolupament de l'embrió (Figura 4.11 i Taula 4.7). Totes aquestes proteïnes es van identificar com a part de la FS de la cromatina espermàtica.

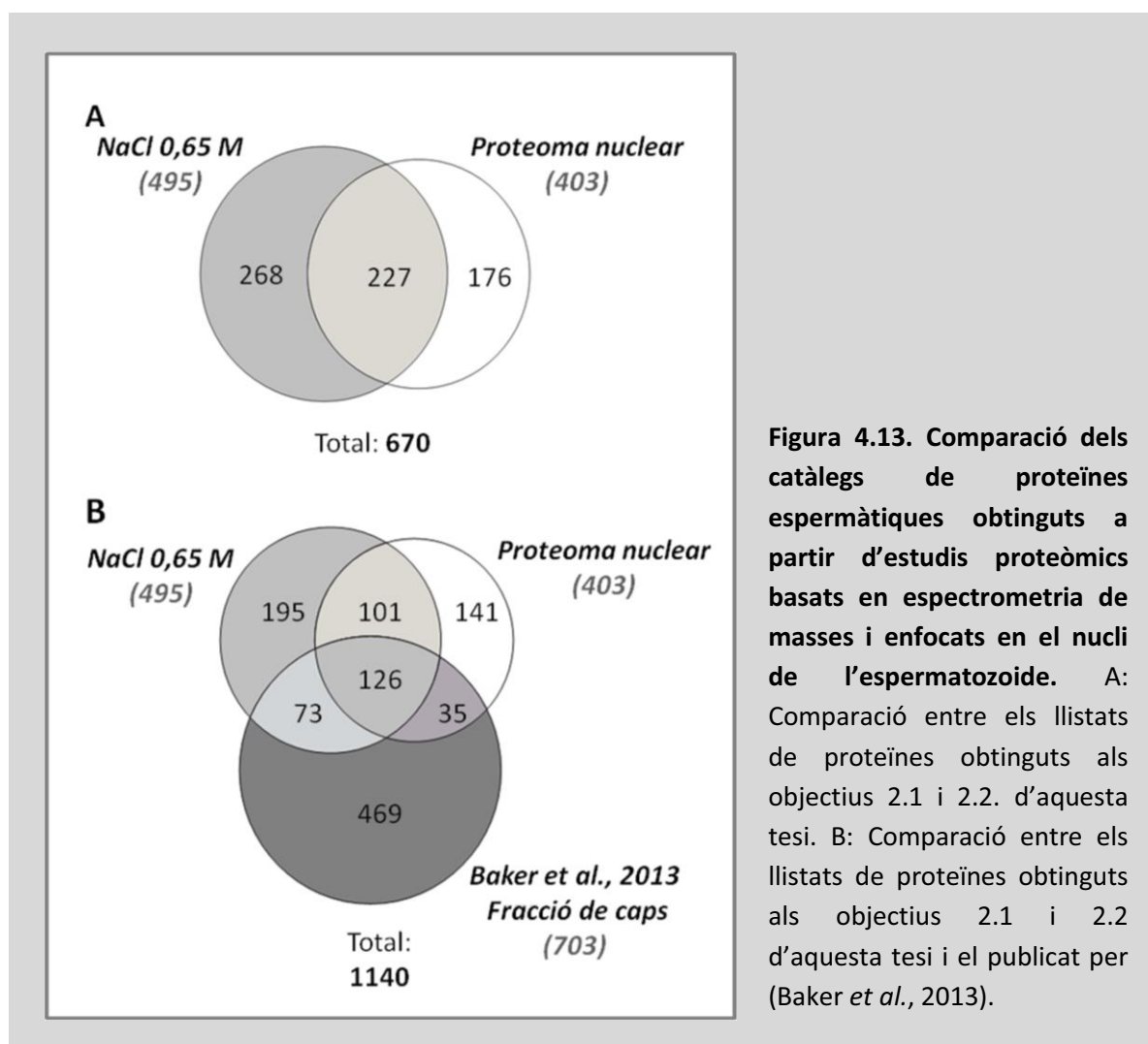


Figura 4.13. Comparació dels catàlegs de proteïnes espermàtiques obtinguts a partir d'estudis proteòmics basats en espectrometria de masses i enfocats en el nucli de l'espermatozoide. A: Comparació entre els llistats de proteïnes obtinguts als objectius 2.1 i 2.2. d'aquesta tesi. **B:** Comparació entre els llistats de proteïnes obtinguts als objectius 2.1 i 2.2 d'aquesta tesi i el publicat per (Baker et al., 2013).

Tot i que en els dos projectes de proteòmica subcel·lular duts a terme en aquesta tesi, descrits en aquest apartat 2.2 i en l'anterior 2.1, s'ha dut a terme l'anàlisi partint de nuclis d'espermatòzoides normozoospèrmics, la incorporació d'un pas de fraccionament de la cromatina prèviament a la identificació per MS ha permès la caracterització de proteïnes addicionals. Si es comparen ambdós catàlegs, es detecten 176 proteïnes que es van detectar únicament en l'anàlisi del nucli intactes, 268 només després del tractament amb NaCl 0,65 M i 227 proteïnes identificades en ambdós estudis (Figura 4.13). D'aquesta manera, en global, en els anàlisis proteòmics duts a terme en aquest segon objectiu, s'han arribat a identificar un total de 670 proteïnes a partir de nuclis aïllats d'espermatòzoides humans. Per altra banda, durant la realització d'aquesta tesi es va publicar un estudi enfocat en la caracterització proteòmica del cap de l'espermatòzoide humà (Baker *et al.*, 2013). Tot i que l'estudi esmentat no només engloba el nucli, si no també altres estructures del cap, sembla interessant establir la comparació entre els tres llistats proteïcs. D'aquesta manera, els tres estudis proteòmics presenten 126 proteïnes en comú, mentre que a la vegada cadascun d'ells identifica proteïnes no presents en els altres dos (Figura 4.13), arribant entre tots tres a un total de 1140 proteïnes diferents i no redundants relacionades amb la totalitat del cap de la cèl·lula espermàtica.

4.3. El proteoma nuclear de l'espermatozoide humà combinat, el seu potencial epigenètic i l'estat de conservació⁷.

Els estudis proteòmics enfocats en el nucli de la cèl·lula espermàtica, com són els duts a terme als apartats 4.2.1 i 4.2.2. d'aquesta tesi doctoral, afavoreixen la identificació de proteïnes nuclears. No obstant, altres estudis utilitzant la cèl·lula sencera també han sigut capaços d'identificar proteïnes nuclears addicionals, tot i que en menor quantitat. Per aquest motiu, la generació d'un catàleg de proteïnes nuclears espermàtiques complet es va dur a terme a partir de tota la informació generada en estudis basats en espectrometria de masses i publicada fins l'actualitat. Es va utilitzar el llistat de proteïnes espermàtiques humanes més complet publicat (Amaral *et al.*, 2014), el qual es troba constituït per 6198 proteïnes diferents, integrant els catàlegs proporcionats per 30 estudis proteòmics duts a terme utilitzant tant la cèl·lula espermàtica completa, com subfraccionaments de la mateixa (Veure Secció 1.4.3. de la Introducció). En aquest llistat es troben englobades les proteïnes identificades a l'objectiu 2.1. d'aquesta tesi. Totes les proteïnes incloses contenen uns estàndards de qualitat mínims pel que fa a la puresa de les cèl·lules, el mètode de MS utilitzat i el criteri d'identificació proteica seguit (Amaral *et al.*, 2014).

Per tal d'identificar quines proteïnes espermàtiques podien estar involucrades en funcions nuclears i de la cromatina, en primer lloc es van seleccionar totes aquelles que es trobaven englobades al menys en una categoria de GO *Cellular Component* relacionada amb nucli, utilitzant l'eina DAVID v6.7. Seguidament, es va completar l'anàlisi mitjançant una cerca basada en paraules clau. D'aquesta manera, es van seleccionar totes aquelles proteïnes que contenen en el seu nom un o més dels termes següents: *histone, bromodomain, transcription, DNA, nuclear/nucleus/nucleo, meiosis/meiotic, cell cycle/division, zinc finger, homeodomain, homeobox, chromodomain and plant homeodomain (PHD) Finger*. Per tant, es va acabar generant dues llistes de proteïnes espermàtiques nuclears (una basada en termes de GO i una altra obtinguda de forma manual) que es van combinar i revisar proteïna per proteïna, a la vegada que es comprovava la seva funció a partir de la informació inclosa a la base de dades UniprotKB. Finalment, es va arribar a generar una llista acurada de 581 proteïnes espermàtiques nuclears (Taula suplementària de l'Annex 8.4).

El grup de proteïnes més abundant al nucli de l'espermatozoide va ser el format per proteïnes contenedores de *zinc fingers* o *bromodomains* (15,3%; Taula 4.8). Altres grups de proteïnes abundants foren aquells formats per factors de transcripció (13,4%), histones i modificadors d'histones (11,5%), altres proteïnes relacionades amb el DNA (8,7%),

⁷ Els resultats que s'inclouen en aquest apartat es troben publicats a l'article **Castillo, J., Amaral, A., and Oliva, R. (2014). Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology* 3, 326–338**, que es troba a l'Annex 8.4.

ribonucleoproteïnes (7,2%), proteïnes implicades en la meiosi o cicle cel·lular (5,8%) i proteïnes del porus nuclear (4,8%). La resta de les nucleoproteïnes espermàtiques compilades pertanyien a altres grups menys abundants (Taula 4.8).

Taula 4.8. Nombre de proteïnes identificades per cadascuna de les famílies de nucleoproteïnes més destacades que han sigut descrites en els proteomes d'espermatozoide de humà (*Homo sapiens*), de ratolí (*Mus musculus*), de rata (*Rattus norvegicus*) i de macaco (*Macacca mulatta*), mitjançant espectrometria de masses.

	Humà	Ratolí	Rata	Macaco
<i>Proteïnes contenidores de dominis zing fingers i bromodomains</i>	89	14	2	17
<i>Histones i modificadors d'histones</i>	67	31	5	9
<i>Factors de transcripció</i>	78	18	1	3
<i>Proteïnes relacionades amb el DNA</i>	51	33	5	18
<i>Ribonucleoproteïnes</i>	42	35	1	3
<i>Proteïnes implicades en meiosi o cicle cel·lular</i>	34	15	1	5
<i>Proteïnes del porus nuclear</i>	28	16	4	3
<i>Altres nucleoproteïnes</i>	192	37	3	7
<i>Total de proteïnes</i>	581	199	22	65

L'anàlisi del catàleg complet de proteïnes nuclears presents a l'espermatozoide humà madur mitjançant l'eina DAVID va permetre identificar els processos biològics presents o enriquits en el nucli del gàmeta masculí. D'aquesta manera, es va observar com el 56% de les proteïnes espermàtiques nuclears presentaven una funció relacionada amb processos epigenètics o reguladors, ja que contenien al menys un dels següents termes GO BP (P-value amb correcció de Benjamini <0,001): *chromosome organization, chromatin organization, protein-DNA complex assembly, DNA packaging, gene expression, transcription, chromatin modification* i *histone modification* (Taula 4.9 i Figura 4.14).

4. Resultats

Taula 4.9. Categories de Gene Ontology Biological Process enriquides en el proteoma nuclear de l'espermatozoide humà relacionades amb cromatina. Les categories han sigut ajuntades per relació amb processos biològics similars. Anàlisi mitjançant DAVID v6.7. P-values amb la correcció de Benjamini < 0,001.

Categoria GO Biological Process	Nombre de proteïnes	P-value (Benjamini)
Organització cromosòmica	132	9.60E-78
Organització de la cromatina	101	4.60E-57
<i>Muntatge i desmuntatge de la cromatina</i>	59	1.50E-47
<i>Organització nucleosòmica</i>	52	4.90E-47
<i>Muntatge de nucleosomes</i>	49	1.60E-45
Muntatge complexe proteïna-DNA	51	3.00E-46
Empaquetament de DNA	57	2.20E-47
Expressió gènica	212	4.40E-27
<i>Regulació de l'expressió gènica</i>	199	2.90E-22
Transcripció	159	3.10E-20
<i>Regulació de la transcripció</i>	180	3.20E-19
<i>Iniciació de la transcripció pel promotor de la RNA polimerasa II</i>	12	2.80E-04
<i>Elongació d'RNA</i>	10	9.60E-04
Modificació de la cromatina	47	3.00E-17
<i>Remodelació de la cromatina</i>	13	9.30E-06
Modificació d'histones	23	7.80E-09
<i>Acetilació histona H2A</i>	8	1.10E-06
<i>Acetilació histona H4</i>	8	6.00E-05
<i>Acetilació d'histones</i>	12	1.30E-05

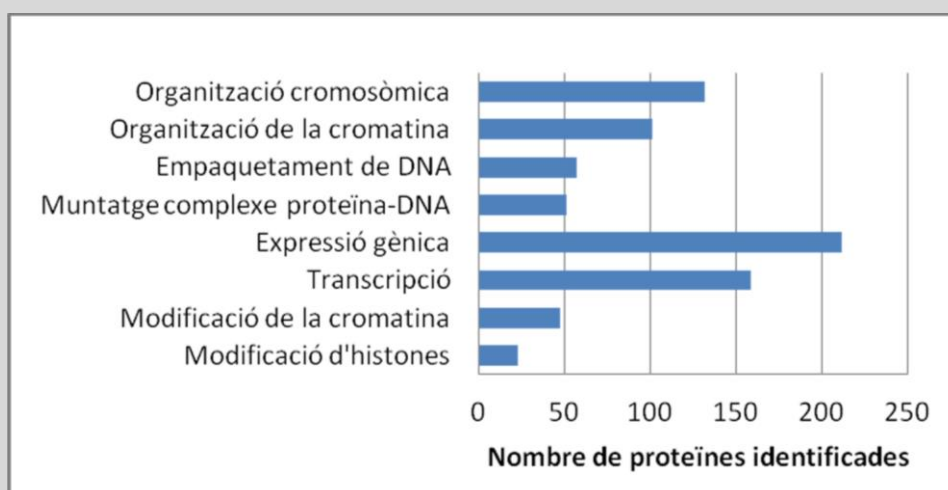


Figura 4.14. Processos biològics relacionats amb funcions epigenètiques enriquits en el proteoma nuclear de l'espermatozoide humà. Abundància de les categories més representatives de Gene Ontology Biological Process relacionades amb la cromatina (exposades a la taula 4.9) més representatives.

De la mateixa manera que s'havia dut a terme amb l'espermatozoide humà, i per tal de comparar el proteoma nuclear amb el d'espècies models de mamífers, es van utilitzar els catàlegs de proteïnes espermàtiques publicats per compilar i elaborar una llista acurada de nucleoproteïnes espermàtiques en altres organismes. Per tal d'evitar la obtenció de possibles resultats esbiaixats i de facilitar l'estudi comparatiu, es van seleccionar els catàlegs proteòmics disponibles de mamífers utilitzant els següents criteris d'inclusió:

- Els espermatozoides van ser extrets de regions caudals de l'epidídim, ja que l'anàlisi es troba enfocat en la identificació de proteïnes nuclears de l'espermatozoide madur.
- Es va realitzar un pas inicial de purificació de la mostra i comprovació de la mateixa.
- El pèptids van ser generats per *in-solution digestion* o *in-gel digestion* després de la separació per electroforesis monodimensionals. Per tant, les estratègies basades en electroforesis 2D no es van incloure a l'anàlisi.
- La identificació proteica es va dur a terme a partir de LC-MS/MS, amb al menys dos pèptids per proteïna amb un FDR < 5% o un pèptid per proteïna amb FDR < 1%, resultant en la identificació d'almenys 100 proteïnes diferents.

D'aquesta manera, es van compilar i analitzar llistats de proteïnes que constituïen els proteomes espermàtics de ratolí (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*) i macaco (*Macacca mulatta*; Taula 4.10).

Després de la identificació de proteïnes nuclears per a cadascuna de les espècies esmentades a partir de l'anàlisi mitjançant DAVID v6.7 en primer lloc, i el manual a través de paraules clau en segon lloc, es van identificar un total de 199 proteïnes nuclears en l'espermatozoide de ratolí, 22 en el de rata i 65 en el del macaco (Taula 4.8). Tot i que entre els catàlegs de nucleoproteïnes obtinguts destaquen la presència d'un gran nombre de proteïnes catalogades com *unknown*, *hypothetical* o *predicted*, membres de tots els grups de proteïnes nuclears detectats en l'espermatozoide humà es trobaven presents en els tres organismes analitzats, incloent modificadors d'histones, factors de transcripció, proteïnes contenidores de dominis *zinc fingers* i *bromodomains* i altres proteïnes relacionades amb el DNA (Taula 4.8). A més a més, l'anàlisi del catàleg de proteïnes nuclears murines mitjançant DAVID va mostrar un enriquiment en proteïnes involucrades en processos de remodelació de la cromatina (Figura 4.15).

Taula 4.10. Resum dels estudis proteòmics duts a terme en espècies models de mamífers inclosos a l'anàlisi.

Referència	Mostres	Preparació/purificació de la mostra	Mètodes de separació i digestió de proteïnes	Tècnica de MS	Nombre de proteïnes identificades
Ratolí					
Baker <i>et al.</i> , 2008a	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	< 1 cèl·lula rodona/100.000 espermatozoides (anàlisi per microscopi)	<i>In-solution digestion</i> i isoelectroenfoc de pèptids	LC-MS/MS	858
Asano <i>et al.</i> , 2010	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	Purificació confirmada per microscopi de contrast de fases i mitjançant l'anàlisi de l'absència de la proteïna TER 119, específica de la membrana d'eritròcits	Electroforèsi 1D d' SDS i <i>in-gel digestion</i>	LC-MS/MS	190
Dorus <i>et al.</i> , 2010	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	Purificació confirmada per epifluorescència o microscopi de contrast d'interferència	<i>In-solution digestion</i>	HPLC-MS/MS	205
Chauvin <i>et al.</i> , 2012	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	99% de puresa. Sonicació.	<i>In-solution digestion</i> , fraccionament per cromatografia líquida <i>high-pH reversed-phase</i>	LC-MS/MS	2850
Guyonnet <i>et al.</i> , 2012	Espermatozoides de la regió caudal i caput de l'epidídim (només s'han inclòs proteïnes de la regió caudal)	Aïllament de la matriu acrosomal. Espermatozoides filtrats a través d'una membrana de nilon de 10 µm	Electroforèsi 1D d' SDS i <i>in-gel digestion</i>	LC-MS/MS	543
Rata					
Baker <i>et al.</i> , 2008b	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	Puresa >99,99% (anàlisi microscòpic)	<i>In-solution digestion</i> i isoelectroenfoc de pèptids	LC-MS/MS	829
Masseli <i>et al.</i> , 2012	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	Aïllament de caps espermàtics per sonicació. Rentat amb tampó hipotònic (0,45%)	Electroforèsi 1D d' SDS i <i>in-gel digestion</i>	LC-MS/MS	167
Macaco					
Skerget <i>et al.</i> , 2013	Espermatozoides de la regió caudal de l'epidídim	Rentat mitjançant diversos cicles de centrifugació amb solució de Ringer. Puresa confirmada per tinció de DNA i microscopi de fluorescència	Electroforèsi 1D d' SDS i <i>in-gel digestion</i> .	LC-MS/MS	1247

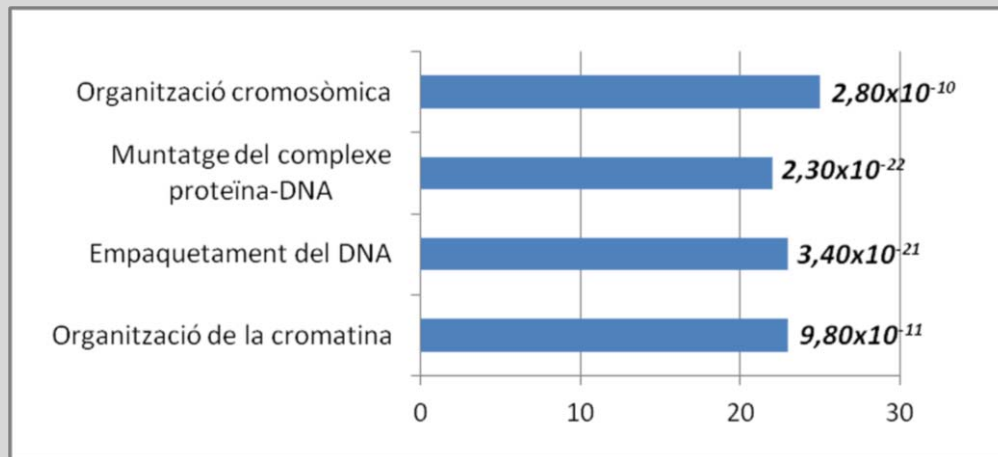


Figura 4.15. Processos biològics relacionats amb funcions epigenètiques enriquits en el proteoma nuclear de l'espermatozoide de ratolí. Abundància de les categories més representatives de *Gene Ontology Biological Process* relacionades amb la cromatina, obtingudes per anàlisi amb DAVID v6.7. Per cada categoria s'indica el P-value amb la correcció de Benjamini obtingut en l'anàlisi.

5. Discussió

5.1. L'efecte de les protamines en l'estructura de la cromatina espermàtica

Les protamines són les proteïnes nuclears més abundants de l'espermatozoide humà i es troben empaquetant entre un 85 i 95% del genoma patern humà. Tot i que la primera descripció de protamines data del 1874, encara hi ha alguns aspectes relacionats amb la seva implicació funcional que romanen desconeguts (Mezquita, 1985; Oliva *et al.*, 1988; Oliva and Dixon, 1991; Dahm, 2005; Oliva, 2006; Miller *et al.*, 2010). Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral contribueixen a entendre i a augmentar el coneixement d'aspectes relacionats amb la seva funció.

En primer lloc, s'ha mostrat com la quantitat total de protamines, tant de forma conjunta com individual, present a la fracció d'espermatozoides utilitzada en tractaments de reproducció assistida, es troba inversament relacionada amb la fragmentació del DNA, donant suport a la funció proposada per les protamines de protecció del material genètic patern (Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006; Balhorn, 2007). D'aquesta manera, s'ha observat com pacients infèrtils amb nivells de dany al DNA anormalment elevats presentaven una disminució significativa en els nivells de P1/DNA i P2/DNA, el que resultava a la mateixa vegada en una disminució dels nivells de P1+P2/DNA.

Si fem una cerca en la literatura, podem observar diversos estudis realitzats per tal de trobar relacions entre el grau de protaminació dels espermatozoides i la integritat del DNA espermàtic, utilitzant tècniques diferents per determinar ambdós paràmetres. Per exemple, alguns grups han dut a terme una determinació indirecta de la protaminació utilitzant la tinció de cromomicina A3 (CMA3), la qual s'uneix al DNA en zones pobres de protaminació emetent una fluorescència verda (Ramos *et al.*, 2004; Nasr-Esfahani *et al.*, 2005; Angelopoulou *et al.*, 2007; Plastira *et al.*, 2007; O'Flaherty *et al.*, 2008; Nili *et al.*, 2009; Tarozzi *et al.*, 2009; Tavalaei *et al.*, 2009). Altres estudis, en canvi, han valorat la protaminació de forma directa a partir d'electroforesis monodimensionals àcides mitjançant la relació P1/P2, com a mesura de desregulació de la protaminació (Aoki *et al.*, 2005b; Torregrosa *et al.*, 2006; García-Peiró *et al.*, 2011; Ribas-Maynou *et al.*, 2014). No obstant, l'ús dels quocients Protamina/DNA presenta avantatges respecte a les dues tècniques esmentades. Per una banda, és una estratègia directa, capaç de valorar la quantitat de P1 i P2 present en una mostra (en µg). Per altra banda, el quocient P1/P2 en comparació, tot i que ha sigut extensament utilitzat (Bench *et al.*, 1998; Mengual *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2005a; Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2009), es troba limitat pel fet que no pot proveir informació sobre si la desregulació ve donada per la P1, la P2 o ambdues. A més a més, no pot proporcionar dades del contingut total de protamines en la mostra. D'aquesta manera, l'ús de les relacions Protamina/DNA complementa l'anàlisi proporcionant una informació més completa sobre l'alteració en la protaminació en pacients infèrtils. Pel que fa a la determinació de la fragmentació del DNA mitjançant la

tècnica del Comet alcalí, aquesta també presenta avantatges respecte altres tècniques com el TUNEL, SCSA o SCD. Per una banda, és capaç de detectar tant talls en cadena doble de DNA com de cadena simple, a més a més presenta una gran sensibilitat i pot actuar com a un bon agent vaticinador d'embaràs (Simon *et al.*, 2010, 2011b; Ribas-Maynou *et al.*, 2013).

D'aquesta manera, en aquest estudi dut a terme per tal de resoldre el primer objectiu d'aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat una tècnica sensible que ens ha permès demostrar una correlació entre nivells de protamina disminuïts i un increment en la proporció de DNA danyat. Aquest resultat, com ja s'ha comentat, reforça la hipòtesi de protecció com a funció de les protamines. Un altre fet, observat per un altre grup, que també es troba en concordança amb aquesta idea és que ratolins amb insuficiència de protamines esdevenen infèrtils i presenten fragmentacions elevades de DNA en els espermatozoides (Cho *et al.*, 2001, 2003). Aitken i col·laboradors han arribat a proposar un mecanisme de generació de DNA fragmentat en espermatozoides de pacients infèrtils on les protamines es troben involucrades, el qual es troba constituït per 2 estadis. Es considera que els talls en la cadena de DNA estarien produïts en primer lloc per anormalitats donades durant la transició NH-NP que té lloc a la última fase de l'espermatogènesi, el que produiria un acoblament defectuós de les protamines. Aquest fet portaria al segon estadi, en el qual el DNA, degut a que es troba menys compactat, serà més vulnerable a l'atac de nucleases, mutàgens i al patiment d'estrès oxidatiu (Aitken and De Luliis, 2007; Aitken *et al.*, 2009).

No obstant, aquesta relació inversa entre els nivells de protamines i la proporció de fragmentació del DNA no es va posar de manifest en les mostres de semen inicials (sense cap tractament de selecció cel·lular) utilitzades en aquest estudi. Aquest fet es pot haver donat a causa de la gran dispersió obtinguda tant en les relacions protamina/DNA com en el percentatge de dany al DNA mesurat per Comet. Els ejaculats són per naturalesa composicions de cèl·lules molt heterogènies i, de fet, s'han observat variacions intraindividuals en mostres de semen en diferents estudis. Són exemples els valors de contingut de fòsfor i sulfur determinats en espermatozoides individuals, els quals poden trobar-se en un rang ampli de valors dintre d'una mateixa mostra (Bench *et al.*, 1998), així com també la concentració de protamina/cèl·lula detectada en pacients infèrtils (Aoki *et al.*, 2005b). Per aquest motiu, és important dur a terme una selecció dels espermatozoides de més qualitat d'un ejaculat a l'hora de realitzar tècniques de reproducció assistida. De fet, l'aplicació d'aquest tractament en les mostres incloses en aquest estudi va donar lloc a un subgrup d'espermatozoides amb valors disminuïts de fragmentació de DNA. Per altra banda, aquest subgrup també presentava quantitats menors de protamines, el que ens portaria a pensar que, tot i que aquestes proteïnes es troben duent a terme una funció de manteniment de la integritat del DNA, necessària per minimitzar la generació de mutacions i la seva transmissió a la descendència, la quantitat de protamines ha d'estar estretament regulada. De fet, com a continuació d'aquest treball, es van relacionar els valors de protamina/DNA i dany al DNA amb els resultats de reproducció assistida en els mateixos pacients. Tot i que aquests resultats no formen part d'aquesta tesi doctoral, sembla

interessant destacar l'observació d'una relació negativa entre la taxa de fertilització i la qualitat d'embrions amb nivells de protamines anormalment elevats (Simon *et al.*, 2011a). D'aquesta manera, el fet de presentar nivells de protamines incrementats podria alterar la composició de la cromatina espermàtica, reduint la proporció de DNA empaquetat de forma més laxa en nucleosomes. S'ha suggerit que les histones retingudes en l'espermatozoide humà podrien representar una marca epigenètica de gens necessaris per les primeres fases del desenvolupament embrionari (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009; Erkek *et al.*, 2013) i, per tant, una alteració en aquesta distribució podria afectar greument el procés de fertilització. De fet, alteracions en la retenció d'histones i en la distribució gènica s'han detectat tant en pacients infèrtils com en ratolins amb alteracions en l'espermatogènesi (Hammoud *et al.*, 2011; Ihara *et al.*, 2014). A més a més, i en concordança amb aquesta hipòtesi, recentment el nostre grup ha demostrat com espermatozoides de pacients normozoospermics amb els quals no es podia aconseguir embaràs mitjançant FIV presentaven quantitats majors d'histones que aquells que si aconseguien dur un embaràs a terme presentant la mateixa qualitat seminal (Azpiazu *et al.*, 2014).

Les histones mitjançant modificacions post-traduccionals (PTMs) formen l'anomenat codi d'histones, esdevenint un dels majors mediadors d'herència epigenètica de la línia germinal masculina (Jenuwein and Allis, 2001; Miller *et al.*, 2010; Carrell, 2012; Jenkins and Carrell, 2012a; Oliva and Ballesca, 2012). En el cas de les protamines, és coneguda la presència de fosforilacions tant en P1 (a l'extrem amino-terminal) com en P2 (a la part central de la seqüència), les quals es creu que serien necessàries durant el procés de condensació de la cromatina espermàtica a l'espermatogènesi (Pruslin *et al.*, 1987; Oliva and Dixon, 1991; Chirat *et al.*, 1993; Pirhonen *et al.*, 1994). En aquesta tesi doctoral, mitjançant l'anàlisi de protamines purificades intactes per espectrometria de masses hem arribat a confirmar aquests resultats inicials en espermatozoides madurs detectant la P1 humana amb incorporacions de masses corresponents a fosforilacions i trifosforilacions. A més a més, s'ha evidenciat la possible addició de grups acetils i metils tant a la P1 com al component P3 de la família de la protamina 2. En espermatozoide de ratolí s'ha reportat recentment la presència de PTMs tant en histones com en protamines, utilitzant tècniques de MS i trobant llocs de fosforilació en P1 i P2 coincidents amb els de l'espermatozoide humà (Brunner *et al.*, 2014). A més a més, en el mateix estudi es van detectar residus amb acetilacions i metilacions en la seqüència de la P2. Aquestes modificacions estarien presents en combinacions específiques i no donades a l'atzar, ja que mentre que acetilacions i metilacions s'han observat en la mateixa seqüència, les acetilacions i les fosforilacions semblaven ser excloents (Brunner *et al.*, 2014).

El fet que les protamines es trobin empaquetant el DNA d'una forma tan compacta que genera una estructura de la cromatina semicristal·lina fa dubtar de la presència d'un codi de protamines involucrat en l'expressió gènica. Tot i això, aquesta combinació de PTMs podria tenir una funció en altres processos, com per exemple en el control de la

desestabilització de la cromatina que portarà a la incorporació d'histones una vegada donada la fertilització. No obstant, aquesta teoria requereix ser investigada en més detall.

5.2. El proteoma nuclear de l'espermatozoide humà normal

A més a més d'histones i protamines, l'ús de tècniques proteòmiques d'alt rendiment ha permès la identificació de proteïnes nuclears addicionals a l'espermatozoide madur, les quals podrien estar relacionades amb funcions reguladores o funcions que no es creien actives en el gàmeta masculí (Martinez-Heredia *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2008). Amb el desenvolupament d'un disseny d'anàlisi proteòmic enfocat en el nucli espermàtic mitjançant subfraccionament de la cèl·lula hem pogut incrementar el coneixement proteic d'aquest compartiment. De fet, de les 403 proteïnes identificades a partir de nuclis aïllats mitjançant el mètode de CTAB 1% i la identificació per LC-MS/MS, més de la meitat no havien estat descrites anteriorment en cap estudi dut a terme amb espermatozoide humà. Per tant, ha sigut el primer cop que aquestes proteïnes s'han catalogat com espermàtiques. A més a més, tal i com s'esperava, es va obtenir un enriquiment en proteïnes amb localització nuclear descrita (39,4%), 72 de les quals es trobaven dintre del grup de proteïnes identificades per primer cop com part del proteoma del gàmeta masculí. La resta de proteïnes o es trobaven associades a altres compartiments o no presentaven dades sobre la seva localització subcel·lular. D'aquesta manera, el fet d'haver identificat totes aquestes proteïnes a partir de nuclis espermàtics purificats va proporcionar una primera evidència de possible localització nuclear. Tot i això, s'ha de tenir present que part de les proteïnes detectades que no són conegudes per ser nuclears podrien haver sigut identificades a causa d'una redistribució proteica durant el procediment de subfraccionament. Per tant, seria interessant poder confirmar els resultats obtinguts en aquest estudi mitjançant la demostració de la localització nuclear utilitzant altres tècniques, com per exemple per immunofluorescència. Aquesta confirmació seria especialment important pel que fa a proteïnes no considerades tradicionalment nuclears. De la mateixa manera, aquesta confirmació també esdevindria necessària per proteïnes que a causa de la seva funció no es consideraria que podrien formar part de l'espermatozoide madur. És el cas de les proteïnes del ribosoma, les quals formen el segon grup de proteïnes més abundant detectat en el proteoma corresponent al nucli de la cèl·lula espermàtica (6.7%), després de les histones (9,7%). Aquest resultat va ser inesperat pel fet que l'espermatozoide madur és una cèl·lula transcripcional i traduccionalment inerta i, tot i que sí que podria dur a terme processos de traducció a partir de la maquinària procedent de les mitocondries (Grunewald *et al.*, 2005; Gur and Breitbart, 2006; Baker, 2011), els nuclis espermàtics analitzats es trobaven desproveïts d'aquestes estructures. A més a més, el nostre estudi només va arribar a identificar proteïnes de ribosoma citoplasmàtiques (80S: 60S + 40S), mentre que no es va identificar cap proteïna de ribosoma mitocondrial (55S). La localització nuclear d'aquest grup de proteïnes es va

confirmar mitjançant la detecció per immunofluorescència d'un representant de la família, la 60S *ribosomal protein L9* (RPL9). D'aquesta manera, una vegada confirmada la presència d'aquest tipus de proteïnes al nucli de l'espermatozoide humà madur, el següent pas seria realitzar estudis per tal de determinar si aquestes proteïnes són funcionals o si són el resultat d'una eliminació incompleta de components necessaris durant l'espermatogènesi i no funcionals en el gàmeta madur.

Adicionalment, els resultats obtinguts a partir de la descripció del proteoma nuclear de l'espermatozoide humà normozoospermic també han permès confirmar la localització nuclear ja coneguda d'alguns tipus de proteïnes, com per exemple les subunitats del proteasoma (Zimmerman and Sutovsky, 2009) o les proteïnes SPANX (*sperm protein associated with nucleus in the X chromosome*), les quals també han sigut considerades com possibles marcadors d'infertilitat (Westbrook *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2010). Per altra banda, s'han detectat en el nucli espermàtic diverses proteïnes amb funcions estructurals, com són les citoqueratines (3,7%) i les tubulines (2,7%). També s'han detectat actines i ciclins. La presència d'aquestes proteïnes pot ser explicada per la seva funció en la formació del cap de l'espermatozoide o en el manteniment d'estructures nuclears. En el cas de les tubulines s'ha descrit una implicació en la reacció acrosòmica (Kierszenbaum *et al.*, 2003; Dvoráková *et al.*, 2005).

Tot i les grans avantatges d'identificació que ha mostrat la realització d'una tècnica proteòmica basada en el subfraccionament de la cèl·lula, estudis basats en altres procediments de subfraccionament han arribat a identificar proteïnes addicionals. Per exemple, introduint un nivell més de fraccionament mitjançant la dissecció de la cromatina espermàtica ens ha permès identificar 268 proteïnes addicionals. D'altra banda, estudis realitzats per altres grups que han dut a terme una purificació no només de nuclis si no de la totalitat del cap de l'espermatozoide mitjançant sonicació ha resultat en la identificació de 469 proteïnes no identificades en els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral (Baker *et al.*, 2013). En aquest estudi es van identificar un gran nombre de subunitats de proteasoma i receptors no identificats anteriorment en l'espermatozoide, proporcionant informació sobre la interacció del gàmeta masculí amb l'exterior (Baker *et al.*, 2013).

Per altra banda, estudis proteòmics realitzats a partir de l'espermatozoide sencer han arribat a detectar una proporció de proteïnes nuclears no identificades en els estudis enfocats en nucli o cap exclusivament (Martinez-Heredia *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2007; de Mateo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013). D'aquesta manera, es pot observar com depenent del protocol seguit per a la preparació de la mostra i dels procediments duts a terme per realitzar els subfraccionaments, s'afavoreix la identificació de grups concrets de proteïnes. A més a més, i tal i com ja s'ha comentat anteriorment, s'ha de tenir present la possibilitat d'una redistribució de proteïnes durant el procediment i per tant la totalitat de proteïnes identificades en els estudis subcel·lulars no seria necessàriament nuclear. Per tant, l'elaboració d'un catàleg complet de proteïnes nuclears a partir de tots els estudis realitzats

fins al moment en la cèl·lula espermàtica humana ens va semblar necessària per tal de completar el coneixement proteic del nucli del gàmeta masculí. D'aquesta manera hem arribat a compilar un total de 581 proteïnes diferents identificades en l'espermatozoide humà i amb localització nuclear confirmada, ja sigui a partir de les categories de *Gene Ontology* a les quals pertanyien, com a partir de la seva nomenclatura i la informació continguda en la base de dades UniprotKB. El coneixement d'un llistat complet de proteïnes espermàtiques nuclears ens va permetre observar com més de la meitat d'aquestes proteïnes (56%) es troben potencialment involucrades en funcions que podrien dir-se epigenètiques o reguladores, ja que es trobaven relacionades amb l'organització i modificació de la cromatina, la modificació d'histones i l'expressió gènica.

Tal i com s'ha comentat en altres seccions d'aquesta tesi doctoral, l'espermatozoide experimenta dos processos de remodelació de la cromatina importants per la seva fisiologia i funcionalitat. En primer lloc, la transició d'estructura NH a NP durant l'espermioogènesi, i en segon lloc, la dissociació de les protamines després de la fertilització, per tal de donar lloc a l'associació d'histones maternes al DNA espermàtic (Oliva and Castillo, 2011a, 2011b; Oliva and de Mateo, 2011). Per tant, sembla lògic que el nucli espermàtic presenti un gran nombre de proteïnes involucrades en aquests esdeveniments, per tal de mantenir-los, iniciar-los o regular-los. Per altra banda, ja s'ha comentat anteriorment la importància funcional que presenten les histones en l'espermatozoide, ja sigui durant el procés de l'espermatogènesi com durant la fertilització. Tot i així, és sorprenent arribar a identificar un total de 46 histones i variants d'histones diferents en una cèl·lula que només presenta un 5-15% del seu genoma empaquetat per nucleosomes. Aquest nombre esdevé encara més destacable quan es té present que cadascuna d'aquestes histones pot ser modificada de forma diferent, definint el codi d'histones (Jenuwein and Allis, 2001), el que donaria sentit al gran nombre de modificadors d'histones també identificats en el nucli espermàtic. D'aquesta manera sembla confirmar-se el fet que les histones, les variants d'histones i les seves modificacions són un dels majors mediadors d'herència epigenètica en l'espermatozoide.

No obstant, la presència d'un enriquiment de proteïnes relacionades amb processos d'expressió gènica i transcripció resulta ser una troballa més intrigant. S'han arribat a descriure fins a 89 proteïnes contenedores de dominis *zinc finger* i *bromodomains* i 78 factors de transcripció en l'espermatozoide humà, els quals també podrien ser transmesos durant la fertilització a l'òcit, i així poder dur a terme processos reguladors en aquest procés i potser també durant el desenvolupament embrionari. De fet, una gran part de les proteïnes contenedores de *zinc finger* són capaces d'unir-se a les histones i reconèixer les seves modificacions, de manera que actuen com efectors del codi d'histones (Jenuwein and Allis, 2001). Dintre d'aquest grup de proteïnes destaquen els *Plant Homeodomain (PHD) Fingers* els quals poden interaccionar i reconèixer modificacions de la histona H3 com H3K4me3, H3K9me3, H3K36me3, H3K9ac i H3K14ac, necessàries per la regulació de l'expressió gènica, la remodelació dels nucleosomes i la recombinació (Musselman and

Kutateladze, 2011). De la mateixa manera, un altre grup d'efectors identificats al nucli espermàtic està format per proteïnes amb *bromodomains*, els quals reconeixen acetilacions d'histones (Winston and Allis, 1999; Dyson *et al.*, 2001). Algunes d'aquestes proteïnes són importants durant la formació de l'espermatozoide, com per exemple la BRDT, la qual és necessària pel procés de reorganització de la cromatina dependent d'acetilació que es dona a l'espermogènesi (Dhalluin *et al.*, 1999; Pivot-Pajot *et al.*, 2003; Govin *et al.*, 2004; Moriniere *et al.*, 2009; Dhar *et al.*, 2012). Tot i això, aquestes proteïnes també podrien estar implicades en processos de regulació en els primers estadis del desenvolupament embrionari, com per exemple durant la remodelació de la cromatina espermàtica per donar lloc a la dissociació de les protamines. De fet, aquest paper ja ha sigut proposat pel BRDT (Steilmann *et al.*, 2010).

La presència de factors de transcripció en la cèl·lula espermàtica madura també provoca la generació d'aquesta doble teoria sobre la seva funcionalitat. Com ja s'ha comentat a la introducció d'aquesta tesi doctoral, la transcripció gènica en l'espermatozoide madur comença en els estadis inicials de l'espermatogènesi i es manté activa i regulada per diferents factors de transcripció específics de testicle (Sassone-Corsi, 2002), fins la formació de les espermàtides elongades, just abans de la compactació de la cromatina en estructures toroidals (Oliva and Castillo, 2011b). Per tant, alguns dels factors de transcripció identificats podrien ser proteïnes importants durant l'espermatogènesi però inactives en l'espermatozoide madur. En aquest cas, la seva presència no és del tot insignificant, ja que poden representar un mirall dels processos de diferenciació que es donen al testicle proporcionant una gran informació, de la qual es podria extreure possibles aplicacions clíniques. En aquest sentit, la identificació de les vies cel·lulars que podrien estar actives a partir del proteoma total de l'espermatozoide humà, duta a terme recentment pel nostre grup (Amaral *et al.*, 2014), va suggerir que la cèl·lula espermàtica madura no contenia la maquinària proteòmica suficient per dur a terme processos de transcripció. Per tant, la presència en l'espermatozoide de diferents factors de transcripció participants en diverses etapes del procés guiat per la RNA polimerasa II, com per exemple la *TATA-box binding protein* (TBP), subunitats de mediadors de la transcripció com el TFIID o factors d'elongació com el FACT, podria atribuir-se a una eliminació incompleta d'aquests components una vegada acabada l'espermatogènesi.

No obstant, que l'espermatozoide no presenti la maquinària completa per donar lloc al procés de transcripció no vol dir que altres factors identificats al nucli espermàtic no puguin estar implicats en funcions de regulació de l'expressió gènica una vegada donada la fusió amb l'oòcit, el qual sí que podrà iniciar el procés. De fet, s'han identificat factors de transcripció dels quals es coneix la seva implicació en processos de diferenciació, com les proteïnes contenedores de *erythroblast transformation-specific domains*, membres de la *T-Box family* (Tbx) o proteïnes contenedores de *homeobox DNA binding domains*, també anomenats homeodominis. Entre les proteïnes amb homeodominis identificades en l'espermatozoide humà es troben proteïnes involucrades en el desenvolupament cardíac

(*Iroquois-class homeodomain protein IRX-4*), en la formació de la retina (*Homeobox protein SIX-5*), en neurogènesi (*ventral anterior homeobox 1* i *Homeobox protein cut-like 2*) o en la maduració i creixement del pulmó (*LIM-homeobox protein Lhx4*), entre d'altres.

Per altra banda, en el nucli espermatòic s'han identificat un gran nombre d'altres proteïnes relacionades amb el DNA que també estarien involucrades en les funcions reguladores enriquides ja esmentades. Serien exemples els enzims responsables de la regulació de la metilació del DNA (*DNA (cytosine-5) methyltransferases, DNMTs*) i els enzims involucrats en la replicació, reparació i transcripció, com DNA polimerases, helicases, topoisomerases o RNA polimerases, entre d'altres. Aquests enzims podrien representar romanents derivats de les activitats necessàries durant l'espermatogènesi. No obstant, i de forma alternativa, també podrien estar relacionats amb canvis estructurals donats després de la fertilització. Per exemple, la topoisomerasa II es trobaria involucrada durant l'espermogènesi en l'alliberació de la tensió donada per la superhelicitat dels nucleosomes, facilitant la transició de histones a protamines (Roca and Mezquita, 1989; Yap and Zhou, 2011). De la mateixa manera, un mecanisme invers es podria donar durant la descondensació de la cromatina paterna a l'oòcit, on l'acció de les topoisomerases paternes, intactes en el nucli de l'espermatozoide humà madur, podria ser també necessària. Per tant, i tot i que les topoisomerases I i II aïllades d'extractes nuclears d'espermatozoides humans semblen tenir una activitat enzimàtica menor que la que es dona en cèl·lules somàtiques (Har-Vardi *et al.*, 2007), aquests enzims podrien ser transmesos a l'oòcit i participar en la remodelació de la cromatina paterna.

A més a més, cal destacar que el cinquè grup de proteïnes amb més representats identificat al nucli de l'espermatozoide humà correspon a les ribonucleoproteïnes, confirmant d'aquesta manera la troballa obtinguda prèviament mitjançant l'estudi proteòmic subcel·lular enfocat en nuclis purificats elaborat en aquesta tesi doctoral (Veure Objectiu 2.1 i Secció 4.2.1 de Resultats).

Membres de totes aquestes famílies de proteïnes nuclears identificades també es troben presents en els proteomes nuclears d'espermatozoides de ratolí, rata o macaco, tot i que el nombre de proteïnes caracteritzades en aquests mamífers és molt menor que en l'espècie humana. Aquesta limitació en la identificació de proteïnes podria venir donada per tres factors. En primer lloc, el nombre d'estudis proteòmics basats en tècniques d'alt rendiment com la LC-MS/MS que compleixin els criteris de qualitat mínims establerts en aquesta tesi doctoral, per tal d'evitar la inclusió de falsos positius en l'estudi, va resultar bastant petit. A més a més, entre les proteïnes identificades en els estudis inclosos a l'anàlisi existeix un gran nombre de proteïnes catalogades com hipotètiques o predites, les quals no presentaven una informació exacta sobre la seva funció o localització subcel·lular. Per últim, existeix una falta d'estudis proteòmics enfocats en el nucli de l'espermatozoide, els quals augmentarien el número de proteïnes caracteritzades en els diferents tipus de cèl·lules espermatòiques. De fet, l'únic estudi en el que es va dur a terme proteòmica

subcel·lular, i que es troba inclòs en aquest anàlisi, va consistir en l'aïllament de caps d'espermatozoide de rates exposades a quimioteràpia per càncer de pròstata. De forma interessant, aquest estudi va reportar modificacions epigenètiques en el grup de rates problema consistent en una reducció dels nivells de protamines i un augment de diferents variants d'histones (Maselli *et al.*, 2012).

Tot i aquestes limitacions, a partir de l'anàlisi de termes de GO relacionats amb processos biològics es va arribar a posar de manifest en el proteoma nuclear de l'espermatozoide murí un enriquiment en proteïnes involucrades en processos de remodelació de la cromatina. Per tant, resultaria necessari dur a terme més estudis basats en tècniques proteòmiques de gran rendiment enfocats en el nucli espermàtic d'espècies models per tal de poder determinar quin és el perfil proteic nuclear conservat del nucli de l'espermatozoide, el qual podrà donar llum a la contribució del gàmeta masculí en la fertilització i el desenvolupament.

5.3. Perfils de nucleoproteïnes diferents segons l'afinitat de les proteïnes cap a la cromatina espermàtica

Un estudi més detallat de les proteïnes espermàtiques nuclears que es troben associades a la cromatina espermàtica va permetre caracteritzar en aquesta tesi doctoral, i per primer cop en l'espermatozoide humà, dos grups de proteïnes espermàtiques que diferien segons l'afinitat de la seva unió a la cromatina de l'espermatozoide. D'aquesta manera, al voltant del 95% de les proteïnes identificades van ser total o parcialment extretes després d'un tractament salí amb NaCl 0,65 M, el qual és capaç de dissociar histones del DNA (Gatewood *et al.*, 1987; Gardiner-Garden *et al.*, 1998; Wykes and Krawetz, 2003; Arpanahi *et al.*, 2009). En canvi, 26 proteïnes es van mantenir a la fracció insoluble, unides fortament a la cromatina juntament amb les protamines.

A més a més de la funció de protecció ja comentada i confirmada per les protamines, aquestes proteïnes desenvolupen un paper estructural important condensant el DNA en compactes toroides (Oliva, 2006; Carrell *et al.*, 2008). De la mateixa manera, una gran proporció de les proteïnes identificades en la FI presenten funcions estructurals, recolzant la importància d'aquesta activitat en el gàmeta masculí i en la seva funcionalitat. Per altra banda, i de forma contrària a la resta d'histones, es va observar que la variant d'histona H2A.X també resultava resistent a l'extracció salina. Com ja s'ha comentat anteriorment (Veure Secció 1.2.2. de la Introducció), l'H2A.X sembla estar involucrada en el reconeixement i resposta del dany al DNA durant l'espermatogènesi (Celeste *et al.*, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003a) i en la inactivació dels cromosomes sexuals (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003b). No obstant, recentment també s'ha observat la presència d'aquesta variant d'histona en regions silenciades d'heterocromatina en cèl·lules somàtiques (Soldi and Bonaldi, 2013). Aquesta distribució diferencial en cèl·lules somàtiques es trobaria

relacionada amb la localització específica d'aquesta histona detectada en aquesta tesi doctoral, ja que l'heterocromatina podria equivaldre a la també silenciada FI de la cromatina espermàtica.

La composició proteica de la FS, en canvi, va resultar molt més complexa amb un gran nombre de proteïnes, les quals a la vegada es troben involucrades en funcions diverses. Per exemple, el grup amb més representants va ser aquell format per proteïnes implicades en la síntesi, modificació, empaquetament i degradació de proteïnes. Dins d'aquest grup es pot trobar un gran nombre de proteïnes relacionades amb el proteasoma i ubiquitines, fet que coincideix amb els resultats obtinguts a partir de l'anàlisi del proteoma de nuclis espermàtics aïllats dut a terme a l'objectiu 2.1 d'aquesta tesi doctoral i comentat anteriorment. A més a més, i de forma interessant, a part de la seva implicació en la degradació proteica, algunes de les proteïnes incloses en aquest grup podrien estar també relacionades amb processos reguladors, com es el cas de la subunitat del proteasoma PSMA7 o les ubiquitines, les quals s'han associat a la regulació de l'expressió gènica i la proliferació cel·lular (Murray *et al.*, 1998; Ferdous *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2009).

De fet, la FS, a diferència de la FI, es troba formada per diverses proteïnes associades a possibles funcions considerades com epigenètiques. D'aquesta manera, l'anàlisi d'enriquiment en termes GO va mostrar una representació significativa de les categories *DNA packaging* i *nucleosome organization*, deguda tant a la identificació de diverses variants d'histones diferents com d'altres proteïnes que podrien estar duent a terme una funció relacionada. Un exemple seria la proteïna SET (també anomenada I2PP2A), la qual és considerada una xaperona d'histones implicada tant en la formació dels nucleosomes com també en la desestabilització d'aquests, fet que suggeriria una relació tant amb la remodelació de la cromatina que es dona durant l'espermatogènesi, com la que es dona després de la fertilització. A més a més, aquesta funció afavoriria l'activació de processos cel·lulars com la replicació, la reparació o la transcripció del DNA (Muto *et al.*, 2007). Per altra banda, la proteïna SET/I2PP2A, expressada de forma extensa en diverses línies cel·lulars humanes, també es trobaria relacionada amb l'acetilació d'histones, evitant així la unió d'acetilases i incrementant l'activació de la regió de la cromatina on es troba associada (Adachi *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 2002).

Pel que fa al contingut d'histones de l'espermatozoide, tal i com s'ha comentat anteriorment, aquestes representarien una marca epigenètica en el DNA espermàtic necessària per processos que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari primerenc. D'aquesta manera, les histones modificades H3K4me2 o H3K4me3 podrien estar especialment associades a regions de DNA enriquides en promotors de gens del desenvolupament, mentre que la modificació H3K27me3 es trobaria relacionada amb promotors de gens silenciats (Hammoud *et al.*, 2009). D'aquesta manera, la caracterització de diferents proteïnes en la FS de la cromatina espermàtica capaces de reconèixer aquestes modificacions covalents donaria suport a una possible funció epigenètica d'aquesta

distribució proteica específica (segons l'afinitat per la cromatina), tal i com es suggereix en aquesta tesi doctoral. Una proteïna d'alt interès relacionada amb aquest aspecte és la *Histone lysine demethylase PHF8*, la qual és un component de la subfamília KDM de *PHD fingers* (Klose *et al.*, 2006) que no havia sigut identificada en l'espermatozoide humà en cap estudi anterior. En cèl·lules somàtiques, en canvi, s'ha estudiat per la seva implicació en la progressió del cycle cel·lular, transcripció, desenvolupament neuronal i la organització del citoesquelet (Feng *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010; Asensio-Juan *et al.*, 2012). Part de l'interès en aquesta proteïna espermàtica resideix en el fet que es troba constituïda per dos dominis, per una banda el domini *zinc finger* capaç de reconèixer la marca d'activació H3K4me3 (Feng *et al.*, 2010; Horton *et al.*, 2010), i per l'altra banda el domini Jumonji-C (JmjC) amb activitat desmetilasa. Específicament, aquest domini JmjC actua sobre la H3K9me2, la qual es troba principalment associada a la inactivació de la transcripció (Feng *et al.*, 2010; Suganuma and Workman, 2010; Zhu *et al.*, 2010). D'aquesta manera, la PHF8 podria ser capaç de desmetilar aquestes lisines, les quals podrien ser a la vegada acetilades, el que portaria a un increment en l'activació transcripcional (Fortschegger *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). És per aquest motiu que estudis addicionals dirigits específicament a la PHF8 serien necessaris per tal de comprovar la funció específica d'aquesta proteïna en l'espermatozoide, sent interessant poder identificar si es troba associada a gens específics relacionats amb processos de desenvolupament.

De forma contrària a la distribució de proteïnes diferents a histones i a protamines al llarg de la cromatina, estudiada per primer cop en l'espermatozoide en aquesta tesi doctoral, la distribució gènica sí que ha sigut extensament estudiada i establerta, tant en espermatozoides humans com de ratolí (Gatewood *et al.*, 1987; Gardiner-Garden *et al.*, 1998; Zalenskaya *et al.*, 2000; Wykes and Krawetz, 2003; Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009; Brykczynska *et al.*, 2010; Vavouri and Lehner, 2011; Erkek *et al.*, 2013). D'aquesta manera, la seqüenciació dels gens presents en la fracció rica d'histones mitjançant *deep genome sequencing* ens va permetre comprovar el correcte fraccionament de la cromatina duta a terme en aquesta tesi doctoral i confirmar així la correcta obtenció de dos grups de proteïnes amb característiques diferents. Aquests resultats per tant, reforçarien la teoria de la participació del gàmeta masculí en la transmissió de informació epigenètica, a més a més de la genètica, a la següent generació (Krawetz, 2005; Miller *et al.*, 2010; Yamauchi *et al.*, 2011; Carrell, 2012; Jenkins and Carrell, 2012a, 2012b; Schagdarsurengin *et al.*, 2012; Jodar *et al.*, 2013). A més a més, podríem suggerir que aquesta contribució paterna no només inclouria els perfils de metilació del DNA, les modificacions de les histones o el contingut d'RNAs, si no també una estructura de la cromatina única amb una distribució de gens no donada a l'atzar i un contingut de proteïnes diferents segons la seva afinitat al DNA. El nucli de l'espermatozoide, per tant, contindria per una banda diverses proteïnes encarregades en el manteniment de la estructura única i especial de la cromatina espermàtica que es trobarien associades al DNA mitjançant unions més fortes, i, per altra banda, una gran varietat de variants d'histones,

5. Discussió

factors de transcripció, proteïnes associades a la cromatina i proteïnes modificadores de la cromatina, les quals es trobarien unides de forma més dèbil al DNA, el que podria resultar en un alliberament d'aquestes en l'òocit una vegada donada la fertilització. D'aquesta manera, tots aquests factors podrien trobar-se constituint nivells addicionals d'informació epigenètica en l'embrió, a la vegada que podrien participar en processos del desenvolupament embrionari primerenc, com és la remodelació de la cromatina espermàtica en el pronucli masculí o la regulació de la transcripció i expressió de gens paterns que es troben empaquetats per nucleosomes.

6. Conclusions

Les conclusions derivades dels resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral són les següents:

1. La quantitat total de protamines, analitzada a partir dels quocients protamina/DNA i P1/P2, en espermatozoides de pacients infèrtils que cursen tècniques de reproducció assistida, es troba inversament relacionada amb el dany en el DNA espermàtic. Aquest fet es troba en coherència amb la funció de protecció del material genètic patern proposada per les protamines.
2. S'ha posat a punt un sistema per tal de detectar protamines de forma intacta (no digerides per proteases) mitjançant tècniques proteòmiques basades en espectrometria de masses, fet que ha estat possible degut a la petita grandària d'aquestes proteïnes. Amb aquesta estratègia, més sensible que l'anàlisi clàssic mitjançant electroforesi àcida i tinció, s'ha aconseguit identificar possibles fosforilacions, acetilacions i metilacions presents en les seqüències de la protamina 1 i 2 humanes.
3. L'estudi de la composició del nucli de l'espermatozoide humà normal mitjançant les tècniques de proteòmica subcel·lular aplicades en aquesta tesi doctoral ha permès identificar un total de 403 proteïnes a partir de l'anàlisi del nucli i 495 després del fraccionament de la cromatina espermàtica. En total, s'han arribat a identificar 670 proteïnes diferents, una gran proporció de les quals no havia estat identificada anteriorment com a part de la cèl·lula espermàtica.
4. S'han dut a terme dos mètodes alternatius per a la dissecció de la cromatina espermàtica; un mitjançant tractament salí amb NaCl 0,65 M i l'altre fraccionant la cromatina amb nucleasa micrococal. Des de la perspectiva de l'anàlisi proteòmic el mètode d'extracció salina ha resultat ser més eficient que el de dissecció mitjançant nucleasa micrococal, permetent la identificació d'un nombre més elevat de proteïnes.
5. L'espermatozoide humà normozoospèrmic presenta dos grups de proteïnes nuclears amb composició i característiques diferents segons la seva afinitat per la cromatina espermàtica (mesurada per la capacitat de ser extretes amb NaCl 0,65M). Per una banda, la fracció proteica insoluble a NaCl 0,65 M, estaria formada majoritàriament per proteïnes estructurals. Per altra banda, la fracció proteica soluble estaria formada per proteïnes involucrades en metabolisme proteic i processos reguladors de la cromatina.
6. La variant d'histona H2A.X ha resultat ser la única variant d'histona identificada en l'espermatozoide humà madur en aquesta tesi doctoral que és resistent a l'extracció salina amb NaCl 0.65M i, per tant, que es troba present a la fracció insoluble de la

cromatina espermàtica. Aquest fet es trobaria en coherència amb la distribució diferencial de la H2A.X amb una principal associació a regions silenciades del DNA observada en cèl·lules somàtiques.

7. Entre les proteïnes extretes amb NaCl 0,65 M s'han identificat factors de transcripció, proteïnes amb dominis *zinc finger* com la PHF8 (identificada per primer cop en la cèl·lula espermàtica en aquest estudi), proteïnes relacionades amb el DNA com la SET/I2PP2A i altres nucleoproteïnes amb funcions reguladores i potencialment epigenètiques.
8. L'anàlisi de les proteïnes espermàtiques identificades en aquesta tesi doctoral i de totes les publicades en altres estudis proteòmics fins l'actualitat, ha permès elaborar el proteoma nuclear de l'espermatozoide humà més complet fins al moment, format per 581 proteïnes diferents, establint les bases per a estudis futurs. Aquest proteoma es troba format per una complexa combinació d'histones, variants d'histones, modificadors d'histones, factors de transcripció, proteïnes que s'associen a la cromatina i proteïnes que modifiquen la cromatina, els quals podrien ser alliberats a l'òcit. Aquesta composició proteica també es trobaria present en espermatozoides d'espècies models de mamífers.

L'aplicació de mètodes de proteòmica subcel·lulars en aquesta tesi doctoral ha resultat ser una eina d'utilitat per tal d'incrementar el coneixement del nucli de l'espermatozoide humà normal. Aquests resultats obren portes a la possibilitat d'estudiar les proteïnes identificades en més detall, ja sigui com a marcadors del procés d'espermatogènesi i maduració de l'espermatozoide, com en quant a la seva implicació potencial en processos del desenvolupament embrionari primerenc. Per exemple, en la remodelació de la cromatina paterna després de la fertilització, en la reprogramació de l'embrió o en la regulació de l'expressió de gens del desenvolupament que es troben associats a les regions més accessibles del DNA espermàtic.

7. Referències

- Abdalla, H., Hirabayashi, M., and Hochi, S. (2009). Demethylation dynamics of the paternal genome in pronuclear-stage bovine zygotes produced by in vitro fertilization and ooplasmic injection of freeze-thawed or freeze-dried spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 55, 433–439.
- Adachi, Y., Pavlakis, G.N., and Copeland, T.D. (1994). Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J. Biol. Chem.* 269, 2258–2262.
- Aebersold, R., and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Aitken, R.J., and De Iuliis, G.N. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed. Online* 14, 727–733.
- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., and McLachlan, R.I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* 32, 46–56.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (New York).
- Amaral, A., Ramalho-Santos, J., and St John, J.C. (2007). The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum. Reprod.* 22, 1585–1596.
- Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., Ramalho-Santos, J., and Oliva, R. (2013). Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 330–342.
- Amaral, A., Castillo, J., Ramalho-Santos, J., and Oliva, R. (2014). The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Hum. Reprod. Update* 20, 40–62.
- Angelopoulou, R., Plastira, K., and Msaouel, P. (2007). Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 36.
- Aoki, V.W., Liu, L., and Carrell, D.T. (2005a). Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum. Reprod.* 20, 1298–1306.
- Aoki, V.W., Moskovtsev, S.I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J.B.M., and Carrell, D.T. (2005b). DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J. Androl.* 26, 741–748.
- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M., Steger, K., Tedder, P., and Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 19, 1338–1349.
- Asano, A., Nelson, J.L., Zhang, S., and Travis, A.J. (2010). Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm. *Proteomics* 10, 3494–3505.
- Asensio-Juan, E., Gallego, C., and Martínez-Balbás, M.A. (2012). The histone demethylase PHF8 is essential for cytoskeleton dynamics. *Nucleic Acids Res.* 40, 9429–9440.
- Auclair, G., and Weber, M. (2012). Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* 94, 2202–2211.

7. Referències

- Azpiazu, R., Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J.M., Guimerà, M., Ballescà, J.L., Balasch, J., and Oliva, R. (2014). High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 29, 1225–1237.
- Baker, M.A. (2011). The 'omics revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian J. Androl.* 13, 6–10.
- Baker, M.A., Reeves, G., Hetherington, L., Muller, J., Baur, I., and Aitken, R.J. (2007). Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics.Clinical Appl.* 1, 524–532.
- Baker, M.A., Hetherington, L., Reeves, G.M., Aitken, R.J., and Muller, J. (2008). The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 8, 2312–2321.
- Baker, M.A., Nixon, B., Naumovski, N., and Aitken, R.J. (2012). Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 211–217.
- Baker, M.A., Naumovski, N., Hetherington, L., Weinberg, A., Velkov, T., and Aitken, R.J. (2013). Head and flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 13, 61–74.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.
- Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2012). Técnicas de reproducción asistida en la esterilidad por factor masculino. In *Tratado de Andrología I Medicina Sexual*, N. Cruz, ed. (Buenos Aires: Editorial Panamericana), pp. 376–382.
- Bench, G., Corzett, M.H., De Yebra, L., Oliva, R., and Balhorn, R. (1998). Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. *Mol. Reprod. Dev.* 50, 345–353.
- Benchaib, M., Braun, V., Ressenkoff, D., Lornage, J., Durand, P., Niveleau, A., and Guerin, J.F. (2005). Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum. Reprod.* 20, 768–773.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395–2402.
- Bianchi, E., and Wright, G.J. (2014). Izumo meets Juno: Preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle* 13, 2019–2020.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., and Wright, G.J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483–487.
- Brunner, A.M., Nanni, P., and Mansuy, I.M. (2014). Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* 7, 2.
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schubeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 679–687.
- Burgos, M.H., and Fawcett, D.W. (1955). Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (*Felis domestica*). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 287–300.
- Byrne, K., Leahy, T., McCulloch, R., Colgrave, M.L., and Holland, M.K. (2012). Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics* 12, 3559–3579.

- Carrell, D.T. (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertil. Steril.* 97, 267–274.
- Carrell, D.T., Emery, B.R., and Hammoud, S. (2008). The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int. J. Androl.* 31, 537–545.
- Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S., and Oliva, R. (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *J. Androl.* 32, 324–332.
- Castillo, J., Amaral, A., and Oliva, R. (2014). Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology* 3, 326–338.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5, 675–679.
- Chan, C.-C., Shui, H.-A., Wu, C.-H., Wang, C.-Y., Sun, G.-H., Chen, H.-M., and Wu, G.-J. (2009). Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm. *J. Proteome Res.* 8, 5382–5386.
- Chauvin, T., Xie, F., Liu, T., Nicora, C.D., Yang, F., Camp 2nd, D.G., Smith, R.D., and Roberts, K.P. (2012). A systematic analysis of a deep mouse epididymal sperm proteome. *Biol. Reprod.* 87, 141.
- Chirat, F., Arkhis, A., Martinage, A., Jaquinod, M., Chevaillier, P., and Sautière, P. (1993). Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1203, 109–114.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82–86.
- Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W.D., Goulding, E.H., Stein, P., Xu, Z., Schultz, R.M., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol. Reprod.* 69, 211–217.
- Chu, D.S., Liu, H., Nix, P., Wu, T.F., Ralston, E.J., Yates 3rd, J.R., and Meyer, B.J. (2006). Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 443, 101–105.
- Churikov, D., Zalenskaya, I.A., and Zalensky, A.O. (2004). Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 203–214.
- Collins, A.M., Caperna, T.J., Williams, V., Garrett, W.M., and Evans, J.D. (2006). Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol.* 15, 541–549.
- Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W.G., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T., et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update* 16, 231–245.
- Corzett, M., Mazrimas, J., and Balhorn, R. (2002). Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 519–527.
- Cox, J., and Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics? *Cell* 130, 395–398.
- Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernández, J.L., Gosálvez, J., and Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 213–223.
- Dadoune, J.P. (1995). The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 26, 323–345.

7. Referències

- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev. Biol.* 278, 274–288.
- Dai, S., Li, L., Chen, T., Chong, K., Xue, Y., and Wang, T. (2006). Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. *Proteomics* 6, 2504–2529.
- de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., and Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13 Suppl 1, 1–8.
- de Lucia, F., Faraone-Mennella, M.R., D’Erme, M., Quesada, P., Caiafa, P., and Farina, B. (1994). Histone-induced condensation of rat testis chromatin: testis-specific H1t versus somatic H1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 32–39.
- de Mateo, S., Martínez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Domínguez-Fandos, D., Vidal-Taboada, J.M., Balleca, J.L., and Oliva, R. (2007). Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7, 4264–4277.
- de Mateo, S., Gazquez, C., Guimera, M., Balasch, J., Meistrich, M.L., Balleca, J.L., and Oliva, R. (2009). Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil. Steril.* 91, 715–722.
- de Mateo, S., Castillo, J., Estanyol, J.M., Balleca, J.L., and Oliva, R. (2011). Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 11, 2714–2726.
- de Mateo, S., Estanyol, J.M., and Oliva, R. (2013). Methods for the analysis of the sperm proteome. *Methods Mol. Biol.* 927, 411–422.
- de Yebra, L., and Oliva, R. (1993). Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal. Biochem.* 209, 201–203.
- de Yebra, L., Balleca, J.L., Vanrell, J.A., Bassas, L., and Oliva, R. (1993). Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J. Biol. Chem.* 268, 10553–10557.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496.
- Dhar, S., Thota, A., and Rao, M.R. (2012). Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 6387–6405.
- Dixon, G.H., and Smith, M. (1968). Nucleic acids and protamine in salmon testes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 8, 9–34.
- Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Balleca, J.L., and Oliva, R. (2007). Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry. A* 71, 1011–1018.
- Domon, B., and Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 212–217.
- Donnelly, E.T., McClure, N., and Lewis, S.E. (1999). The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 14, 505–512.
- Dorus, S., Busby, S.A., Gerike, U., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Karr, T.L. (2006). Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nat. Genet.* 38, 1440–1445.

- Dorus, S., Wasbrough, E.R., Busby, J., Wilkin, E.C., and Karr, T.L. (2010). Sperm proteomics reveals intensified selection on mouse sperm membrane and acrosome genes. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1235–1246.
- Du, H., Huang, X., Wang, S., Wu, Y., Xu, W., and Li, M. (2009). PSMA7, a potential biomarker of diseases. *Protein Pept. Lett.* 16, 486–489.
- Duty, S.M., Singh, N.P., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Herrick, R.F., Christiani, D.C., and Hauser, R. (2003). The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ. Health Perspect.* 111, 1164–1169.
- Dvoráková, K., Moore, H.D.M., Sebková, N., and Palecek, J. (2005). Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* 130, 61–69.
- Dym, M., and Fawcett, D.W. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 4, 195–215.
- Dyson, M.H., Rose, S., and Mahadevan, L.C. (2001). Acetyllysine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin. *Front. Biosci.* 6, D853–65.
- Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y.Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schubeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., Peters, A.H.F.M., et al. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1236–1236b.
- Evers, J.L.H. (2002). Female subfertility. *Lancet* 360, 151–159.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Zhang, D., and Lieberman, J. (2002). HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2810–2820.
- Felix, K. (1960). Protamines. *Adv. Protein Chem.* 15, 1–56.
- Feng, W., Yonezawa, M., Ye, J., Jenuwein, T., and Grummt, I. (2010). PHF8 activates transcription of rRNA genes through H3K4me3 binding and H3K9me1/2 demethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 445–450.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., and Johnston, S.A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 7, 981–991.
- Fernández, J.A., Heeb, M.J., Radtke, K.P., and Griffin, J.H. (1997). Potent blood coagulant activity of human semen due to prostasome-bound tissue factor. *Biol. Reprod.* 56, 757–763.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2003a). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 2, 426–427.
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003b). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508.
- Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F., et al. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm.

7. Referències

Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J. Biol. Chem.* 278, 11579–11589.

Fortschegger, K., de Graaf, P., Outchkourov, N.S., van Schaik, F.M.A., Timmers, H.T.M., and Shiekhattar, R. (2010). PHF8 targets histone methylation and RNA polymerase II to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3286–3298.

García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., Jones, C., Coward, K., Gosálvez, J., and Benet, J. (2011). Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.* 95, 105–109.

Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M., and Tam, P.P. (1998). Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3350–3356.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E.M., and Schmid, C.W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236, 962–964.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., and Bradbury, E.M. (1990). Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.* 265, 20662–20666.

Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3459–3469.

Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., et al. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* 176, 283–294.

Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.-J., and Anderegg, U. (2005). Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37, 69–71.

Gur, Y., and Breitbart, H. (2006). Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 20, 411–416.

Guyonnet, B., Zabet-Moghaddam, M., SanFrancisco, S., and Cornwall, G.A. (2012). Isolation and proteomic characterization of the mouse sperm acrosomal matrix. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 758–774.

Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.

Hammoud, S.S., Purwar, J., Pflueger, C., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2010). Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil. Steril.* 94, 1728–1733.

Hammoud, S.S., Nix, D.A., Hammoud, A.O., Gibson, M., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2011). Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum. Reprod.* 26, 2558–2569.

Hansen, S., Eichler, E.E., Fullerton, S.M., and Carrell, D. (2010). SPANX gene variation in fertile and infertile males. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 55, 18–26.

Har-Vardi, I., Mali, R., Breietman, M., Sonin, Y., Albotiano, S., Levitas, E., Potashnik, G., and Priel, E. (2007). DNA topoisomerases I and II in human mature sperm cells: characterization and unique properties. *Hum. Reprod.* 22, 2183–2189.

- Heller, C.G., and Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 140, 184–186.
- Hermann, A., Gowher, H., and Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2571–2587.
- Holstein, A.-F., Schulze, W., and Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 107.
- Horton, J.R., Upadhyay, A.K., Qi, H.H., Zhang, X., Shi, Y., and Gheng, X. (2010). Enzymatic and structural insights for substrate specificity of a family of jumonji histone lysine demethylases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 38–43.
- Hoyer-Fender, S., Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (2000). Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* 258, 254–260.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- Huang D.W., Sherman BT, and Lempicki R.A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13.
- Hud, N. V, Allen, M.J., Downing, K.H., Lee, J., and Balhorn, R. (1993). Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 1347–1354.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., and Thompson, W. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 374, 261–268.
- Ihara, M., Meyer-Ficca, M.L., Leu, N.A., Rao, S., Li, F., Gregory, B.D., Zalenskaya, I.A., Schultz, R.M., and Meyer, R.G. (2014). Paternal poly (ADP-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet.* 10, e1004317.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234–238.
- Ishibashi, T., Li, A., Eirin-Lopez, J.M., Zhao, M., Missiaen, K., Abbott, D.W., Meistrich, M., Hendzel, M.J., and Ausio, J. (2010). H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic Acids Res.* 38, 1780–1789.
- Jenkins, T.G., and Carrell, D.T. (2012a). The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 143, 727–734.
- Jenkins, T.G., and Carrell, D.T. (2012b). Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front. Genet.* 3, 143.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jodar, M., Oriola, J., Mestre, G., Castillo, J., Giwercman, A., Vidal-Taboada, J.M., Balleascà, J.L., and Oliva, R. (2011). Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *Int. J. Androl.* 34, 470–485.
- Jodar, M., Kalko, S., Castillo, J., Balleascà, J.L., and Oliva, R. (2012). Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum. Reprod.* 27, 1431–1438.

7. Referències

- Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M.P., Krawetz, S.A., and Network, for the R.M. (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum. Reprod. Update* 19, 604–624.
- Johnson, G.D., Lalancette, C., Linnemann, A.K., Leduc, F., Boissonneault, G., and Krawetz, S.A. (2011). The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 141, 21–36.
- Johnston, D.S., Wooters, J., Kopf, G.S., Qiu, Y., and Roberts, K.P. (2005). Analysis of the human sperm proteome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061, 190–202.
- Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* 12, 206–222.
- Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., and Tres, L.L. (2003). Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol. Biol. Cell* 14, 4628–4640.
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snøve, O., and Rossi, J.J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16230–16235.
- Kim, Y.-H., Haidl, G., Schaefer, M., Egner, U., Mandal, A., and Herr, J.C. (2007). Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Dev. Biol.* 302, 463–476.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* 7, 715–727.
- Krawetz, S.A. (2005). Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat. Rev.* 6, 633–642.
- Krawetz, S.A., Kruger, A., Lalancette, C., Tagett, R., Anton, E., Draghici, S., and Diamond, M.P. (2011). A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod.* 26, 3401–3412.
- Kruger, T.F., Ackerman, S.B., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Brugo, S.S., and Acosta, A.A. (1987). A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch. Androl.* 18, 275–277.
- Lesch, B.J., Dokshin, G.A., Young, R.A., McCarrey, J.R., and Page, D.C. (2013). A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16061–16066.
- Li, L.-W., Fan, L.-Q., Zhu, W.-B., Nien, H.-C., Sun, B.-L., Luo, K.-L., Liao, T.-T., Tang, L., and Lu, G.-X. (2007). Establishment of a high-resolution 2-D reference map of human spermatozoal proteins from 12 fertile sperm-bank donors. *Asian J. Androl.* 9, 321–329.
- Lilley, D.M., and Pardon, J.F. (1979). Structure and function of chromatin. *Annu. Rev. Genet.* 13, 197–233.
- Liu, W.M., Pang, R.T., Chiu, P.C., Wong, B.P., Lao, K., Lee, K.F., and Yeung, W.S. (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 490–494.
- Martinez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Balleca, J.L., and Oliva, R. (2006). Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6, 4356–4369.

- Martinez-Heredia, J., de Mateo, S., Vidal-Taboada, J.M., Balleca, J.L., Oliva, R., Martínez-Heredia, J., and Balleca, J.L. (2008). Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum. Reprod.* 23, 783–791.
- Maselli, J., Hales, B.F., Chan, P., and Robaire, B. (2012). Exposure to bleomycin, etoposide, and cisplatin alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol. Reprod.* 86, 1–10,166.
- Mengual, L., Balleca, J.L., Ascaso, C., and Oliva, R. (2003). Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J. Androl.* 24, 438–447.
- Mezquita, C. (1985). Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. *Revis. Biol. Celular* 5, V–XIV, 1–124.
- Miller, D., Brinkworth, M., and Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139, 287–301.
- Misell, L.M., Holochwost, D., Boban, D., Santi, N., Shefi, S., Hellerstein, M.K., and Turek, P.J. (2006). A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J. Urol.* 175, 242–6; discussion 246.
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Hery, P., Curtet, S., et al. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* 27, 1680–1692.
- Montjean, D., De La Grange, P., Gentien, D., Rapinat, A., Belloc, S., Cohen-Bacrie, P., Menezo, Y., and Benkhalifa, M. (2012). Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 3–10.
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., et al. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664–668.
- Murray, E.J., Bentley, G. V., Grisanti, M.S., and Murray, S.S. (1998). The ubiquitin-proteasome system and cellular proliferation and regulation in osteoblastic cells. *Exp. Cell Res.* 242, 460–469.
- Musselman, C.A., and Kutateladze, T.G. (2011). Handpicking epigenetic marks with PHD fingers. *Nucleic Acids Res.* 39, 9061–9071.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4285–4290.
- Naaby-Hansen, S., and Herr, J.C. (2010). Heat shock proteins on the human sperm surface. *J. Reprod. Immunol.* 84, 32–40.
- Naaby-Hansen, S., Diekman, A., Shetty, J., Flickinger, C.J., Westbrook, A., and Herr, J.C. (2010). Identification of calcium-binding proteins associated with the human sperm plasma membrane. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 6.
- Nasr-Esfahani, M.H., Razavi, S., Mozdarani, H., Mardani, M., and Azvagi, H. (2004a). Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia* 36, 95–100.

7. Referències

- Nasr-Esfahani, M.H., Salehi, M., Razavi, S., Mardani, M., Bahramian, H., Steger, K., and Oreizi, F. (2004b). Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod. Biomed. Online* 9, 652–658.
- Nasr-Esfahani, M.H., Salehi, M., Razavi, S., Anjomshoa, M., Rozbahani, S., Moulavi, F., and Mardani, M. (2005). Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 11, 198–205.
- Navarro-Costa, P., and Plancha, C.E. (2011). Heterochromatin: the hidden epigenetic geography of the Y chromosome. *Hum. Reprod. Update* 17, 434.
- Nazarov, I.B., Shlyakhtenko, L.S., Lyubchenko, Y.L., Zalenskaya, I.A., and Zalensky, A.O. (2008). Sperm chromatin released by nucleases. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 54, 37–46.
- Nili, H.A., Mozdarani, H., and Aleyasin, A. (2009). Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod. Biomed. Online* 18, 479–485.
- Nixon, B., Bielanowicz, A., McLaughlin, E.A., Tanphaichitr, N., Ensslin, M.A., and Aitken, R.J. (2009). Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J. Cell. Physiol.* 218, 122–134.
- Nixon, B., Mitchell, L.A., Anderson, A.L., McLaughlin, E.A., O'bryan, M.K., and Aitken, R.J. (2011). Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *J. Cell. Physiol.* 226, 2651–2665.
- O'Flaherty, C., Vaisheva, F., Hales, B.F., Chan, P., and Robaire, B. (2008). Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum. Reprod.* 23, 1044–1052.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update* 12, 417–435.
- Oliva, R., and Ballesca, J.L. (2012). Altered histone retention and epigenetic modifications in the sperm of infertile men. *Asian J. Androl.* 14, 239–240.
- Oliva, R., and Ballescà, J.L. (1999). Valoración Genética de la Pareja Estéril o Infértil. In *Temas de Actualidad En Andrología I*, J.L. Ballescà, ed. (Barcelona: Asociación Española de Andrología), pp. 31–92.
- Oliva, R., and Castillo, J. (2011a). Sperm Nucleoproteins. In *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, A. Zini, and A. Agarwal, eds. (New York: Springer), pp. 45–60.
- Oliva, R., and Castillo, J. (2011b). Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J. Androl.* 13, 24–30.
- Oliva, R., and Dixon, G.H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 40, 25–94.
- Oliva, R., and de Mateo, S. (2011). Medical implications of sperm nuclear quality. In *Epigenetics and Human Reproduction, Epigenetics and Human Health*, S. Rousseaux, and S. Khochbin, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag),.
- Oliva, R., and Mezquita, C. (1982). Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res.* 10, 8049–8059.
- Oliva, R., Mezquita, J., Mezquita, C., and Dixon, G.H. (1988). Haploid expression of the rooster protamine mRNA in the postmeiotic stages of spermatogenesis. *Dev. Biol.* 125, 332–340.

- Oliva, R., Bazett-Jones, D.P., Locklear, L., and Dixon, G.H. (1990). Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res.* 18, 2739–2747.
- Oliva, R., Martinez-Heredia, J., and Estanyol, J.M. (2008). Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 54, 23–36.
- Oliva, R., de Mateo, S., and Estanyol, J.M. (2009). Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9, 1004–1017.
- Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2004). Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 429, 154.
- Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291–298.
- Pacheco, S.E., Houseman, E.A., Christensen, B.C., Marsit, C.J., Kelsey, K.T., Sigman, M., and Boekelheide, K. (2011). Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One* 6, e20280.
- Park, K., Jeon, S., Song, Y.J., and Yi, L.S. (2012). Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 135, 53–61.
- Parte, P.P., Rao, P., Redij, S., Lobo, V., D'Souza, S.J., Gajbhiye, R., and Kulkarni, V. (2012). Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MS(E)) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. *J. Proteomics* 75, 5861–5871.
- Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J.M., Burgess, S.C., and Memili, E. (2008). Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.* 2, 19.
- Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398–1400.
- Petit, F.M., Serres, C., Bourgeon, F., Pineau, C., and Auer, J. (2013). Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum. Reprod.* 28, 852–865.
- Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A., and Mäenpää, P.H. (1994). Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50, 981–986.
- Pittoggi, C., Magnano, A.R., Sciamanna, I., Giordano, R., Lorenzini, R., and Spadafora, C. (2001). Specific localization of transcription factors in the chromatin of mouse mature spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 60, 97–106.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5354–5365.
- Pixton, K.L., Deeks, E.D., Flesch, F.M., Moseley, F.L.C., Björndahl, L., Ashton, P.R., Barratt, C.L.R., and Brewis, I.A. (2004). Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum. Reprod.* 19, 1438–1447.

7. Referències

- Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1608–1613.
- Plastira, K., Msaouel, P., Angelopoulou, R., Zanioti, K., Plastiras, A., Pothos, A., Bolaris, S., Papanastasiadis, N., and Mantas, D. (2007). The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 437–443.
- Platts, A.E., Dix, D.J., Chemes, H.E., Thompson, K.E., Goodrich, R., Rockett, J.C., Rawe, V.Y., Quintana, S., Diamond, M.P., Strader, L.F., et al. (2007). Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum. Mol. Genet.* 16, 763–773.
- Poland, V., Eubel, H., King, M., Solheim, C., Harvey Millar, A., and Baer, B. (2011). Stored sperm differs from ejaculated sperm by proteome alterations associated with energy metabolism in the honeybee *Apis mellifera*. *Mol. Ecol.* 20, 2643–2654.
- Pomerol, J.M., and Arrondo, J.L. (1994). *Práctica andrológica* (Barcelona: Masson-Salvat).
- Preissner, K.T., and Bronson, R.A. (2007). The role of multifunctional adhesion molecules in spermatogenesis and sperm function: Lessons from hemostasis and defense? *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 100–110.
- Pruslin, F.H., Imesch, E., Winston, R., and Rodman, T.C. (1987). Phosphorylation state of protamines 1 and 2 in human spermatids and spermatozoa. *Gamete Res.* 18, 179–190.
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Wessel, G.M., Chan, E.K., and Schatten, G. (2001). Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. *Exp. Cell Res.* 267, 45–60.
- Ramalho-Santos, J., Schatten, G., and Moreno, R.D. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 67, 1043–1051.
- Ramos, L., de Boer, P., Meuleman, E.J.H., Braat, D.D.M., and Wetzels, A.M.M. (2004). Chromatin condensation and DNA damage of human epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Reprod. Biomed. Online* 8, 392–397.
- Rando, O.J. (2012). Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell* 151, 702–708.
- Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2013). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155–168.
- Redgrove, K.A., Anderson, A.L., Dun, M.D., McLaughlin, E.A., O'Bryan, M.K., Aitken, R.J., and Nixon, B. (2011). Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitation-dependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae. *Dev. Biol.* 356, 460–474.
- Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089–1093.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernandez-Encinas, A., Amengual, M.J., Prada, E., Cortés, P., Navarro, J., and Benet, J. (2012a). Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 7, e44679.

- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., and Benet, J. (2012b). Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum. Reprod.* 27, 652–658.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M.J., Prada, E., Navarro, J., and Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 1, 715–722.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., and Benet, J. (2014). Nuclear degraded sperm subpopulation is affected by poor chromatin compaction and nuclease activity. *Andrologia*.
- Rice, J.C., and Allis, C.D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263–273.
- Roca, J., and Mezquita, C. (1989). DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *EMBO J.* 8, 1855–1860.
- Saowaros, W., and Panyim, S. (1979). The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia* 35, 191–192.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176–2178.
- Schagdarsurenjin, U., Paradowska, A., and Steger, K. (2012). Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat. Rev.* 9, 609–619.
- Schultz, R.M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* 8, 323–331.
- Secciani, F., Bianchi, L., Ermini, L., Cianti, R., Armini, A., La Sala, G.B., Focarelli, R., Bini, L., and Rosati, F. (2009). Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm. *J. Proteome Res.* 8, 3377–3389.
- Shaman, J.A., and Ward, W.S. (2006). Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.*, C.J. De Jonge, and C.L. Barratt, eds. (New York: Cambridge University Press), pp. 31–48.
- Shaman, J.A., Yamauchi, Y., and Ward, W.S. (2007). The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J. Cell. Biochem.* 102, 680–688.
- Sheoran, I.S., Ross, A.R., Olson, D.J., and Sawhney, V.K. (2007). Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *J. Exp. Bot.* 58, 3525–3535.
- Shetty, J., Naaby-Hansen, S., Shibahara, H., Bronson, R., Flickinger, C.J., and Herr, J.C. (1999). Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol. Reprod.* 61, 61–69.
- Shetty, J., Diekman, A.B., Jayes, F.C., Sherman, N.E., Naaby-Hansen, S., Flickinger, C.J., and Herr, J.C. (2001). Differential extraction and enrichment of human sperm surface proteins in a proteome: identification of immunocontraceptive candidates. *Electrophoresis* 22, 3053–3066.

7. Referències

- Simmons, L.W., Tan, Y.F., and Millar, A.H. (2013). Sperm and seminal fluid proteomes of the field cricket *Teleogryllus oceanicus*: identification of novel proteins transferred to females at mating. *Insect Mol. Biol.* 22, 115–130.
- Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., and Lewis, S.E.M. (2010). Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum. Reprod.* 25, 1594–1608.
- Simon, L., Lutton, D., McManus, J., and Lewis, S.E.M. (2011a). Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil. Steril.* 95, 652–657.
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., and Lewis, S.E.M. (2011b). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online* 23, 724–734.
- Siva, A.B., Kameshwari, D.B., Singh, V., Pavani, K., Sundaram, C.S., Rangaraj, N., Deenadayal, M., and Shivaji, S. (2010). Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 452–462.
- Skerget, S., Rosenow, M., Polpitiya, A., Petritis, K., Dorus, S., and Karr, T.L. (2013). The Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) Sperm Proteome. *Mol. Cell. Proteomics*.
- Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Rios, R., Morales, I., and Castro, A. (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum. Reprod.* 21, 986–993.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., and Meissner, A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484, 339–344.
- Soggiu, A., Piras, C., Hussein, H.A., De Canio, M., Gaviraghi, A., Galli, A., Urbani, A., Bonizzi, L., and Roncada, P. (2013). Unravelling the bull fertility proteome. *Mol. Biosyst.* 9, 1188–1195.
- Soldi, M., and Bonaldi, T. (2013). The Proteomic Investigation of Chromatin Functional Domains Reveals Novel Synergisms among Distinct Heterochromatin Components. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 764–780.
- Sotolongo, B., Lino, E., and Ward, W.S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol. Reprod.* 69, 2029–2035.
- Sotolongo, B., Huang, T.T.F., Isenberger, E., and Ward, W.S. (2005). An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J. Androl.* 26, 272–280.
- Steilmann, C., Cavalcanti, M.C., Bartkuhn, M., Pons-Kuhnemann, J., Schuppe, H.C., Weidner, W., Steger, K., and Paradowska, A. (2010). The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. *Reproduction* 140, 435–443.
- Suganuma, T., and Workman, J.L. (2010). Features of the PHF8/KIAA1718 histone demethylase. *Cell Res.* 20, 861–862.
- Sutovsky, P. (2009). Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e11.

- Sutovsky, P., and Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.*, C.J. De Jonge, and C.L. Barratt, eds. (New York: Cambridge University Press), pp. 1–30.
- Tarozzi, N., Nadalini, M., Stronati, A., Bizzaro, D., Dal Prato, L., Coticchio, G., and Borini, A. (2009). Anomalies in sperm chromatin packaging: implications for assisted reproduction techniques. *Reprod. Biomed. Online* 18, 486–495.
- Tavalaee, M., Razavi, S., and Nasr-Esfahani, M.H. (2009). Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil. Steril.* 91, 1119–1126.
- Torregrosa, N., Dominguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Shirley, C.R., Meistrich, M.L., Balleca, J.L., and Oliva, R. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod.* 21, 2084–2089.
- Toshimori, K., and Ito, C. (2003). Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch. Histol. Cytol.* 66, 383–396.
- Varum, S., Bento, C., Sousa, A.P.M., Gomes-Santos, C.S.S., Henriques, P., Almeida-Santos, T., Teodósio, C., Paiva, A., and Ramalho-Santos, J. (2007). Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil. Steril.* 87, 572–583.
- Vavouri, T., and Lehner, B. (2011). Chromatin organization in sperm may be the major functional consequence of base composition variation in the human genome. *PLoS Genet.* 7, e1002036.
- Wang, G., Guo, Y., Zhou, T., Shi, X., Yu, J., Yang, Y., Wu, Y., Wang, J., Liu, M., Chen, X., et al. (2013). In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *J. Proteomics* 79, 114–122.
- Ward, W.S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 30–36.
- Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1990). Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 20–25.
- Wassarman, P.M., Jovine, L., and Litscher, E.S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 3, E59–64.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 457–466.
- Westbrook, V.A., Schoppee, P.D., Vanage, G.R., Klotz, K.L., Diekman, A.B., Flickinger, C.J., Coppola, M.A., and Herr, J.C. (2006). Hominoid-specific SPANXA/D genes demonstrate differential expression in individuals and protein localization to a distinct nuclear envelope domain during spermatid morphogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 703–716.
- Winston, F., and Allis, C.D. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat. Struct. Biol.* 6, 601–604.
- World of Health Organization (1999). *WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction* (Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press).

7. Referències

- World of Health Organization (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (Geneva, Switzerland).
- Wright, S.J. (1999). Sperm nuclear activation during fertilization. *Curr. Top. Dev. Biol.* 46, 133–178.
- Wykes, S.M., and Krawetz, S.A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* 278, 29471–29477.
- Yamauchi, Y., Shaman, J.A., and Ward, W.S. (2011). Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J. Androl.* 13, 31–35.
- Yan, W., Si, Y., Slaymaker, S., Li, J., Zheng, H., Young, D.L., Aslanian, A., Saunders, L., Verdin, E., and Charo, I.F. (2010). Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. *J. Biol. Chem.* 285, 31418–31426.
- Yap, K.L., and Zhou, M.M. (2011). Structure and mechanisms of lysine methylation recognition by the chromodomain in gene transcription. *Biochemistry* 50, 1966–1980.
- Zalata, A., El-Mogy, M., Abdel-Khabir, A., El-Bayoumy, Y., El-Baz, M., and Mostafa, T. (2011). Sperm caspase-9 in oligoasthenoteratozoospermic men with and without varicocele. *Fertil. Steril.* 96, 1097–1099.
- Zalenskaya, I.A., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 213–218.
- Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N. V, Yau, P., and Bradbury, E.M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 43474–43480.
- Zaneveld, L.J., De Jonge, C.J., Anderson, R.A., and Mack, S.R. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 6, 1265–1274.
- Zeeberg, B.R., Feng, W., Wang, G., Wang, M.D., Fojo, A.T., Sunshine, M., Narasimhan, S., Kane, D.W., Reinhold, W.C., Lababidi, S., et al. (2003). GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.* 4, R28.
- Zhao, C., Huo, R., Wang, F.-Q., Lin, M., Zhou, Z.-M., and Sha, J.-H. (2007). Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil. Steril.* 87, 436–438.
- Zhou, X.-D., Ding, C.-H., Tai, H., Jin, Y., Chen, R.-Q., Lu, Q.-M., Wang, W.-Y., and Xiong, Y.-L. (2004). A novel disintegrin, jerdonatin, inhibits platelet aggregation and sperm-egg binding. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 117–122.
- Zhu, Z., Wang, Y., Li, X., Wang, Y., Xu, L., Wang, X., Sun, T., Dong, X., Chen, L., Mao, H., et al. (2010). PHF8 is a histone H3K9me2 demethylase regulating rRNA synthesis. *Cell Res.* 20, 794–801.
- Zimmerman, S., and Sutovsky, P. (2009). The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 83, 19–25.
- Zubkova, E. V, and Robaire, B. (2006). Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brown Norway rat. *Hum. Reprod.* 21, 2901–2910.

8. Annexos

8.1. Article publicat corresponent als resultats de l'objectiu 1.1: Castillo, Simon, de Mateo, Lewis, Oliva, 2011

Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S., and Oliva, R.

Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm

from infertile patients

Journal of Andrology (IF: 3,1)⁸, 2011

32, 324–332

⁸ La revista *Journal of Andrology* és l'actual *Andrology* (fusió amb *International Journal of Andrology*).

8.2. Article publicat i informació suplementària corresponents als resultats de l'objectiu 2.1: de Mateo, Castillo, Estanyol, Ballescà, Oliva, 2011

de Mateo, S., Castillo, J., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., and Oliva, R.

Proteomic characterization of the human sperm nucleus

Proteomics (IF: 4,13), 2011

11, 2714–2726

Taula Suplementària 8.1. Llistat de proteïnes identificades per espectrometria de masses a partir de l'anàlisi de nuclis aïllats d'espermatozoides normozoospèrmics.

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
TMEM89	Transmembrane protein 89	A2RUT3	6.9	2
TRYX2	Probable inactive trypsin-X2	A4D1T9	10.6	2
C2orf70	UPF0573 protein C2orf70	A6NJV1	11.9	2
FLJ92258	cDNA, FLJ92258, highly similar to Homo sapiens HMG2 like (LOC127540), mRNA	B2R4X7	22	3
FLJ79229	cDNA, FLJ79229, highly similar to Lactotransferrin (EC 3.4.21.-)	B7ZAL5	4	2
hCG_1816075	HCG1816075 / Putative uncharacterized protein ENSP00000392689	C9J1J8	14	2
PSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	O00231	16.8	7
PSMD14	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	O00487	40.3	11
PDXK	Pyridoxal kinase	O00764	15.7	3
GAPDHS	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	O14556	27.9	9
PSMA7	Proteasome subunit alpha type-7	O14818	39.1	5
LAMA5	Laminin subunit alpha-5	O15230	0,5	2
PSMD3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	O43242	13.5	6
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	O43318	8.6	4
IDH3B	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	O43837	22.1	7
NME2P1	Putative nucleoside diphosphate kinase	O60361	33.6	3
DPM1	Dolichol-phosphate mannosyltransferase	O60762	13.1	2
ZNF354A	Zinc finger protein 354A	O60765	4,5	4
HIST1H2BK	Histone H2B type 1-K	O60814	53.6	3
DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6	O75190	23.6	5
H2AFY	Core histone macro-H2A.1	O75367	15.9	3
CS	Citrate synthase, mitochondrial	O75390	7.1	4
GPC4	Glypican-4	O75487	3.1	2
BANF1	Barrier-to-autointegration factor	O75531	51.7	6
SPAG6	Sperm-associated antigen 6	O75602	3.9	2
PIAS2	E3 SUMO-protein ligase PIAS2	O75928	9.0	3
CABYR	Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein	O75952	6.5	3
AKAP3	A-kinase anchor protein 3	O75969	2.7	2
PSMG1	Proteasome assembly chaperone 1	O95456	13.9	3
BRP44	Brain protein 44	O95563	33.1	3
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	37.7	13
SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P00441	25.3	3
KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	P02533	20.6	3
KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	P02538	20	8
APOE	Apolipoprotein E	P02649	8.2	3
APCS	Serum amyloid P-component	P02743	32.7	10
ALB	Serum albumin	P02768	8.4	3
LTF	Lactotransferrin	P02788	18.6	13
FTH1	Ferritin heavy chain	P02794	22.4	4
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	22.0	6

8. Annexos

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	34.6	17
SEMG1	Semenogelin-1	P04279	55.4	22
TUBB4	Tubulin beta-4 chain	P04350	40	7
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	66.0	28
PRM2	Protamine-2	P04554	41.2	3
HIST1H2AB	Histone H2A type 1-B/E	P04908	58	3
ARG1	Arginase-1	P05089	9.3	2
S100A8	Protein S100-A8	P05109	35.5	4
SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	P05141	26.8	7
MPO	Myeloperoxidase	P05164	9.8	5
KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	3	4
ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	33	7
S100A9	Protein S100-A9	P06702	49.1	6
ENO1	Alpha-enolase	P06733	28.8	8
NPM1	Nucleophosmin	P06748	26.5	9
HIST1H2BJ	Histone H2B type 1-J	P06899	35.7	2
PGK2	Phosphoglycerate kinase 2	P07205	44.6	17
KLK3	Prostate-specific antigen	P07288	6.1	2
ANXA2	Annexin A2	P07355	18.0	5
TUBB	Tubulin beta chain	P07437	11.9	5
LDHC	L-lactate dehydrogenase C chain	P07864	43.4	16
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	12.3	10
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	10.5	3
CTSG	Cathepsin G	P08311	17.3	5
PDHA1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	P08559	13.1	2
CYC1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	P08574	23.1	5
KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	P08729	4.5	2
KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16	P08779	24.9	4
H2AFZ	Histone H2A.Z	POC055	53.9	4
HIST1H2AG	Histone H2A type 1	POC058	58	3
H2AFB1	Histone H2A-Bbd type 1	POC5Y9	53.9	4
H2AFB2	Histone H2A-Bbd type 2/3	POC5Z0	75.7	7
ACR	Acrosin	P10323	21.6	18
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	P11021	5	3
PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	P11177	7.5	2
ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P11310	36.3	12
SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	P12235	7.4	2
SLC25A6	ADP/ATP translocase 3	P12236	24.8	2
PIP	Prolactin-inducible protein	P12273	26.0	4
EEF2	Elongation factor 2	P13639	5.2	3
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	P13645	41.8	18
KRT13	Keratin, type I cytoskeletal 13	P13646	23.1	7
KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	P13647	10.0	3
ALAD	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	P13716	14.5	2
PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	9.8	5
HSP90B1	Endoplasmic	P14625	3.7	3

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
GLUL	Glutamine synthetase	P15104	23.6	13
PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	P15259	19.4	7
ACPP	Prostatic acid phosphatase	P15309	11.9	3
NME1	Nucleoside diphosphate kinase A	P15531	26.3	3
RPS2	40S ribosomal protein S2	P15880	13.3	3
DSP	Desmoplakin	P15924	2.1	3
H2AFX	Histone H2A.x	P16104	58.0	2
ACADS	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P16219	32.0	17
GOT1	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	P17174	25.9	8
PRKACA	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	P17612	15.1	5
PSMC3	26S protease regulatory subunit 6A	P17980	23.2	8
RPL7	60S ribosomal protein L7	P18124	43.5	11
RPL17	60S ribosomal protein L17	P18621	13.6	2
RCC1	Regulator of chromosome condensation	P18754	27.8	12
KRT15	Keratin, type I cytoskeletal 15	P19012	12	3
KRT4	Keratin, type II cytoskeletal 4	P19013	5	2
CSNK2A2	Casein kinase II subunit alpha'	P19784	5.4	2
PSMB1	Proteasome subunit beta type-1	P20618	64.7	15
HIST1H2AD	Histone H2A type 1-D	P20671	32	2
FLG	Filaggrin	P20930	20.0	31
GSTM3	Glutathione S-transferase Mu 3	P21266	24.9	4
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	16.3	5
RPS4Y1	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1	P22090	23.2	4
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314	5.4	3
NME2	Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	33.6	3
HIST1H1T	Histone H1t	P22492	25.6	6
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	28.2	5
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P23381	7.9	2
HIST1H2BO	Histone H2B type 1-O	P23527	35.7	2
ATP5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	P24539	12.5	2
AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	29.8	6
DNAJB1	DnaJ homolog subfamily B member 1	P25685	25.6	7
PSMA1	Proteasome subunit alpha type-1	P25786	63.9	24
PSMA2	Proteasome subunit alpha type-2	P25787	54.3	13
PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3	P25788	46.7	18
PSMA4	Proteasome subunit alpha type-4	P25789	30.7	13
RPL13	60S ribosomal protein L13	P26373	30.3	7
EEF1G	Elongation factor 1-gamma	P26641	5.5	2
CALR	Calreticulin	P27797	14	2
PSMA5	Proteasome subunit alpha type-5	P28066	35.7	8
PSMB4	Proteasome subunit beta type-4	P28070	52.3	9
PSMB6	Proteasome subunit beta type-6	P28072	31.8	6
PSMB5	Proteasome subunit beta type-5	P28074	48.3	12
LAP3	Cytosol aminopeptidase	P28838	11	4
SERPINB3	Serpin B3	P29508	31.5	13
EEF1D	Elongation factor 1-delta	P29692	9.3	2
PDHA2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, testis-specific form, mitochondrial	P29803	20.1	8

8. Annexos

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P30086	22.5	3
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	P30101	13.9	6
RPL9	60S ribosomal protein L9	P32969	33.3	4
HIST1H2BB	Histone H2B type 1-B	P33778	35.7	2
KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	40.4	7
MYH10	Myosin-10	P35580	2.1	2
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3	P35625	9.5	2
CYLC1	Cylicin-1	P35663	5.7	7
KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	39.7	12
PSMC2	26S protease regulatory subunit 7	P35998	14.5	5
RPL4	60S ribosomal protein L4	P36578	24.1	10
PPP1CC	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	P36873	15.2	4
GNL1	Guanine nucleotide-binding protein-like 1	P36915	6.1	2
DLST	Dihydropolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	P36957	38.2	18
GPX4	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	P36969	40.1	12
TALDO1	Transaldolase	P37837	30.3	15
RPL3	60S ribosomal protein L3	P39023	24.6	11
RPL13A	60S ribosomal protein L13a	P40429	30.0	6
MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	P40926	40.5	12
PSMC4	26S protease regulatory subunit 6B	P43686	24.6	10
VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880	32.0	12
RPS9	40S ribosomal protein S9	P46781	48.5	14
ATP5O	ATP synthase subunit O, mitochondrial	P48047	19.7	3
PSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	P48556	16.0	3
CENPA	Histone H3-like centromeric protein A	P49450	16.4	3
PSMB3	Proteasome subunit beta type-3	P49720	44.4	8
PSMB2	Proteasome subunit beta type-2	P49721	47.3	9
IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	P50213	19.9	8
PSMD7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	P51665	16.7	6
PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	P52209	13.7	4
SLC25A1	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	P53007	18.6	3
CRISP1	Cysteine-rich secretory protein 1	P54107	12.9	4
HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	33.5	18
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	38.0	23
MANF	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	P55145	28.5	5
ATP5J2	ATP synthase subunit f, mitochondrial	P56134	25.5	3
H2BFS	Histone H2B type F-S	P57053	53.6	3
MLF1	Myeloid leukemia factor 1	P58340	54.9	11
HIST1H2BD	Histone H2B type 1-D	P58876	57.1	3
TPI1	Triosephosphate isomerase	P60174	48.2	11
PSMA6	Proteasome subunit alpha type-6	P60900	45.1	20
RAB2A	Ras-related protein Rab-2A	P61019	12	2
RPS3A	40S ribosomal protein S3a	P61247	17.8	4
PSME3	Proteasome activator complex subunit 3	P61289	39.4	9

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
RPL15	60S ribosomal protein L15	P61313	51.5	15
RPL27	60S ribosomal protein L27	P61353	43.4	5
RPL37A	60S ribosomal protein L37a	P61513	37.0	4
RPS7	40S ribosomal protein S7	P62081	15.5	2
PPP1CA	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	P62136	12.4	3
PPP1CB	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	P62140	12.4	3
CALM1/2/3	Calmodulin	P62158	16.8	2
PSMC1	26S protease regulatory subunit 4	P62191	13.2	4
PSMC5	26S protease regulatory subunit 8	P62195	34.5	14
RPS8	40S ribosomal protein S8	P62241	31.2	6
RPS18	40S ribosomal protein S18	P62269	20.4	3
SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	P62314	27.7	2
PSMC6	26S protease regulatory subunit S10B	P62333	33.7	13
RPL7A	60S ribosomal protein L7a	P62424	7.9	2
RPS6	40S ribosomal protein S6	P62753	11.2	2
HIST4H4	Histone H4	P62805	68.0	34
HIST1H2BC	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	P62807	53.6	3
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	P62826	25.0	5
RPS24	40S ribosomal protein S24	P62847	20.3	2
RPS25	40S ribosomal protein S25	P62851	17.6	2
RPL10A	60S ribosomal protein L10a	P62906	13.4	3
UBB	Ubiquitin	P62988	77.6	9
TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	P62995	10.4	2
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	23.7	4
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63261	29.6	9
UBE2I	SUMO-conjugating enzyme UBC9	P63279	20.3	3
CSNK2B	Casein kinase II subunit beta	P67870	14.4	3
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	P68104	5.6	3
TUBB2C	Tubulin beta-2C chain	P68371	11.9	5
CSNK2A1	Casein kinase II subunit alpha	P68400	28.1	9
HIST1H3A	Histone H3.1	P68431	28.7	6
H3F3	Histone H3.3	P84243	28.7	6
CYCS	Cytochrome c	P99999	56.2	7
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial	Q00059	44.3	13
KRT76	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral	Q01546	3	3
PFKP	6-phosphofructokinase type C	Q01813	5.1	3
SEMG2	Semenogelin-2	Q02383	24.9	13
RPL6	60S ribosomal protein L6	Q02878	13.9	3
SLC25A11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Q02978	7.0	2
DST	Bullous pemphigoid antigen 1	Q03001	1.4	3
TLE4	Transducin-like enhancer protein 4	Q04727	6.6	4
SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	Q04837	68.2	12
PRDX1	Peroxiredoxin-1	Q06830	43.2	7
RPL18	60S ribosomal protein L18	Q07020	24.5	5
SFRS1	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	Q07955	11.7	3
IFRD2	Interferon-related developmental regulator 2	Q12894	7.2	3
PRDX4	Peroxiredoxin-4	Q13162	40.6	10

8. Annexos

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
TUBB3	Tubulin beta-3 chain	Q13509	6.5	2
TUBA3C	Tubulin alpha-3C/D chain	Q13748	13.6	3
BLMH	Bleomycin hydrolase	Q13867	9	3
TUBB2A	Tubulin beta-2A chain	Q13885	11.9	5
CCIN	Calicin	Q13939	7.5	4
CYLC2	Cylicin-2	Q14093	15.8	5
TRIP12	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	Q14669	1.2	2
ODF1	Outer dense fiber protein 1	Q14990	8.8	2
PSME4	Proteasome activator complex subunit 4	Q14997	1.9	2
SUZ12	Polycomb protein SUZ12	Q15022	3.8	2
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3	Q15185	12.5	2
PPP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Q15435	5.0	2
TOMM34	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	Q15785	12.9	2
HIST3H3	Histone H3.1t	Q16695	28.7	6
DECR1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	Q16698	12.8	3
HIST2H2AC	Histone H2A type 2-C	Q16777	63.6	3
HIST2H2BE	Histone H2B type 2-E	Q16778	35.7	2
NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	Q16795	29.2	10
UGP2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Q16851	28.0	14
DGUOK	Deoxyguanosine kinase, mitochondrial	Q16854	13.4	2
C19orf36	Uncharacterized protein C19orf36	Q17YL8	9.1	2
SPANX-C	SPANX-C	Q32WJ3	73	13
SPANX-B	SPANX-B	Q32WN1	55	12
DAK	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	Q3LXA3	13.7	4
ODF2	Outer dense fiber protein 2	Q5BJF6	3.5	3
FLG2	Filaggrin-2	Q5D862	2.0	2
KKLC1	Kita-kyushu lung cancer antigen 1	Q5H943	30.1	3
ZNF766	Zinc finger protein 766	Q5HY98	9.0	2
AKAP4	A-kinase anchor protein 4	Q5JQC9	21.2	19
C20orf107	Uncharacterized protein C20orf107	Q5JX69	38.0	3
C20orf106	Uncharacterized protein C20orf106	Q5JX71	38.0	7
HIST2H2BF	Histone H2B type 2-F	Q5QNW6	57.1	3
C6orf10	Uncharacterized protein C6orf10	Q5SRN2	6.9	7
C6orf81	Uncharacterized protein C6orf81	Q5T9G4	18.5	3
HIST2H3PS2	Histone H3	Q5TEC6	19	9
EEF1AL3	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	Q5VTE0	32.7	15
LARP1B	La-related protein 1B	Q659C4	4,5	2
C2orf16	Uncharacterized protein C2orf16	Q68DN1	1.7	2
CYB5R2	NADH-cytochrome b5 reductase 2	Q6BCY4	54.7	13
HIST2H2AA	Histone H2A type 2-A	Q6FI13	63.6	3
FAM166A	Protein FAM166A	Q6J272	7.6	2
DPY19L2	Protein dpy-19 homolog 2	Q6NUT2	8.7	5
-	Putative 60S ribosomal protein L13a-like MGC87657	Q6NVV1	18.6	2
TMEM53	Transmembrane protein 53	Q6P2H8	10.5	2
TUBA3E	Tubulin alpha-3E chain	Q6PEY2	13.6	3
MORN3	MORN repeat-containing protein 3	Q6PF18	11.2	2
ZPBP2	Zona pellucida-binding protein 2	Q6X784	12.7	4

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
FLJ16831	cDNA FLJ16831 fis, clone TESTI2046536	Q6ZMM0	20	3
C9orf144B	Transmembrane protein C9orf144B	Q6ZU69	2.4	2
H3FM	Histone H3.2	Q71DI3	28.7	6
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	Q71U36	13.6	3
H2AFV	Histone H2A.V	Q71UI9	53.9	4
H1FNT	Testis-specific H1 histone	Q75WM6	34.5	8
ASRGL1	L-asparaginase	Q7L266	15.9	4
DCXR	L-xylulose reductase	Q7Z4W1	16.0	2
TMCO2	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 2	Q7Z6W1	32.4	7
EVC2	Limbin	Q86UK5	3.7	3
SLC25A42	Solute carrier family 25 member 42	Q86VD7	23.0	5
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Q86VP6	2.4	2
NIT1	Nitrilase homolog 1	Q86X76	5.5	2
KRT73	Keratin, type II cytoskeletal 73	Q86Y46	4	4
HRNR	Hornerin	Q86YZ3	2.8	2
HIST2H2AB	Histone H2A type 2-B	Q8IUE6	30.0	3
VRK3	Serine/threonine-protein kinase VRK3	Q8IV63	11.4	8
FAM71A	Protein FAM71A	Q8IYT1	11.8	7
C7orf61	Uncharacterized protein C7orf61	Q8IZ16	33.0	6
HIST3H2BB	Histone H2B type 3-B	Q8N257	35.7	2
FTMT	Ferritin, mitochondrial	Q8N4E7	42.6	9
SCCPDH	Probable saccharopine dehydrogenase	Q8NBX0	18.4	7
C9orf24	Uncharacterized protein C9orf24	Q8NCR6	27.9	11
NPEPL1	Probable aminopeptidase NPEPL1	Q8NDH3	6.7	2
ACRBP	Acrosin-binding protein	Q8NEB7	8.7	3
SYNE1	Nesprin-1	Q8NF91	1	6
NUP37	Nucleoporin Nup37	Q8NFB4	7.7	2
CMAS	N-acylneuraminate cytidyltransferase	Q8NFW8	5.5	2
DNAJB8	DnaJ homolog subfamily B member 8	Q8NHS0	27.2	4
PSMA8	Proteasome subunit alpha type-7-like	Q8TAA3	52.3	12
SPANXE	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome E	Q8TAD1	48.5	3
NPLOC4	Nuclear protein localization protein 4 homolog	Q8TAT6	5.3	3
GDAP1	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	Q8TB36	15.9	5
FAM71B	Protein FAM71B	Q8TC56	29.8	31
FNDC8	Fibronectin type III domain-containing protein 8	Q8TC99	18.2	5
SLC2A14	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	Q8TDB8	8.1	3
GNPDA2	Glucosamine-6-phosphate isomerase 2	Q8TDQ7	13.4	3
C16orf78	Uncharacterized protein C16orf78	Q8WTQ4	7.2	2
PTPMT1	Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1	Q8WUK0	16.9	2
RNF138	E3 ubiquitin-protein ligase RNF138	Q8WVD3	14.7	3
TEKT4	Tektin-4	Q8WW24	21	7
HMGB4	High mobility group protein B4	Q8WW32	43.0	12
DNAJC9	DnaJ homolog subfamily C member 9	Q8WXX5	56.2	16
RSPH1	Radial spoke head 1 homolog	Q8WYR4	19.1	6
TMEM190	Transmembrane protein 190	Q8WZ59	7.9	2

8. Annexos

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase	Q92820	26.7	9
UFD1L	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	Q92890	17.9	5
HIST1H2AC	Histone H2A type 1-C	Q93077	63.1	2
HIST1H2BH	Histone H2B type 1-H	Q93079	57.1	3
PSMG2	Proteasome assembly chaperone 2	Q969U7	12.1	4
TEKT1	Tektin-1	Q969V4	48.3	18
TSH2B	Histone H2B type 1-A	Q96A08	69.3	7
OTUB2	Ubiquitin thioesterase OTUB2	Q96DC9	18.8	3
NUDT16	U8 snoRNA-decapping enzyme	Q96DE0	21.0	2
C4orf43	UPF0534 protein C4orf43	Q96EY4	20.7	3
DYNLL2	Dynein light chain 2, cytoplasmic	Q96FJ2	20.2	2
REEP6	Receptor expression-enhancing protein 6	Q96HR9	12.5	2
LYZL4	Lysozyme-like protein 4	Q96KX0	15.8	2
CAPZA3	F-actin-capping protein subunit alpha-3	Q96KX2	9.0	3
RPL10L	60S ribosomal protein L10-like	Q96L21	17.8	2
FAM81B	Protein FAM81B	Q96LP2	5.3	2
TEKT5	Tektin-5	Q96M29	11.1	7
PACRG	Parkin coregulated gene protein	Q96M98	9.8	2
NT5C1B	Cytosolic 5'-nucleotidase 1B	Q96P26	8.7	3
TSSK2	Testis-specific serine/threonine-protein kinase 2	Q96PF2	11.2	5
ZNF317	Zinc finger protein 317	Q96PQ6	15	6
HIST1H2AA	Histone H2A type 1-A	Q96QV6	35.1	7
PSMB7	Proteasome subunit beta type-7	Q99436	30.3	7
PARK7	Protein DJ-1	Q99497	32.3	4
HIST1H4G	Histone H4-like protein type G	Q99525	14	9
PHB2	Prohibitin-2	Q99623	18.4	4
HIST1H2BN	Histone H2B type 1-N	Q99877	57.1	3
HIST1H2BM	Histone H2B type 1-M	Q99879	57.1	3
HIST1H2BL	Histone H2B type 1-L	Q99880	57.1	3
BAG1	BAG family molecular chaperone regulator 1	Q99933	7.8	2
TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	Q9BQE3	42	10
ZBPB	Zona pellucida-binding protein 1	Q9BS86	28.5	10
COPS4	COP9 signalosome complex subunit 4	Q9BT78	6.2	2
AARSD1	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1	Q9BTE6	7.3	2
TUBB6	Tubulin beta-6 chain	Q9BUF5	22	6
KATNB1	Katanin p80 WD40-containing subunit B1	Q9BVA0	5.8	4
TUBB2B	Tubulin beta-2B chain	Q9BVA1	11.9	5
DPCD	Protein DPCD	Q9BVM2	13.3	2
FUNDC2	FUN14 domain-containing protein 2	Q9BWH2	12.2	2
CHID1	Chitinase domain-containing protein 1	Q9BWS9	21.6	6
PHF7	PHD finger protein 7	Q9BWX1	17.1	4
TSSK6	Testis-specific serine/threonine-protein kinase 6	Q9BXA6	13.9	3
TEKT3	Tektin-3	Q9BXF9	54.1	36
SPANXD	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome D	Q9BXN6	48.5	3
LDHAL6B	L-lactate dehydrogenase A-like 6B	Q9BYZ2	36.2	12
GTPBP4	Nucleolar GTP-binding protein 1	Q9BZE4	5.7	3
C1orf128	UPF0424 protein C1orf128	Q9GZP4	15.2	2
KIAA1683	Uncharacterized protein KIAA1683	Q9H0B3	12.5	10

Nom del gen	Descripció de la proteïna	Núm. d'accés UniprotKB	Protein coverage (%)	# Pèptids
SLC25A31	ADP/ATP translocase 4	Q9H0C2	33.3	9
RIBC2	RIB43A-like with coiled-coils protein 2	Q9H4K1	6.1	2
BANF2	Barrier-to-autointegration factor-like protein	Q9H503	37.8	4
ACTR8	Actin-related protein 8	Q9H981	11.9	5
NMNAT1	Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 1	Q9HAN9	13.6	4
ROPN1	Ropporin-1A	Q9HAT0	25.0	5
RDH14	Retinol dehydrogenase 14	Q9HBH5	13.1	3
SLC25A19	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	Q9HC21	19.7	8
RANGRF	Ran guanine nucleotide release factor	Q9HD47	15.1	2
BRD7	Bromodomain-containing protein 7	Q9NPI1	8.8	3
ACOT13	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	Q9NPJ3	15.7	2
SDR39U1	Epimerase family protein SDR39U1	Q9NRG7	10.7	2
AAAS	Aladin	Q9NRG9	3.5	2
SPANXB1	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome B/F	Q9NS25	79.6	7
SPANXA1	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome A	Q9NS26	46.4	11
LANCL2	LanC-like protein 2	Q9NS86	5.8	2
CUTC	Copper homeostasis protein cutC homolog	Q9NTM9	35.2	10
TMEM38B	Trimeric intracellular cation channel type B	Q9NVV0	10.3	2
SPANXC	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome C	Q9NY87	67.0	4
TECR	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase	Q9NZ01	13.3	6
MAT2B	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	Q9NZL9	10.2	2
THYN1	Thymocyte nuclear protein 1	Q9P016	15.1	3
SLC25A10	Mitochondrial dicarboxylate carrier	Q9UBX3	23.0	5
NIPSNAP3A	Protein NipSnap homolog 3A	Q9UFN0	17.8	3
TES	Testin	Q9UGI8	6.7	2
TEKT2	Tektin-2	Q9UIF3	16.3	6
NUDT5	ADP-sugar pyrophosphatase	Q9UUK9	11.4	2
BAG5	BAG family molecular chaperone regulator 5	Q9UL15	24.8	8
DNPEP	Aspartyl aminopeptidase	Q9ULA0	27	7
OAZ3	Ornithine decarboxylase antizyme 3	Q9UMX2	8.0	2
PSMD13	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q9UNM6	12.8	3
CAMK2A	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	Q9UQM7	18	7
VDAC3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	Q9Y277	33.2	11
TP53TG5	TP53-target gene 5 protein	Q9Y2B4	13.4	3
AMDHD2	Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	Q9Y303	5.1	2
ACTL7A	Actin-like protein 7A	Q9Y615	6.9	3
GPC6	Glypican-6	Q9Y625	3.1	2
MTCH2	Mitochondrial carrier homolog 2	Q9Y6C9	20.5	4
hCG1645967		-	12	4

8.3. Informació suplementària corresponent als resultats de l'objectiu 2.2

Taula Suplementària 8.3.1. Llistat de proteïnes identificades per espectrometria de masses a partir de l'anàlisi de les fraccions soluble i insoluble obtingudes després de l'extracció amb NaCl 0,65 M.

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Fracció soluble de la cromatina espermàtica (475)								
Q6NUT2	Protein dpy-19 homolog 2	36,28	24	24	193	758	87,3	9,10
Q5VU65	Nuclear pore membrane glycoprotein 210-like	21,40	32	32	40	1888	210,5	7,50
Q9H0B3	Uncharacterized protein KIAA1683	13,14	11	11	13	1180	127,6	10,23
Q9UFH2	Dynein heavy chain 17, axonemal	3,03	9	10	10	4485	511,5	5,77
Q92523	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	13,99	9	9	10	772	87,7	8,62
Q16531	DNA damage-binding protein 1	8,77	9	9	9	1140	126,9	5,26
Q9BTX1	Nucleoporin NDC1	11,28	5	5	7	674	76,3	9,09
Q9BVG9	Phosphatidylserine synthase 2	16,02	6	6	8	487	56,2	6,25
Q13939	Calicin	14,97	8	8	8	588	66,5	8,18
Q13733	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4	10,40	6	7	7	1029	114,1	6,64
POC5Z0	Histone H2A-Bbd type 2/3	66,96	5	5	6	115	12,7	10,67
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	9,43	5	6	7	806	89,3	5,26
Q8TDB8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	11,73	6	6	7	520	56,3	7,83
Q9NZ01	Trans-2,3-enoyl-CoA reductase	25,32	8	8	8	308	36,0	9,45
P28074	Proteasome subunit beta type-5	22,81	5	5	6	263	28,5	6,92
POCG47	Polyubiquitin-B	56,33	4	4	6	229	25,7	7,43
Q96A08	Histone H2B type 1-A	26,77	4	4	6	127	14,2	10,32
P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	6,61	5	5	5	1241	137,8	6,60
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	13,95	2	6	6	473	51,2	5,05
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	6,91	5	5	6	1042	114,7	5,34
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	13,97	2	6	6	458	49,6	4,96
Q14997	Proteasome activator complex subunit 4	3,36	4	4	5	1843	211,2	6,90
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	12,04	1	5	5	432	48,1	5,02
Q6P1A2	Lysophospholipid acyltransferase 5	11,09	5	5	5	487	56,0	8,69
Q6UW68	Transmembrane protein 205	20,63	3	3	5	189	21,2	8,62
B7ZAQ6	Golgi pH regulator A	13,85	4	4	4	455	52,9	9,28
Q8TAA3	Proteasome subunit alpha type-7-like	26,17	5	5	5	256	28,5	8,98

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P22732	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	8,18	4	4	5	501	54,9	6,04
Q96S97	Myeloid-associated differentiation marker	10,25	2	2	4	322	35,3	8,15
Q9NQ6	Fascin-3	10,64	4	4	5	498	56,6	7,72
Q96QV6	Histone H2A type 1-A	29,77	1	3	4	131	14,2	10,86
Q96QE4	Leucine-rich repeat-containing protein 37B	4,75	4	4	5	947	105,5	4,91
Q9Y3E0	Vesicle transport protein GOT1B	18,84	3	3	4	138	15,4	10,36
P18754	Regulator of chromosome condensation	13,78	5	5	5	421	44,9	7,52
Q5BKT4	Alpha-1,2-glucosyltransferase ALG10-A	6,13	2	2	3	473	55,6	9,29
P36969	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	17,77	3	3	4	197	22,2	8,37
Q9NVV0	Trimeric intracellular cation channel type B	14,43	3	3	4	291	32,5	9,06
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	21,30	4	4	4	216	24,4	7,49
P53985	Monocarboxylate transporter 1	5,80	2	2	3	500	53,9	8,66
Q5JX69	Uncharacterized protein C20orf107	22,81	2	3	3	171	19,5	8,84
O14520	Aquaporin-7	9,94	3	3	3	342	37,2	8,95
P33947	ER lumen protein retaining receptor 2	13,21	2	2	3	212	24,4	8,72
P46977	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A	5,67	4	4	4	705	80,5	8,07
Q96KK5	Histone H2A type 1-H	27,34	1	3	3	128	13,9	10,89
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	8,56	3	3	3	362	40,1	9,38
Q9H9S3	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2	8,61	2	2	3	476	52,2	8,06
P62805	Histone H4	29,13	3	3	3	103	11,4	11,36
O43242	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	7,30	3	3	3	534	60,9	8,44
P27487	Dipeptidyl peptidase 4	4,96	3	3	3	766	88,2	6,04
Q9HOC2	ADP/ATP translocase 4	7,94	1	2	2	315	35,0	9,89
O14683	Tumor protein p53-inducible protein 11	13,23	2	2	2	189	21,0	9,55
Q8TC56	Protein FAM71B	4,30	2	2	2	605	64,7	9,48
Q9GZP9	Derlin-2	17,15	2	2	2	239	27,5	7,28
P20648	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	3,96	1	2	2	1035	114,0	5,81
Q96RN1	Testis anion transporter 1	2,78	2	2	2	970	108,9	6,24

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
Q8N0U8	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like protein 1	11,36	2	2	2	176	19,8	9,13
O75352	Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein	9,72	2	2	2	247	26,6	8,94
Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	4,20	2	2	2	953	105,8	5,39
Q5JX71	Uncharacterized protein C20orf106	12,87	1	2	2	171	19,6	9,42
P05141	ADP/ATP translocase 2	7,05	1	2	2	298	32,9	9,74
P29218	Inositol monophosphatase 1	7,22	2	2	2	277	30,2	5,26
O00400	Acetyl-coenzyme A transporter 1	6,56	2	2	2	549	60,9	7,33
Q9H3K2	Growth hormone-inducible transmembrane protein	5,80	2	2	2	345	37,2	9,94
Q8IZ16	Uncharacterized protein C7orf61	10,68	2	2	2	206	23,8	10,40
Q8NFW8	N-acylneuraminate cytidyltransferase	4,61	2	2	2	434	48,3	7,93
Q9P225	Dynein heavy chain 2, axonemal	0,66	1	2	2	4427	507,4	6,37
P28070	Proteasome subunit beta type-4	6,82	2	2	2	264	29,2	5,97
P99999	Cytochrome c	23,81	2	2	2	105	11,7	9,57
Q6NXT2	Histone H3.3C	11,85	2	2	2	135	15,2	11,11
Q5JQC9	A-kinase anchor protein 4	2,34	2	2	2	854	94,4	6,96
Q75WM6	Testis-specific H1 histone	9,41	2	2	2	255	28,1	11,78
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	21,71	18	18	20	1230	136,3	5,78
O60309	Leucine-rich repeat-containing protein 37A3	12,36	11	11	16	1634	180,5	5,31
Q96JB1	Dynein heavy chain 8, axonemal	4,32	15	16	16	4490	514,3	6,32
O00410	Importin-5	12,67	8	10	14	1097	123,5	4,94
P19367	Hexokinase-1	15,92	14	14	16	917	102,4	6,80
P26640	Valyl-tRNA synthetase	14,79	12	12	13	1264	140,4	7,59
Q9NTJ4	Alpha-mannosidase 2C1	13,08	10	10	10	1040	115,8	6,57
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	11,25	7	7	7	1058	117,8	5,76
Q8TEX9	Importin-4	8,51	6	6	7	1081	118,6	4,96
O43847	Nardilysin	7,83	7	7	7	1150	131,5	5,00
O75928	E3 SUMO-protein ligase PIAS2	15,78	7	7	7	621	68,2	7,52
Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205	3,28	6	6	6	2012	227,8	6,19
Q14669	Probable E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	3,46	5	5	5	1992	220,3	8,48
Q5SRE5	Nucleoporin NUP188 homolog	3,60	5	5	5	1749	195,9	6,73
Q93009	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	4,81	5	5	5	1102	128,2	5,55
O14980	Exportin-1	4,76	3	3	3	1071	123,3	6,06
Q13200	26S proteasome non-ATPase	5,73	3	3	4	908	100,1	5,20

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
	regulatory subunit 2							
P14625	Endoplasmin	5,23	3	3	3	803	92,4	4,84
Q9UPP1	Histone lysine demethylase PHF8	5,19	4	4	4	1060	117,8	8,72
P53396	ATP-citrate synthase	4,36	3	3	3	1101	120,8	7,33
Q13748	Tubulin alpha-3C/D chain	9,56	3	3	3	450	49,9	5,10
Q68DN1	Uncharacterized protein C2orf16	1,92	3	3	3	1984	224,2	10,08
Q5JRX3	Presequence protease, mitochondrial	3,09	3	3	3	1037	117,4	6,98
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	3,60	1	2	2	639	70,0	5,74
Q14525	Keratin, type I cuticular Ha3-II	3,96	1	2	2	404	46,2	4,84
Q96JQ2	Calmin	3,59	3	3	3	1002	111,6	4,94
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	33,47	13	23	31	732	84,6	5,02
Q9UIA9	Exportin-7	24,75	21	21	24	1087	123,8	6,32
P02788	Lactotransferrin	24,08	15	15	19	710	78,1	8,12
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	26,93	3	16	20	724	83,2	5,03
P55060	Exportin-2	19,16	12	12	16	971	110,3	5,77
Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	13,20	10	10	12	1023	115,9	6,86
Q9H0K4	Radial spoke head protein 6 homolog A	17,43	8	8	9	717	80,9	4,39
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	16,78	10	10	10	858	95,7	5,03
Q14974	Importin subunit beta-1	14,04	8	8	9	876	97,1	4,78
Q68CQ1	Uncharacterized protein C1orf175	4,91	5	5	5	1323	145,6	6,99
P27824	Calnexin	11,32	5	5	5	592	67,5	4,60
P13798	Acylamino-acid-releasing enzyme	7,79	5	5	5	732	81,2	5,48
P14314	Glucosidase 2 subunit beta	10,23	5	5	5	528	59,4	4,41
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog	7,76	5	5	5	760	87,9	5,31
Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	7,69	4	4	4	780	85,4	7,61
P12821	Angiotensin-converting enzyme	2,99	4	4	4	1306	149,6	6,39
P13639	Elongation factor 2	4,66	3	3	3	858	95,3	6,83
Q5JST6	EF-hand domain-containing family member C2	4,41	3	3	3	749	87,3	7,37
Q13618	Cullin-3	4,95	3	3	3	768	88,9	8,48
Q9H2T7	Ran-binding protein 17	2,76	2	2	2	1088	124,3	6,44
POCG48	Polyubiquitin-C	32,85	2	2	2	685	77,0	7,66
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	4,10	2	2	2	952	105,3	5,99
Q9NSE4	Isoleucyl-tRNA synthetase, mitochondrial	3,06	2	2	2	1012	113,7	7,20
POC055	Histone H2A.Z	12,50	2	2	2	128	13,5	10,58

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
O95757	Heat shock 70 kDa protein 4L	2,98	2	2	2	839	94,5	5,88
P11169	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	3,23	2	2	2	496	53,9	7,20
Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	23,68	12	12	19	608	68,1	6,38
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	33,79	14	17	20	654	72,3	5,16
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	27,40	6	13	18	646	70,9	5,52
Q01813	6-phosphofructokinase type C	22,32	12	13	17	784	85,5	7,55
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	23,56	4	10	11	641	70,0	5,66
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	18,79	1	10	15	564	60,0	8,00
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	18,88	2	9	10	641	70,3	6,02
Q9UKU0	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	21,23	11	12	12	697	77,7	7,43
P33121	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	21,06	10	12	12	698	77,9	7,15
P27797	Calreticulin	25,90	8	8	12	417	48,1	4,44
P41250	Glycyl-tRNA synthetase	15,43	7	7	9	739	83,1	7,03
Q6UWU2	Beta-galactosidase-1-like protein	17,13	8	8	9	654	74,1	8,92
Q5JVL4	EF-hand domain-containing protein 1	12,19	7	7	8	640	73,9	6,16
P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	11,40	7	7	7	763	82,9	9,04
P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	11,99	6	6	7	584	65,4	7,61
P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	10,05	5	5	5	647	69,0	7,84
P02768	Serum albumin	10,18	6	6	6	609	69,3	6,28
O15355	Protein phosphatase 1G	10,62	5	5	5	546	59,2	4,36
Q5BJF6	Outer dense fiber protein 2	5,91	4	4	4	829	95,3	7,62
Q9UNN5	FAS-associated factor 1	8,92	5	5	5	650	73,9	4,88
O95573	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	7,78	4	4	4	720	80,4	8,38
Q6IA69	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase	7,22	4	4	4	706	79,2	6,44
Q15046	Lysyl-tRNA synthetase	6,20	3	3	3	597	68,0	6,35
Q86YW0	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase zeta-1	5,92	3	3	3	608	70,4	9,04
Q5T2S8	Armadillo repeat-containing protein 4	3,07	2	2	2	1044	115,6	7,77
Q9GZS0	Dynein intermediate chain 2, axonemal	7,27	3	3	3	605	68,8	4,74
P17987	T-complex protein 1 subunit	5,04	2	2	3	556	60,3	6,11

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
	alpha							
Q13620	Cullin-4B	4,16	3	3	3	913	103,9	7,37
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	6,04	3	3	3	613	66,9	8,95
P08237	6-phosphofructokinase, muscle type	3,72	2	3	3	780	85,1	7,99
Q5SRN2	Uncharacterized protein C6orf10	5,15	2	2	3	563	61,6	9,32
P68371	Tubulin beta-2C chain	6,74	2	2	2	445	49,8	4,89
P54136	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	5,30	2	2	2	660	75,3	6,68
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	3,57	2	2	2	645	72,9	5,07
P15104	Glutamine synthetase	7,51	2	2	2	373	42,0	6,89
P43155	Carnitine O-acetyltransferase	4,31	2	2	2	626	70,8	8,44
Q3LXA3	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	5,74	2	2	3	575	58,9	7,49
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	3,61	2	2	2	664	72,6	7,39
Q8TB22	Spermatogenesis-associated protein 20	3,44	2	2	2	786	87,8	7,43
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain	39,33	2	15	40	445	49,9	4,89
P07437	Tubulin beta chain	40,54	1	15	35	444	49,6	4,89
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	46,34	21	21	25	505	56,7	6,35
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	41,94	15	15	21	558	63,1	8,32
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	24,50	9	9	25	453	48,7	8,95
O14556	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	51,47	12	12	15	408	44,5	8,19
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain	17,12	1	7	16	444	49,7	4,89
Q16851	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	34,84	13	13	15	508	56,9	8,15
Q96RQ9	L-amino-acid oxidase	29,45	13	13	15	567	62,8	8,68
Q9BYC2	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 2, mitochondrial	24,76	9	9	13	517	56,1	7,14
Q8NDH3	Probable aminopeptidase NPEPL1	24,67	9	9	12	523	55,8	6,87
Q9BXF9	Tektin-3	30,41	12	12	13	490	56,6	7,34
A6NKZ8	Putative tubulin beta chain-like protein ENSP00000290377	11,83	1	5	12	372	41,7	4,87
P48668	Keratin, type II cytoskeletal 6C	18,44	1	10	12	564	60,0	8,00
Q14410	Glycerol kinase 2	21,88	7	10	11	553	60,6	5,77

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
Q8WW24	Tektin-4	23,45	9	9	10	435	50,6	6,44
P28838	Cytosol aminopeptidase	25,05	10	10	10	519	56,1	7,93
Q96M29	Tektin-5	18,97	8	8	9	485	56,3	7,14
P54727	UV excision repair protein RAD23 homolog B	28,61	7	8	9	409	43,1	4,84
Q9ULA0	Aspartyl aminopeptidase	28,00	8	8	9	475	52,4	7,42
P62191	26S protease regulatory subunit 4	25,23	7	8	9	440	49,2	6,21
Q16401	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	21,03	6	6	7	504	56,2	5,48
Q14409	Putative glycerol kinase 3	13,74	3	6	7	553	60,6	6,39
O00505	Importin subunit alpha-3	20,92	4	6	6	521	57,8	4,94
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	14,47	6	6	6	553	59,7	9,13
O00629	Importin subunit alpha-4	9,98	1	3	4	521	57,9	4,96
Q9NNW7	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	5,92	3	3	4	524	56,5	7,50
Q9UIF3	Tektin-2	13,72	4	4	5	430	49,6	5,55
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	12,53	3	4	4	391	45,3	4,46
P52292	Importin subunit alpha-2	7,56	2	2	3	529	57,8	5,40
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	13,36	4	4	4	539	57,9	7,83
Q9UHL4	Dipeptidyl peptidase 2	11,18	4	4	4	492	54,3	6,32
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	10,25	1	4	4	400	44,1	5,14
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	9,87	3	3	3	456	52,9	7,65
Q9Y265	RuvB-like 1	8,99	3	3	3	456	50,2	6,42
P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	7,66	3	3	3	509	54,1	7,85
Q8IV63	Serine/threonine-protein kinase VRK3	6,96	3	3	3	474	52,8	9,04
Q12894	Interferon-related developmental regulator 2	7,24	2	2	2	442	48,0	6,84
Q2M2I5	Keratin, type I cytoskeletal 24	5,52	1	3	3	525	55,1	4,96
O00519	Fatty-acid amide hydrolase 1	5,70	2	2	2	579	63,0	7,66
P10323	Acrosin	6,41	2	2	2	421	45,8	9,07
P15289	Arylsulfatase A	5,92	2	2	2	507	53,6	6,07
P54725	UV excision repair protein RAD23 homolog A	10,74	1	2	2	363	39,6	4,58
Q9BWX1	PHD finger protein 7	6,30	2	2	2	381	43,7	8,18
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	3,48	2	2	2	747	82,5	8,92
Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4	5,60	1	2	2	375	42,8	4,69
P06733	Alpha-enolase	54,38	11	14	25	434	47,1	7,39

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	38,72	14	14	20	483	53,1	7,23
P17980	26S protease regulatory subunit 6A	42,82	15	15	19	439	49,2	5,24
P43686	26S protease regulatory subunit 6B	42,82	13	13	19	418	47,3	5,21
P26641	Elongation factor 1-gamma	47,14	16	16	22	437	50,1	6,67
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	40,31	1	11	15	449	49,9	5,10
O75602	Sperm-associated antigen 6	27,50	9	9	11	509	55,4	6,83
P35998	26S protease regulatory subunit 7	32,79	12	12	14	433	48,6	5,95
Q13867	Bleomycin hydrolase	25,27	8	8	11	455	52,5	6,27
Q9UL15	BAG family molecular chaperone regulator 5 OS=Homo sapiens GN=BAG5 PE=1 SV=1 - [BAG5_HUMAN]	21,25	6	6	8	447	51,2	6,05
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	17,53	6	6	8	445	50,6	6,47
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	18,71	7	7	7	529	56,5	5,40
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	18,86	5	5	6	440	48,1	5,08
P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	23,61	6	6	6	377	40,7	4,79
Q8NBX0	Probable saccharopine dehydrogenase	22,84	6	6	6	429	47,1	9,14
Q9NWU1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial	20,92	5	5	5	459	48,8	7,66
Q9BT22	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	16,16	6	6	7	464	52,5	7,23
Q969V4	Tektin-1	10,53	4	4	5	418	48,3	6,37
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	12,50	5	5	5	456	50,8	6,55
P48637	Glutathione synthetase	9,70	4	4	5	474	52,4	5,92
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	10,61	5	5	5	462	50,1	9,01
Q8WW22	DnaJ homolog subfamily A member 4	12,59	3	4	4	397	44,8	7,59
P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	9,87	3	3	3	395	43,6	6,48
P23258	Tubulin gamma-1 chain	12,64	3	3	3	451	51,1	6,14
Q9HDC9	Adipocyte plasma membrane-associated protein	10,34	3	3	3	416	46,5	6,16
Q6ZQQ2	Protein FAM75D1	2,60	2	2	3	1576	175,5	8,85
Q9UNZ2	NSFL1 cofactor p47	10,00	3	3	3	370	40,5	5,10
P04066	Tissue alpha-L-fucosidase	7,30	2	2	3	466	53,7	6,84

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q9H8M7	Protein FAM188A	11,24	3	3	3	445	49,7	4,77
O94973	AP-2 complex subunit alpha-2	4,79	2	2	2	939	103,9	6,96
Q9Y230	RuvB-like 2	7,34	3	3	3	463	51,1	5,64
Q14156	Protein EFR3 homolog A	3,90	2	2	2	821	92,9	6,70
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	12,20	2	2	2	246	27,4	6,76
P08910	Abhydrolase domain-containing protein 2	5,41	2	2	2	425	48,3	6,70
P50336	Protoporphyrinogen oxidase	9,01	2	2	2	477	50,7	8,16
Q8TDZ2	NEDD9-interacting protein with calponin homology and LIM domains	3,56	2	2	2	1067	117,8	6,40
A4D256	Dual specificity protein phosphatase CDC14C	4,15	2	2	2	554	63,3	8,57
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	5,21	2	2	2	422	47,4	6,48
P62195	26S protease regulatory subunit 8	32,51	8	9	15	406	45,6	7,55
Q15008	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	39,59	13	13	16	389	45,5	5,62
P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	32,54	11	11	13	421	46,6	8,37
P07205	Phosphoglycerate kinase 2	29,74	9	9	11	417	44,8	8,54
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	17,65	6	6	6	510	54,6	8,76
O75390	Citrate synthase, mitochondrial	17,17	5	5	5	466	51,7	8,32
P60709	Actin, cytoplasmic 1	14,67	3	4	5	375	41,7	5,48
Q8WYR4	Radial spoke head 1 homolog	17,15	4	4	4	309	35,1	4,63
P49841	Glycogen synthase kinase-3 beta	17,86	3	3	3	420	46,7	8,78
Q9NRG9	Aladin	10,07	4	4	4	546	59,5	7,50
Q15435	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	10,56	3	3	3	360	41,5	4,91
Q9Y4P3	Transducin beta-like protein 2	6,71	3	3	3	447	49,8	9,44
P23526	Adenosylhomocysteinase	8,33	3	3	3	432	47,7	6,34
P68366	Tubulin alpha-4A chain	7,59	1	2	2	448	49,9	5,06
Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	7,57	1	2	2	449	50,1	5,06
P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	7,30	2	2	2	397	41,9	8,09
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	5,80	2	2	2	414	46,6	7,01
Q15323	Keratin, type I cuticular Ha1	5,29	1	2	2	416	47,2	4,88
Q9P2R7	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	4,10	2	2	2	463	50,3	7,42
P12694	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	5,62	2	2	2	445	50,4	8,27

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	42,14	11	11	29	318	35,9	7,11
P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	40,12	9	9	13	324	37,0	6,77
Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9	40,77	11	11	15	260	29,9	5,73
P68400	Casein kinase II subunit alpha	35,04	10	11	16	391	45,1	7,74
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	36,98	9	9	13	338	35,5	8,68
P07864	L-lactate dehydrogenase C chain	37,05	8	9	12	332	36,3	7,46
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	41,19	8	8	12	335	36,0	8,46
Q9BS86	Zona pellucida-binding protein 1	32,48	9	9	12	351	40,1	9,28
P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	22,91	2	6	10	323	37,0	6,54
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	19,57	1	5	10	327	37,2	6,19
Q5T9G4	Uncharacterized protein C6orf81	27,94	6	6	9	340	38,6	7,88
Q9Y6C9	Mitochondrial carrier homolog 2	33,66	9	9	11	303	33,3	7,97
Q9BYZ2	L-lactate dehydrogenase A-like 6B	27,82	7	8	9	381	41,9	8,65
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	28,01	6	8	9	332	36,7	8,27
Q9Y2B4	TP53-target gene 5 protein	21,03	7	7	9	290	34,0	10,55
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	29,25	6	6	7	294	31,5	7,56
P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	23,95	6	6	7	334	36,4	7,36
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5	11,69	4	7	8	590	62,3	7,74
Q92890	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	21,17	5	5	7	307	34,5	6,70
O00487	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	30,65	4	4	4	310	34,6	6,52
Q04727	Transducin-like enhancer protein 4	9,44	6	6	6	773	83,7	7,50
P37837	Transaldolase	16,02	5	5	5	337	37,5	6,81
Q8TC36	SUN domain-containing protein 5	12,40	4	4	5	379	43,1	8,31
Q9NZC3	Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	15,71	3	3	4	331	37,7	6,71
Q01105	Protein SET	16,55	4	4	4	290	33,5	4,32
Q8TC99	Fibronectin type III domain-containing protein 8	11,42	2	2	3	324	35,9	5,08
Q8TC44	POC1 centriolar protein homolog B	4,39	2	2	3	478	53,6	7,24
P61289	Proteasome activator complex subunit 3	16,14	3	3	3	254	29,5	5,95

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
P58340	Myeloid leukemia factor 1	10,82	2	2	3	268	30,6	9,45
Q7Z6W1	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 2	18,68	2	2	2	182	20,1	8,68
P35237	Serpin B6	8,78	2	2	2	376	42,6	5,27
Q86VD7	Solute carrier family 25 member 42	12,26	2	2	2	318	35,4	10,07
Q12907	Vesicular integral-membrane protein VIP36	8,99	2	2	2	356	40,2	6,95
P48556	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	6,57	2	2	2	350	39,6	9,70
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	6,65	2	2	2	376	42,9	5,81
Q9H1X1	Radial spoke head protein 9 homolog	7,61	2	2	2	276	31,3	5,43
P19784	Casein kinase II subunit alpha'	6,00	1	2	2	350	41,2	8,56
P15121	Aldose reductase	6,01	2	2	2	316	35,8	6,98
Q4G1C9	GLIPR1-like protein 2	9,30	2	2	2	344	40,2	4,91
P25786	Proteasome subunit alpha type-1	39,54	10	10	25	263	29,5	6,61
P60174	Triosephosphate isomerase	47,79	10	10	12	249	26,7	6,90
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	37,01	8	8	10	335	36,0	9,28
P25788	Proteasome subunit alpha type-3	23,14	5	5	10	255	28,4	5,33
Q9HAN9	Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 1	30,11	7	7	9	279	31,9	8,87
Q6P1Q0	LETM1 domain-containing protein 1	23,33	6	6	8	360	41,8	10,32
P25787	Proteasome subunit alpha type-2	32,05	4	4	6	234	25,9	7,43
P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	28,27	6	6	6	336	35,3	8,13
Q9NTM9	Copper homeostasis protein cutC homolog	23,08	4	4	8	273	29,3	8,18
Q8TDQ7	Glucosamine-6-phosphate isomerase 2	32,97	4	6	6	276	31,1	6,95
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	19,16	5	5	6	261	29,5	7,72
P08574	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	18,46	4	4	5	325	35,4	9,00
Q96KX2	F-actin-capping protein subunit alpha-3	14,38	3	3	4	299	35,0	7,69
O95456	Proteasome assembly chaperone 1	18,40	4	4	5	288	32,8	7,17
Q86X76	Nitrilase homolog 1	11,62	3	3	4	327	35,9	7,74
Q8WXQ8	Carboxypeptidase A5	11,70	3	3	4	436	49,0	6,73
Q6P2H8	Transmembrane protein 53	18,41	4	4	4	277	31,6	8,53

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P04279	Semenogelin-1	10,61	4	4	4	462	52,1	9,29
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	15,90	3	4	5	283	30,8	8,54
Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	12,01	2	3	4	283	30,6	8,66
Q9HC21	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	13,44	4	4	4	320	35,5	9,55
Q9H4B7	Tubulin beta-1 chain	6,87	1	2	3	451	50,3	5,17
P62258	14-3-3 protein epsilon	17,25	4	4	4	255	29,2	4,74
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	17,01	3	3	3	241	26,4	4,79
P24534	Elongation factor 1-beta	12,44	2	2	2	225	24,7	4,67
Q8NCR6	Uncharacterized protein C9orf24	13,36	3	3	3	262	30,1	8,40
P46926	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	11,42	1	3	3	289	32,6	6,92
Q00059	Transcription factor A, mitochondrial	12,60	3	3	3	246	29,1	9,72
P54107	Cysteine-rich secretory protein 1	12,85	2	2	2	249	28,5	5,91
Q969U7	Proteasome assembly chaperone 2	11,74	3	3	3	264	29,4	6,98
O00764	Pyridoxal kinase	11,22	2	2	2	312	35,1	6,13
P62333	26S protease regulatory subunit 10B	7,46	2	2	2	389	44,1	7,49
Q8NHS0	DnaJ homolog subfamily B member 8	9,91	2	2	2	232	25,7	6,42
Q6IAN0	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B	9,54	2	2	2	325	35,1	9,55
Q6ZU69	Transmembrane protein C9orf144B	2,02	2	2	2	1335	148,0	8,29
P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	9,91	2	2	2	333	35,1	8,38
Q8IZ81	ELMO domain-containing protein 2	6,48	2	2	2	293	34,9	8,05
Q13162	Peroxiredoxin-4	8,86	2	2	2	271	30,5	6,29
Q53GQ0	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	6,09	2	2	2	312	34,3	9,32
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	7,72	2	2	2	298	33,0	9,22
P48729	Casein kinase I isoform alpha	6,53	2	2	2	337	38,9	9,57
Q8TC71	Spermatogenesis-associated protein 18	3,16	2	2	2	538	61,1	8,63
Q6BCY4	NADH-cytochrome b5 reductase 2	44,20	10	10	15	276	31,4	8,50
Q8NEB7	Acrosin-binding protein	10,50	3	3	5	543	61,3	5,16
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	25,48	6	6	7	314	34,0	9,91

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P18124	60S ribosomal protein L7	21,77	4	4	4	248	29,2	10,65
Q9BXA6	Testis-specific serine/threonine-protein kinase 6	15,38	4	4	4	273	30,3	9,11
P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	17,68	3	3	3	311	34,0	9,89
Q16854	Deoxyguanosine kinase, mitochondrial	16,61	3	3	3	277	32,0	8,66
P02743	Serum amyloid P-component	14,80	3	3	3	223	25,4	6,54
Q00535	Cell division protein kinase 5	10,27	2	3	3	292	33,3	7,66
Q9H0R4	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	11,20	2	2	2	259	28,5	6,24
O14818	Proteasome subunit alpha type-7	49,60	6	10	20	248	27,9	8,46
Q99436	Proteasome subunit beta type-7	37,55	6	6	13	277	29,9	7,68
P15259	Phosphoglycerate mutase 2	43,48	4	7	10	253	28,7	8,88
Q96DC9	Ubiquitin thioesterase OTUB2	35,47	6	6	8	234	27,2	6,23
P18669	Phosphoglycerate mutase 1	35,83	3	6	7	254	28,8	7,18
P00918	Carbonic anhydrase 2	30,00	6	6	7	260	29,2	7,40
Q16777	Histone H2A type 2-C	49,61	2	4	4	129	14,0	10,90
Q9NUJ1	Abhydrolase domain-containing protein 10, mitochondrial	17,32	3	3	4	306	33,9	8,57
P21266	Glutathione S-transferase Mu 3	17,78	3	3	4	225	26,5	5,54
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	17,14	2	3	3	245	27,7	4,79
Q96M98	Parkin coregulated gene protein	9,80	2	2	3	296	33,3	8,21
P62241	40S ribosomal protein S8	15,87	3	3	3	208	24,2	10,32
P22492	Histone H1t	15,46	3	3	3	207	22,0	11,71
O15173	Membrane-associated progesterone receptor component 2	12,11	2	2	2	223	23,8	4,88
P67870	Casein kinase II subunit beta	10,70	2	2	2	215	24,9	5,55
P27348	14-3-3 protein theta	9,80	1	2	2	245	27,7	4,78
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	9,76	1	2	2	246	28,1	4,83
Q9H4Y5	Glutathione S-transferase omega-2	9,47	2	2	2	243	28,2	7,56
P20618	Proteasome subunit beta type-1	62,66	11	11	47	241	26,5	8,13
P49720	Proteasome subunit beta type-3	47,80	8	8	30	205	22,9	6,55
Q9UFN0	Protein NipSnap homolog 3A	36,44	6	6	8	247	28,4	9,16
O75425	Motile sperm domain-containing protein 3	20,00	3	3	5	235	25,5	9,20
P61313	60S ribosomal protein L15	21,57	4	4	5	204	24,1	11,62
POC5Y9	Histone H2A-Bbd type 1	24,35	2	2	3	115	12,7	10,67
P49721	Proteasome subunit beta type-2	26,37	4	4	4	201	22,8	7,02
P28072	Proteasome subunit beta type-6	25,10	3	3	3	239	25,3	4,92

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q15631	Translin	19,30	3	3	3	228	26,2	6,44
Q9Y6B6	GTP-binding protein SAR1b	11,11	2	2	3	198	22,4	6,11
Q96HA9	Peroxisomal membrane protein 11C	17,01	2	2	2	241	26,6	9,13
Q7Z4H3	HD domain-containing protein 2	17,16	3	3	3	204	23,4	5,49
P46781	40S ribosomal protein S9	12,89	3	3	3	194	22,6	10,65
Q9NS25	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome B/F	27,18	2	2	2	103	11,8	6,15
P22061	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	11,01	2	2	2	227	24,6	7,21
O75608	Acyl-protein thioesterase 1	10,43	2	2	2	230	24,7	6,77
P40429	60S ribosomal protein L13a	9,36	2	2	2	203	23,6	10,93
O43760	Synaptogyrin-2	8,93	2	2	2	224	24,8	4,94
Q9HAE3	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1	10,43	2	2	2	211	24,5	5,06
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma	4,04	2	2	2	545	60,5	6,49
O15120	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta	9,71	2	2	2	278	30,9	9,01
Q96SB4	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	2,90	2	2	2	655	74,3	6,16
Q99497	Protein DJ-1	40,74	5	5	7	189	19,9	6,79
P61019	Ras-related protein Rab-2A	38,21	6	6	7	212	23,5	6,54
Q06830	Peroxisredoxin-1	37,69	7	7	7	199	22,1	8,13
P57088	Transmembrane protein 33	15,79	4	4	4	247	28,0	9,70
Q07020	60S ribosomal protein L18	18,09	3	3	3	188	21,6	11,72
A6NFA0	Transmembrane protein ENSP00000340100	2,96	2	2	3	338	37,6	7,97
Q7L266	L-asparaginase	9,09	2	2	2	308	32,0	6,24
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	7,16	2	2	2	531	58,0	6,68
Q9Y3B8	Oligoribonuclease, mitochondrial	11,81	2	2	2	237	26,8	6,87
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a	11,62	2	2	2	198	22,4	6,68
P25685	DnaJ homolog subfamily B member 1	8,24	2	2	2	340	38,0	8,63
Q8N4E7	Ferritin, mitochondrial	9,92	2	2	2	242	27,5	7,27
Q9HD47	Ran guanine nucleotide release factor	32,80	4	4	7	186	20,4	4,94
P02794	Ferritin heavy chain	30,60	5	5	7	183	21,2	5,55
Q8WW32	High mobility group protein B4	25,27	5	5	6	186	22,4	10,26
Q9HAT0	Ropporin-1A	23,58	4	4	5	212	23,9	5,66
P01876	Ig alpha-1 chain C region	14,45	4	4	5	353	37,6	6,51
P04350	Tubulin beta-4 chain	11,26	1	4	4	444	49,6	4,88
Q9UI14	Prenylated Rab acceptor protein 1	15,68	2	2	3	185	20,6	7,34

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pl
P01834	Ig kappa chain C region	35,85	2	2	2	106	11,6	5,87
Q8WY22	BRI3-binding protein	14,34	2	2	2	251	27,8	9,44
P31025	Lipocalin-1	16,48	3	3	3	176	19,2	5,58
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	18,72	2	2	2	187	21,0	7,53
O43298	Zinc finger and BTB domain-containing protein 43	5,57	2	2	2	467	52,6	5,76
Q9NS26	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome A	23,71	1	2	2	97	11,0	5,10
Q8WZ59	Transmembrane protein 190	7,91	2	2	2	177	19,4	5,24
P32119	Peroxiredoxin-2	14,14	1	2	2	198	21,9	5,97
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	11,45	2	2	2	227	25,5	4,82
Q15185	Prostaglandin E synthase 3	12,50	2	2	2	160	18,7	4,54
Q9GZ28	Extracellular glycoprotein lacritin	16,67	2	2	2	138	14,2	5,50
Q68G75	LEM domain-containing protein 1	12,15	2	2	2	181	20,3	8,50
P01591	Immunoglobulin J chain	12,58	2	2	2	159	18,1	5,24
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	2,23	2	2	2	764	83,2	5,74
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	46,71	3	6	10	152	17,1	6,19
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	30,92	1	4	7	152	17,3	8,41
P61204	ADP-ribosylation factor 3	32,04	5	5	6	181	20,6	7,43
Q8IUE6	Histone H2A type 2-B	24,62	1	2	4	130	14,0	10,89
Q96HR9	Receptor expression-enhancing protein 6	21,20	4	4	5	184	20,7	8,56
P63279	SUMO-conjugating enzyme UBC9	8,23	2	2	4	158	18,0	8,66
P84243	Histone H3.3	43,38	4	4	5	136	15,3	11,27
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	20,83	4	4	4	216	23,7	9,41
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	16,88	2	2	3	154	15,9	6,13
O60814	Histone H2B type 1-K	36,51	1	3	3	126	13,9	10,32
P51571	Translocon-associated protein subunit delta	16,76	2	2	3	173	19,0	6,15
P57105	Synaptojanin-2-binding protein	15,17	2	2	3	145	15,9	6,30
O60831	PRA1 family protein 2	16,29	2	2	2	178	19,2	9,19
Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	16,20	2	2	2	142	15,5	4,34
Q14568	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2	7,00	2	2	2	343	39,3	4,65
O95678	Keratin, type II cytoskeletal 75	4,17	1	2	2	551	59,5	7,74
Q9UKR5	Probable ergosterol biosynthetic protein 28	15,71	2	2	2	140	15,9	9,83
P55145	Mesencephalic astrocyte-derived	13,97	2	2	2	179	20,2	8,41

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
	neurotrophic factor							
P67812	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	9,50	2	2	2	179	20,6	9,48
O43759	Synaptogyrin-1	10,30	1	2	2	233	25,4	4,68
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	8,85	2	2	2	226	25,0	8,47
P23527	Histone H2B type 1-O	57,14	2	7	14	126	13,9	10,32
P58876	Histone H2B type 1-D	57,14	2	7	14	126	13,9	10,32
O14880	Microsomal glutathione S-transferase 3	25,66	2	2	2	152	16,5	9,38
P35268	60S ribosomal protein L22	18,75	2	2	2	128	14,8	9,19
P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	12,66	2	2	2	158	18,0	6,74
P04908	Histone H2A type 1-B/E	57,69	1	6	81	130	14,1	11,05
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	60,81	10	10	16	148	17,2	9,60
Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	34,26	3	3	7	108	12,2	9,09
Q9NPJ3	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	37,86	4	4	5	140	15,0	9,14
P62158	Calmodulin	22,15	3	3	5	149	16,8	4,22
Q5H943	Kita-kyushu lung cancer antigen 1	30,09	3	3	3	113	12,8	10,20
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	27,73	2	2	2	119	13,3	11,56
P81605	Dermcidin	12,73	2	2	2	110	11,3	6,54
P06702	Protein S100-A9	24,56	2	2	2	114	13,2	6,13
P53680	AP-2 complex subunit sigma	10,56	2	2	2	142	17,0	6,18
Q8TAD1	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome E	32,99	1	2	2	97	11,0	5,26
Q96KX0	Lysozyme-like protein 4	15,07	2	2	2	146	16,4	8,28
P62736	Actin, aortic smooth muscle	16,45	5	5	6	377	42,0	5,39
Q9H503	Barrier-to-autointegration factor-like protein	25,56	2	2	4	90	10,3	5,76
P12883	Myosin-7	2,07	1	3	3	1935	223,0	5,80
P35030	Trypsin-3	6,58	2	2	2	304	32,5	7,49
P05109	Protein S100-A8	20,43	2	2	2	93	10,8	7,03
P31944	Caspase-14	4,55	2	2	2	242	27,7	5,58
Q86YN1	Dolichyldiphosphatase 1	14,71	2	2	2	238	27,0	9,44
Fracció insoluble de la cromatina espermàtica (20)								
A6NCJ1	Uncharacterized protein C19orf71	8,61	2	2	2	209	24,2	8,95
A6NCN2	Keratin-81-like protein	4,32	2	2	2	486	53,4	6,35

Núm. d'accés UniprotKB	Descripció de la proteïna	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
O43790	Keratin, type II cuticular Hb6	3,70	1	2	2	486	53,5	5,66
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	32,27	1	17	25	564	60,0	8,00
P07339	Cathepsin D	3,64	2	2	2	412	44,5	6,54
P0CG39	POTE ankyrin domain family member J	2,70	1	2	3	1038	117,3	5,97
P14923	Junction plakoglobin	5,64	3	3	3	745	81,7	6,14
P15924	Desmoplakin	0,70	2	2	2	2871	331,6	6,81
P16104	Histone H2A.x	47,55	1	4	4	143	15,1	10,74
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4	8,61	1	4	16	534	57,2	6,61
P26373	60S ribosomal protein L13	11,37	2	2	2	211	24,2	11,65
Q02383	Semenogelin-2	5,15	2	2	2	582	65,4	9,07
Q02413	Desmoglein-1	2,19	2	2	2	1049	113,7	5,03
Q5D862	Filaggrin-2	0,96	2	2	2	2391	247,9	8,31
Q5XKE5	Keratin, type II cytoskeletal 79	9,91	2	5	5	535	57,8	7,20
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	6,33	1	5	8	1075	121,3	6,20
Q7Z794	Keratin, type II cytoskeletal 1b	4,15	1	2	4	578	61,9	5,99
Q86YZ3	Hornerin	3,40	2	2	2	2850	282,2	10,04
Q8N1N4	Keratin, type II cytoskeletal 78	4,62	1	2	2	520	56,8	6,02
Q9UL16	Coiled-coil domain-containing protein 19, mitochondrial	5,81	3	3	3	551	65,7	8,90

Taula Suplementària 8.3.2. Llistat de proteïnes identificades per espectrometria de masses a partir de l'anàlisi de les fraccions obtingudes després del fraccionament de la cromatina amb nucleasa micrococcal.
MNS: *Micrococcal Nuclease Supernatant*. MNP: *Micrococcal Nuclease Pellet*.

Núm. d'accés UniprotKB	MNS/MNP	Descripció	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
O14556	MNP	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	51,47	13	13	26	408	44,5	8,19
O75969	MNP	A-kinase anchor protein 3	3,99	3	3	3	853	94,7	6,18
P02533	MNS	Keratin, type I cytoskeletal 14	31,14	5	12	19	472	51,5	5,16
P02538	MNS/MNP	Keratin, type II cytoskeletal 6A	35,11	2	18	41	564	60,0	8,00
P02768	MNS	Serum albumin	2,46	2	2	8	609	69,3	6,28
P04259	MNS	Keratin, type II cytoskeletal 6B	31,74	1	16	40	564	60,0	8,00
P04279	MNS/MNP	Semenogelin-1	11,90	4	4	4	462	52,1	9,29
P04745	MNP	Alpha-amylase 1	12,02	1	4	4	511	57,7	6,93
P08727	MNP	Keratin, type I cytoskeletal 19	6,75	1	2	2	400	44,1	5,14
P08779	MNS	Keratin, type I cytoskeletal 16	44,82	11	17	30	473	51,2	5,05
POC055	MNP	Histone H2A.Z	12,50	2	2	2	128	13,5	10,58
POC5Z0	MNP	Histone H2A-Bbd type 2/3	37,39	1	3	5	115	12,7	10,67
P10909	MNP	Clusterin	5,12	2	2	2	449	52,5	6,27
P12273	MNS/MNP	Prolactin-inducible protein	26,03	3	3	3	146	16,6	8,05
P13647	MNS	Keratin, type II cytoskeletal 5	35,59	12	18	34	590	62,3	7,74
P14618	MNP	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3,77	2	2	2	531	57,9	7,84
P14923	MNS	Junction plakoglobin	4,70	2	2	3	745	81,7	6,14
P15924	MNS	Desmoplakin	0,84	2	2	2	2871	331,6	6,81
P19012	MNS	Keratin, type I cytoskeletal 15	4,61	1	2	2	456	49,2	4,77
P19013	MNS	Keratin, type II cytoskeletal 4	5,43	1	3	27	534	57,2	6,61
P21266	MNP	Glutathione S-transferase Mu 3	16,44	3	3	4	225	26,5	5,54
P35527	MNS	Keratin, type I cytoskeletal 9	51,52	19	19	37	623	62,0	5,24
P35908	MNS	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	39,44	13	18	46	639	65,4	8,00
P45880	MNP	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	18,71	4	4	5	294	31,5	7,56

Núm. d'accés UniprotKB	MNS/MNP	Descripció	Protein Coverage (%)	# Pèptids únics	# Pèptids	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P54652	MNP	Heat shock-related 70 kDa protein 2	7,51	4	4	4	639	70,0	5,74
P60174	MNP	Triosephosphate isomerase	31,33	6	6	6	249	26,7	6,90
P62158	MNS/MNP	Calmodulin	29,53	4	4	5	149	16,8	4,22
P62805	MNS/MNP	Histone H4	40,78	4	4	4	103	11,4	11,36
P68371	MNP	Tubulin beta-2C chain	41,35	4	13	21	445	49,8	4,89
P81605	MNS/MNP	Dermcidin	35,45	4	4	5	110	11,3	6,54
Q02383	MNS	Semenogelin-2	11,00	1	3	3	582	65,4	9,07
Q02413	MNS	Desmoglein-1	8,68	3	3	3	1049	113,7	5,03
Q04695	MNS	Keratin, type I cytoskeletal 17	29,86	6	10	12	432	48,1	5,02
Q13748	MNP	Tubulin alpha-3C/D chain	26,89	8	8	9	450	49,9	5,10
Q5BJF6	MNP	Outer dense fiber protein 2	21,23	16	16	33	829	95,3	7,62
Q5D862	MNS	Filaggrin-2	0,96	2	2	2	2391	247,9	8,31
Q5JQC9	MNP	A-kinase anchor protein 4	16,16	13	13	14	854	94,4	6,96
Q5JX69	MNP	Uncharacterized protein C20orf107	12,28	2	2	2	171	19,5	8,84
Q6ZQR2	MNP	Uncharacterized protein C9orf171	7,19	2	2	2	320	36,5	10,26
Q75WM6	MNP	Testis-specific H1 histone	9,41	2	2	3	255	28,1	11,78
Q86YZ3	MNS/MNP	Hornerin	4,46	3	3	3	2850	282,2	10,04
Q8WW24	MNP	Tektin-4	17,24	6	6	8	435	50,6	6,44
Q96A08	MNS/MNP	Histone H2B type 1-A	44,09	2	4	62	127	14,2	10,32
Q96E40	MNP	Uncharacterized protein C9orf9	13,96	2	2	2	222	25,1	9,13
Q96M29	MNP	Tektin-5	9,90	4	4	4	485	56,3	7,14
Q96PU9	MNP	Outer dense fiber protein 3	11,02	2	2	2	254	27,7	9,89
Q96QV6	MNS	Histone H2A type 1-A	51,91	1	4	18	131	14,2	10,86
Q9BXF9	MNP	Tektin-3	13,67	5	5	6	490	56,6	7,34
Q9UL16	MNP	Coiled-coil domain-containing protein 19, mitochondrial	3,99	2	2	2	551	65,7	8,90
Q9Y277	MNP	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	12,01	2	3	3	283	30,6	8,66

Taula Suplementària 8.3.3. Llistat de termes *Gene Ontology Biological Process* (GOBP) enriquits en la fracció soluble de la cromatina espermàtica després del tractament salí amb NaCl 0.65 M, obtinguts per DAVID v6.7. P-values amb correcció de Bonferroni < 0,001.

Categoria	Terme	Núm. prot.	%	PValue	Bonferroni
GOTERM_BP_FAT	GO:0043161~proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	41	8,779	3,64E-35	6,21E-32
GOTERM_BP_FAT	GO:0010498~proteasomal protein catabolic process	41	8,779	3,64E-35	6,21E-32
GOTERM_BP_FAT	GO:0051436~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	33	7,066	3,00E-32	5,12E-29
GOTERM_BP_FAT	GO:0031145~anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	33	7,066	3,00E-32	5,12E-29
GOTERM_BP_FAT	GO:0051444~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity	33	7,066	1,06E-31	1,80E-28
GOTERM_BP_FAT	GO:0051352~negative regulation of ligase activity	33	7,066	1,06E-31	1,80E-28
GOTERM_BP_FAT	GO:0051437~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	33	7,066	1,94E-31	3,31E-28
GOTERM_BP_FAT	GO:0031397~negative regulation of protein ubiquitination	34	7,281	2,05E-31	3,50E-28
GOTERM_BP_FAT	GO:0051443~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity	33	7,066	6,32E-31	1,08E-27
GOTERM_BP_FAT	GO:0051439~regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	33	7,066	1,12E-30	1,91E-27
GOTERM_BP_FAT	GO:0051351~positive regulation of ligase activity	33	7,066	3,40E-30	5,79E-27
GOTERM_BP_FAT	GO:0051438~regulation of ubiquitin-protein ligase activity	33	7,066	4,57E-29	7,79E-26
GOTERM_BP_FAT	GO:0051340~regulation of ligase activity	33	7,066	1,95E-28	3,32E-25
GOTERM_BP_FAT	GO:0031400~negative regulation of protein modification process	38	8,137	2,59E-28	4,42E-25
GOTERM_BP_FAT	GO:0031398~positive regulation of protein ubiquitination	33	7,066	7,74E-28	1,32E-24
GOTERM_BP_FAT	GO:0006511~ubiquitin-dependent protein catabolic process	49	10,49	9,44E-27	1,61E-23
GOTERM_BP_FAT	GO:0031396~regulation of protein ubiquitination	34	7,281	2,61E-26	4,46E-23
GOTERM_BP_FAT	GO:0032269~negative regulation of cellular protein metabolic process	40	8,565	2,28E-23	3,89E-20
GOTERM_BP_FAT	GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly	51	10,92	4,71E-23	8,03E-20
GOTERM_BP_FAT	GO:0051248~negative regulation of protein metabolic process	40	8,565	1,00E-22	1,71E-19
GOTERM_BP_FAT	GO:0034621~cellular macromolecular complex subunit organization	51	10,92	8,72E-21	1,49E-17

Categoria	Terme	Núm. prot.	%	PValue	Bonferroni
GOTERM_BP_FAT	GO:0031401~positive regulation of protein modification process	34	7,281	4,39E-17	7,49E-14
GOTERM_BP_FAT	GO:0006007~glucose catabolic process	21	4,497	7,60E-17	1,89E-13
GOTERM_BP_FAT	GO:0043623~cellular protein complex assembly	31	6,638	3,11E-16	5,68E-13
GOTERM_BP_FAT	GO:0046365~monosaccharide catabolic process	22	4,711	4,46E-16	7,57E-13
GOTERM_BP_FAT	GO:0044275~cellular carbohydrate catabolic process	23	4,925	2,21E-15	3,79E-12
GOTERM_BP_FAT	GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	41	8,779	2,43E-15	4,16E-12
GOTERM_BP_FAT	GO:0019320~hexose catabolic process	21	4,497	3,71E-15	6,25E-12
GOTERM_BP_FAT	GO:0032270~positive regulation of cellular protein metabolic process	35	7,495	6,39E-15	1,10E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0006096~glycolysis	18	3,854	6,84E-15	1,17E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0046164~alcohol catabolic process	22	4,711	9,06E-15	1,55E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0031399~regulation of protein modification process	39	8,351	9,77E-15	1,67E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	35	7,495	2,29E-14	3,90E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0065003~macromolecular complex assembly	59	12,63	4,23E-14	7,21E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0016052~carbohydrate catabolic process	24	5,139	5,85E-14	9,98E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0043632~modification-dependent macromolecule catabolic process	54	11,56	6,14E-14	1,05E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0019941~modification-dependent protein catabolic process	54	11,56	6,14E-14	1,05E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0051603~proteolysis involved in cellular protein catabolic process	55	11,78	9,96E-14	1,70E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0009057~macromolecule catabolic process	64	13,7	1,08E-13	1,84E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0030163~protein catabolic process	56	11,99	1,19E-13	2,02E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0044257~cellular protein catabolic process	55	11,78	1,22E-13	2,08E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0000278~mitotic cell cycle	42	8,994	1,47E-13	2,50E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0044265~cellular macromolecule catabolic process	60	12,85	5,10E-13	8,69E-10
GOTERM_BP_FAT	GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	59	12,63	6,95E-13	1,19E-09
GOTERM_BP_FAT	GO:0043086~negative regulation of catalytic activity	35	7,495	1,09E-12	1,85E-09
GOTERM_BP_FAT	GO:0022402~cell cycle process	51	10,92	1,71E-12	2,91E-09
GOTERM_BP_FAT	GO:0006006~glucose metabolic process	26	5,567	2,10E-12	3,57E-09
GOTERM_BP_FAT	GO:0019318~hexose metabolic process	28	5,996	1,05E-11	1,79E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0044092~negative regulation of molecular function	37	7,923	1,10E-11	1,88E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0005996~monosaccharide metabolic process	30	6,424	1,14E-11	1,94E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0006508~proteolysis	72	15,42	1,52E-11	2,59E-08

8. Annexos

Categoria	Terme	Núm. prot.	%	PValue	Bonferoni
GOTERM_BP_FAT	GO:0006323~DNA packaging	22	4,711	2,00E-11	3,41E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0006334~nucleosome assembly	19	4,069	2,53E-11	4,31E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0031497~chromatin assembly	19	4,069	4,72E-11	8,05E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0006732~coenzyme metabolic process	24	5,139	9,39E-11	1,60E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0065004~protein-DNA complex assembly	19	4,069	1,04E-10	1,78E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0034728~nucleosome organization	19	4,069	1,52E-10	2,60E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0032268~regulation of cellular protein metabolic process	42	8,994	4,09E-10	6,97E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0007049~cell cycle	55	11,78	1,91E-09	3,25E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0043085~positive regulation of catalytic activity	43	9,208	1,99E-09	3,39E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0051186~cofactor metabolic process	25	5,353	2,42E-09	4,13E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0044093~positive regulation of molecular function	45	9,636	7,47E-09	1,27E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0006084~acetyl-CoA metabolic process	11	2,355	1,01E-08	1,72E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0006333~chromatin assembly or disassembly	19	4,069	2,75E-08	4,69E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0006886~intracellular protein transport	33	7,066	4,86E-08	8,29E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0070271~protein complex biogenesis	39	8,351	8,03E-08	1,37E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0006461~protein complex assembly	39	8,351	8,03E-08	1,37E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0034613~cellular protein localization	34	7,281	1,35E-07	2,31E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0070727~cellular macromolecule localization	34	7,281	1,59E-07	2,71E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0046356~acetyl-CoA catabolic process	9	1,927	1,61E-07	2,75E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0006099~tricarboxylic acid cycle	9	1,927	1,61E-07	2,75E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0006457~protein folding	21	4,497	2,21E-07	3,78E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0000059~protein import into nucleus, docking	8	1,713	2,55E-07	4,34E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0009109~coenzyme catabolic process	9	1,927	4,76E-07	8,11E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0019953~sexual reproduction	35	7,495	5,47E-07	9,33E-04

8.4. Article publicat i informació suplementària corresponents als resultats de l'objectiu 3: Castillo, Amaral, Oliva, 2014

Castillo, J., Amaral, A., and Oliva, R.

Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential

*Andrology*⁹, 2014

3, 326–338

⁹ La revista *Andrology* és el resultat de la fusió al 2012 de les revistes *International Journal of Andrology* (IF:3,6) i *Journal of Andrology* (IF: 3,1). Encara no disposa de IF propi.

Taula Suplementària 8.4. Llistat de proteïnes nuclears espermàtiques identificades fins l'actualitat mitjançant estudis de proteòmica basats en espectrometria de masses. Les proteïnes es troben organitzades per famílies.

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Histones i modificadors d'histones		
Q4LE39	AT-rich interactive domain-containing protein 4B (ARID domain-containing protein 4B) (180 kDa Sin3-associated polypeptide) (Sin3-associated polypeptide p180) (Breast cancer-associated antigen BRCAA1) (Histone deacetylase complex subunit SAP180) (Retinoblastoma-binding protein 1-like 1)	ARID4B BRCAA1 RBBP1L1 RBP1L1 SAP180
O60502	Bifunctional protein NCOAT (Meningioma-expressed antigen 5) (Nuclear cytoplasmic O-GlcNAcase and acetyltransferase) [Includes: Protein O-GlcNAcase (EC 3.2.1.169) (Glycoside hydrolase O-GlcNAcase) (Hexosaminidase C) (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) (N-acetyl-beta-glucosaminidase) (O-GlcNAcase) (OGA); Histone acetyltransferase (HAT) (EC 2.3.1.48)]	MGEA5 HEXC KIAA0679 MEA5
O75367	Core histone macro-H2A.1 (Histone macroH2A1) (mH2A1) (Histone H2A.y) (H2A/y) (Medulloblastoma antigen MU-MB-50.205)	H2AFY MACROH2A1
Q92794	Histone acetyltransferase KAT6A (EC 2.3.1.48) (MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and TIP60 protein 3) (MYST-3) (Monocytic leukemia zinc finger protein) (Runt-related transcription factor-binding protein 2) (Zinc finger protein 220)	KAT6A MOZ MYST3 RUNXBP2 ZNF220
Q13547	Histone deacetylase 1 (HD1) (EC 3.5.1.98)	HDAC1 RPD3L1
Q96DB2	Histone deacetylase 11 (HD11) (EC 3.5.1.98)	HDAC11
Q92769	Histone deacetylase 2 (HD2) (EC 3.5.1.98)	HDAC2
Q9UBN7	Histone deacetylase 6 (HD6) (EC 3.5.1.98)	HDAC6 KIAA0901 JM21
P16403	Histone H1.2 (Histone H1c) (Histone H1d) (Histone H1s-1)	HIST1H1C H1F2
P16402	Histone H1.3 (Histone H1c) (Histone H1s-2)	HIST1H1D H1F3
P10412	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	HIST1H1E H1F4
P16401	Histone H1.5 (Histone H1a) (Histone H1b) (Histone H1s-3)	HIST1H1B H1F5
P22492	Histone H1t (Testicular H1 histone)	HIST1H1T H1FT H1T
Q92522	Histone H1x	H1FX
P0C0S8	Histone H2A type 1 (H2A.1) (Histone H2A/p)	HIST1H2AG H2AFP; HIST1H2AI H2AFC; HIST1H2AK H2AFD; HIST1H2AL H2AFI; HIST1H2AM H2AFN
Q96QV6	Histone H2A type 1-A (Histone H2A/r)	HIST1H2AA H2AFR
P04908	Histone H2A type 1-B/E (Histone H2A.2) (Histone H2A/a) (Histone H2A/m)	HIST1H2AB H2AFM; HIST1H2AE H2AFA
Q93077	Histone H2A type 1-C (Histone H2A/l)	HIST1H2AC H2AFL
P20671	Histone H2A type 1-D (Histone H2A.3) (Histone H2A/g)	HIST1H2AD H2AFG
Q96KK5	Histone H2A type 1-H (Histone H2A/s)	HIST1H2AH HIST1H2AI HIST2H2AA3 H2AFO
Q6FI13	Histone H2A type 2-A (Histone H2A.2) (Histone H2A/o)	HIST2H2AA; HIST2H2AA4
Q8IUE6	Histone H2A type 2-B	HIST2H2AB
Q16777	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A/q)	HIST2H2AC H2AFQ

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q71UI9	Histone H2A.V (H2A.F/Z)	H2AFV H2AV
P0C0S5	Histone H2A.Z (H2A/z)	H2AFZ H2AZ
P0C5Y9	Histone H2A-Bbd type 1 (H2A Barr body-deficient) (H2A.Bbd)	H2AFB1
P0C5Z0	Histone H2A-Bbd type 2/3 (H2A Barr body-deficient) (H2A.Bbd)	H2AFB2; H2AFB3 H2ABBD H2AFB
P16104	Histone H2AX (H2a/x) (Histone H2A.X)	H2AFX H2AX
Q96A08	Histone H2B type 1-A (Histone H2B, testis) (Testis-specific histone H2B)	HIST1H2BA TSH2B
P33778	Histone H2B type 1-B (Histone H2B.1) (Histone H2B.f) (H2B/f)	HIST1H2BB H2BFF
P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I (Histone H2B.1 A) (Histone H2B.a) (H2B/a) (Histone H2B.g) (H2B/g) (Histone H2B.h) (H2B/h) (Histone H2B.k) (H2B/k) (Histone H2B.l) (H2B/l)	HIST1H2BC H2BFL; HIST1H2BE H2BFH; HIST1H2BF H2BFG; HIST1H2BG H2BFA; HIST1H2BI H2BFK
P58876	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B.1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	HIST1H2BD H2BFB HIRIP2
Q93079	Histone H2B type 1-H (Histone H2B.j) (H2B/j)	HIST1H2BH H2BFJ
P06899	Histone H2B type 1-J (Histone H2B.1) (Histone H2B.r) (H2B/r)	HIST1H2BJ H2BFR
O60814	Histone H2B type 1-K (H2B K) (HIRA-interacting protein 1)	HIST1H2BK H2BFT HIRIP1
Q99880	Histone H2B type 1-L (Histone H2B.c) (H2B/c)	HIST1H2BL H2BFC
Q99879	Histone H2B type 1-M (Histone H2B.e) (H2B/e)	HIST1H2BM H2BFE
Q99877	Histone H2B type 1-N (Histone H2B.d) (H2B/d)	HIST1H2BN H2BFD
P23527	Histone H2B type 1-O (Histone H2B.2) (Histone H2B.n) (H2B/n)	HIST1H2BO H2BFH H2BFN
Q16778	Histone H2B type 2-E (Histone H2B-GL105) (Histone H2B.q) (H2B/q)	HIST2H2BE H2BFQ
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	HIST2H2BF
Q8N257	Histone H2B type 3-B (H2B type 12)	HIST3H2BB
P57053	Histone H2B type F-S (Histone H2B.s) (H2B/s)	H2BFS
P68431	Histone H3.1 (Histone H3/a) (Histone H3/b) (Histone H3/c) (Histone H3/d) (Histone H3/f) (Histone H3/h) (Histone H3/i) (Histone H3/j) (Histone H3/k) (Histone H3/l)	HIST1H3A H3FA; HIST1H3B H3FL; HIST1H3C H3FC; HIST1H3D H3FB; HIST1H3E H3FD; HIST1H3F H3FI; HIST1H3G H3FH; HIST1H3H H3FK; HIST1H3I H3FF; HIST1H3J H3FJ
Q16695	Histone H3.1t (H3/t) (H3t) (H3/g)	HIST3H3 H3FT
Q71DI3	Histone H3.2 (Histone H3/m) (Histone H3/o)	HIST2H3A; HIST2H3C H3F2 H3FM; HIST2H3D
P84243	Histone H3.3	H3F3A H3.3A H3F3 PP781; H3F3B H3.3B
Q6NXT2	Histone H3.3C (Histone H3.5)	H3F3C
P49450	Histone H3-like centromeric protein A (Centromere autoantigen A) (Centromere protein A) (CENP-A)	CENPA

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
P62805	Histone H4	HIST1H4A H4/A H4FA; HIST1H4B H4/I H4FI; HIST1H4C H4/G H4FG; HIST1H4D H4/B H4FB; HIST1H4E H4/J H4FJ; HIST1H4F H4/C H4FC; HIST1H4H H4/H H4FH; HIST1H4I H4/M H4FM; HIST1H4J H4/E H4FE; HIST1H4K H4/D H4FD; HIST1H4L H4/K H4FK; HIST2H4A H4/N H4F2 H4FN HIST2H4; HIST2H4B H4/O H4FO; HIST4H4
Q99525	Histone H4-like protein type G	HIST1H4G H4/L H4FL
Q86X55	Histone-arginine methyltransferase CARM1 (EC 2.1.1.-) (EC 2.1.1.125) (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1) (Protein arginine N-methyltransferase 4)	CARM1 PRMT4
Q16576	Histone-binding protein RBBP7 (Histone acetyltransferase type B subunit 2) (Nucleosome-remodeling factor subunit RBAP46) (Retinoblastoma-binding protein 7) (RBBP-7) (Retinoblastoma-binding protein p46)	RBBP7 RBAP46
Q8NEZ4	Histone-lysine N-methyltransferase 2C (Lysine N-methyltransferase 2C) (EC 2.1.1.43) (Homologous to ALR protein) (Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3)	KMT2C HALR KIAA1506 MLL3
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L (EC 2.1.1.43) (ASH1-like protein) (huASH1) (Absent small and homeotic disks protein 1 homolog) (Lysine N-methyltransferase 2H)	ASH1L KIAA1420 KMT2H
Q86TU7	Histone-lysine N-methyltransferase setd3 (EC 2.1.1.43) (SET domain-containing protein 3)	SETD3 C14orf154
Q9H7B4	Histone-lysine N-methyltransferase SMYD3 (EC 2.1.1.43) (SET and MYND domain-containing protein 3) (Zinc finger MYND domain-containing protein 1)	SMYD3 ZMYND1 ZNFN3A1
Q96L73	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific (EC 2.1.1.43) (Androgen receptor coactivator 267 kDa protein) (Androgen receptor-associated protein of 267 kDa) (H3-K36-HMTase) (H4-K20-HMTase) (Lysine N-methyltransferase 3B) (Nuclear receptor-binding SET domain-containing protein 1) (NR-binding SET domain-containing protein)	NSD1 ARA267 KMT3B
Q8TEK3	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific (EC 2.1.1.43) (DOT1-like protein) (Histone H3-K79 methyltransferase) (H3-K79-HMTase) (Lysine N-methyltransferase 4)	DOT1L KIAA1814 KMT4
Q9Y4C1	Lysine-specific demethylase 3A (EC 1.14.11.-) (JmjC domain-containing histone demethylation protein 2A) (Jumonji domain-containing protein 1A)	KDM3A JHDM2A JMJD1 JMJD1A KIAA0742 TSGA
Q7LBC6	Lysine-specific demethylase 3B (EC 1.14.11.-) (JmjC domain-containing histone demethylation protein 2B) (Jumonji domain-containing protein 1B) (Nuclear protein 5qNCA)	KDM3B C5orf7 JHDM2B JMJD1B KIAA1082

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9NV56	MRG/MORF4L-binding protein (MRG-binding protein)	MRGBP C20orf20
Q15652	Probable JmjC domain-containing histone demethylation protein 2C (EC 1.14.11.-) (Jumonji domain-containing protein 1C) (Thyroid receptor-interacting protein 8) (TR-interacting protein 8) (TRIP-8)	JMJD1C JHDM2C KIAA1380 TRIP8
P04554	Protamine-2 (Sperm histone P2) (Sperm protamine P2) [Cleaved into: Basic nuclear protein HPI1; Basic nuclear protein HPI2; Basic nuclear protein HPS1; Basic nuclear protein HPS2; Sperm histone HP4 (Sperm protamine P4); Sperm histone HP2 (Sperm protamine P2) (P2'); Sperm histone HP3 (P2'') (Sperm protamine P3)]	PRM2
Q99873	Protein arginine N-methyltransferase 1 (EC 2.1.1.-) (Histone-arginine N-methyltransferase PRMT1) (EC 2.1.1.125) (Interferon receptor 1-bound protein 4)	PRMT1 HMT2 HRMT1L2 IR1B4
O14744	Protein arginine N-methyltransferase 5 (EC 2.1.1.-) (72 kDa IκB-binding protein) (Histone-arginine N-methyltransferase PRMT5) (EC 2.1.1.125) (Jak-binding protein 1) (Shk1 kinase-binding protein 1 homolog) (SKB1 homolog) (SKB1Hs) [Cleaved into: Protein arginine N-methyltransferase 5, N-terminally processed]	PRMT5 HRMT1L5 IBP72 JBP1 SKB1
Q75WM6	Testis-specific H1 histone (Haploid germ cell-specific nuclear protein 1) (Histone H1t2)	H1FNT HANP1
Factors de transcripció		
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 (Positive cofactor 4) (PC4) (SUB1 homolog) (p14)	SUB1 PC4 RPO2TC1
A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1 (CCR4-associated factor 1) (Negative regulator of transcription subunit 1 homolog) (NOT1H) (hNOT1)	CNOT1 CDC39 KIAA1007 NOT1 AD-005
Q9H9A5	CCR4-NOT transcription complex subunit 10	CNOT10
Q9UKZ1	CCR4-NOT transcription complex subunit 11	CNOT11 C2orf29 C40
Q9UIV1	CCR4-NOT transcription complex subunit 7 (EC 3.1.13.4) (BTG1-binding factor 1) (CCR4-associated factor 1) (CAF-1) (Caf1a)	CNOT7 CAF1
Q92600	Cell differentiation protein RCD1 homolog (Rcd-1) (CCR4-NOT transcription complex subunit 9)	RQCD1 CNOT9 RCD1
Q96GN5	Cell division cycle-associated 7-like protein (Protein JPO2) (Transcription factor RAM2)	CDCA7L HR1 JPO2 R1
Q9Y2D1	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-5 (cAMP-dependent transcription factor ATF-5) (Activating transcription factor 5) (Transcription factor ATFx)	ATF5 ATFX
O75398	Deformed epidermal autoregulatory factor 1 homolog (Nuclear DEAF-1-related transcriptional regulator) (NUDR) (Suppressin) (Zinc finger MYND domain-containing protein 5)	DEAF1 SPN ZMYND5
Q9UBX2	Double homeobox protein 4 (Double homeobox protein 10) (Double homeobox protein 4/10)	DUX4 DUX10
Q9Y5B9	FACT complex subunit SPT16 (Chromatin-specific transcription elongation factor 140 kDa subunit) (FACT 140 kDa subunit) (FACTp140) (Facilitates chromatin transcription complex subunit SPT16) (hSPT16)	SUPT16H FACT140 FACTP140
Q08945	FACT complex subunit SSRP1 (Chromatin-specific transcription elongation factor 80 kDa subunit) (Facilitates chromatin transcription complex 80 kDa subunit) (FACT 80 kDa subunit) (FACTp80) (Facilitates chromatin transcription complex subunit SSRP1)	SSRP1 FACT80

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
	(Recombination signal sequence recognition protein 1) (Structure-specific recognition protein 1) (hSSRP1) (T160)	
P16383	GC-rich sequence DNA-binding factor 2 (GC-rich sequence DNA-binding factor) (Transcription factor 9) (TCF-9)	GCFC2 C2orf3 GCF TCF9
Q12789	General transcription factor 3C polypeptide 1 (TF3C-alpha) (TFIIIC box B-binding subunit) (Transcription factor IIIC 220 kDa subunit) (TFIIIC 220 kDa subunit) (TFIIIC220) (Transcription factor IIIC subunit alpha)	GTF3C1
Q9Y5Q8	General transcription factor 3C polypeptide 5 (TF3C-epsilon) (Transcription factor IIIC 63 kDa subunit) (TFIIIC 63 kDa subunit) (TFIIIC63) (Transcription factor IIIC subunit epsilon)	GTF3C5 CDABP0017
P32780	General transcription factor IIH subunit 1 (Basic transcription factor 2 62 kDa subunit) (BTF2 p62) (General transcription factor IIH polypeptide 1) (TFIIH basal transcription factor complex p62 subunit)	GTF2H1 BTF2
Q92759	General transcription factor IIH subunit 4 (Basic transcription factor 2 52 kDa subunit) (BTF2 p52) (General transcription factor IIH polypeptide 4) (TFIIH basal transcription factor complex p52 subunit)	GTF2H4
P78347	General transcription factor II-I (GTFII-I) (TFII-I) (Bruton tyrosine kinase-associated protein 135) (BAP-135) (BTK-associated protein 135) (SRF-Phox1-interacting protein) (SPIN) (Williams-Beuren syndrome chromosomal region 6 protein)	GTF2I BAP135 WBSCR6
Q96L16	Heat shock transcription factor, Y-linked (Heat shock transcription factor 2-like protein) (HSF2-like)	HSFY1 HSF2L HSFY; HSFY2 HSF2L HSFY
Q14527	Helicase-like transcription factor (EC 3.6.4.-) (EC 6.3.2.-) (DNA-binding protein/plasminogen activator inhibitor 1 regulator) (HIP116) (RING finger protein 80) (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 3) (Sucrose nonfermenting protein 2-like 3)	HLTF HIP116A RNF80 SMARCA3 SNF2L3 ZBU1
O14529	Homeobox protein cut-like 2 (Homeobox protein cux-2)	CUX2 CUTL2 KIAA0293
P56915	Homeobox protein gooseoid	GSC
Q8N196	Homeobox protein SIX5 (DM locus-associated homeodomain protein) (Sine oculis homeobox homolog 5)	SIX5 DMAHP
O15111	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha (I-kappa-B kinase alpha) (IKK-A) (IKK-alpha) (IkbKA) (IkappaB kinase) (EC 2.7.11.10) (Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase) (I-kappa-B kinase 1) (IKK1) (Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase alpha) (NFKBIKA) (Transcription factor 16) (TCF-16)	CHUK IKKA TCF16
P78413	Iroquois-class homeodomain protein IRX-4 (Homeodomain protein IRXA3) (Iroquois homeobox protein 4)	IRX4 IRXA3
Q9NQ48	Leucine zipper transcription factor-like protein 1	LZTFL1
Q969G2	LIM/homeobox protein Lhx4 (LIM homeobox protein 4)	LHX4
Q93074	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 (Activator-recruited cofactor 240 kDa component) (ARC240) (CAG repeat protein 45) (Mediator complex subunit 12) (OPA-containing protein) (Thyroid hormone receptor-associated protein complex 230 kDa component) (Trap230) (Trinucleotide repeat-containing gene 11 protein)	MED12 ARC240 CAGH45 HOPA KIAA0192 TNRC11 TRAP230

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9NVC6	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17 (Activator-recruited cofactor 77 kDa component) (ARC77) (Cofactor required for Sp1 transcriptional activation subunit 6) (CRSP complex subunit 6) (Mediator complex subunit 17) (Thyroid hormone receptor-associated protein complex 80 kDa component) (Trap80) (Transcriptional coactivator CRSP77) (Vitamin D3 receptor-interacting protein complex 80 kDa component) (DRIP80)	MED17 ARC77 CRSP6 DRIP77 DRIP80 TRAP80
O75030	Microphthalmia-associated transcription factor (Class E basic helix-loop-helix protein 32) (bHLHe32)	MITF BHLHE32
Q9UBU8	Mortality factor 4-like protein 1 (MORF-related gene 15 protein) (Protein MSL3-1) (Transcription factor-like protein MRG15)	MORF4L1 MRG15 FWP006 HSPC008 HSPC061 PP368
Q96KG9	N-terminal kinase-like protein (Coated vesicle-associated kinase of 90 kDa) (SCY1-like protein 1) (Telomerase regulation-associated protein) (Telomerase transcriptional element-interacting factor) (Teratoma-associated tyrosine kinase)	SCYL1 CVAK90 GKL NTKL TAPK TEIF TRAP HT019
Q14934	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4 (NF-ATc4) (NFATc4) (T-cell transcription factor NFAT3) (NF-AT3)	NFATC4 NFAT3
Q13952	Nuclear transcription factor Y subunit gamma (CAAT box DNA-binding protein subunit C) (Nuclear transcription factor Y subunit C) (NF-YC) (Transactivator HSM-1/2)	NFYC
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (CCAAT-binding transcription factor I subunit A) (CBF-A) (DNA-binding protein B) (DBPB) (Enhancer factor I subunit A) (EFI-A) (Y-box transcription factor) (Y-box-binding protein 1) (YB-1)	YBX1 NSEP1 YB1
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B (NDK B) (NDP kinase B) (EC 2.7.4.6) (C-myc purine-binding transcription factor PUF) (Histidine protein kinase NDKB) (EC 2.7.13.3) (nm23-H2)	NME2 NM23B
Q96CV9	Optineurin (E3-14.7K-interacting protein) (FIP-2) (Huntingtin yeast partner L) (Huntingtin-interacting protein 7) (HIP-7) (Huntingtin-interacting protein L) (NEMO-related protein) (Optic neuropathy-inducing protein) (Transcription factor IIIA-interacting protein) (TFIIIA-IntP)	OPTN FIP2 GLC1E HIP7 HYPL NRP
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein (CLL-associated antigen KW-7) (Dense fine speckles 70 kDa protein) (DFS 70) (Lens epithelium-derived growth factor) (Transcriptional coactivator p75/p52)	PSIP1 DFS70 LEDGF PSIP2
Q96AQ6	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1 (Hematopoietic PBX-interacting protein)	PBXIP1 HPIP
P28370	Probable global transcription activator SNF2L1 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase SMARCA1) (Nucleosome-remodeling factor subunit SNF2L) (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 1)	SMARCA1 SNF2L SNF2L1
Q9BYG7	Protein maestro (Male-specific transcription in the developing reproductive organs) (Protein B29)	MRO B29 C18orf3
Q9UMS5	Putative homeodomain transcription factor 1	PHTF1 PHTF
Q8N1G1	RNA exonuclease 1 homolog (EC 3.1.-.-) (Elongin-A-binding protein 1) (EloA-BP1) (Transcription elongation factor B polypeptide 3-binding protein 1)	REXO1 ELOABP1 KIAA1138 TCEB3BP1

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9Y265	RuvB-like 1 (EC 3.6.4.12) (49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein) (49 kDa TBP-interacting protein) (54 kDa erythrocyte cytosolic protein) (ECP-54) (INO80 complex subunit H) (Nuclear matrix protein 238) (NMP 238) (Pontin 52) (TIP49a) (TIP60-associated protein 54-alpha) (TAP54-alpha)	RUVBL1 INO80H NMP238 TIP49 TIP49A
Q9Y230	RuvB-like 2 (EC 3.6.4.12) (48 kDa TATA box-binding protein-interacting protein) (48 kDa TBP-interacting protein) (51 kDa erythrocyte cytosolic protein) (ECP-51) (INO80 complex subunit J) (Repressing pontin 52) (Reptin 52) (TIP49b) (TIP60-associated protein 54-beta) (TAP54-beta)	RUVBL2 INO80J TIP48 TIP49B CGI-46
O95238	SAM pointed domain-containing Ets transcription factor (Prostate epithelium-specific Ets transcription factor) (Prostate-specific Ets) (Prostate-derived Ets factor)	SPDEF PDEF PSE
P42224	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta (Transcription factor ISGF-3 components p91/p84)	STAT1
P52630	Signal transducer and activator of transcription 2 (p113)	STAT2
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3 (Acute-phase response factor)	STAT3 APRF
P42229	Signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A STAT5
P51692	Signal transducer and activator of transcription 5B	STAT5B
P42226	Signal transducer and activator of transcription 6 (IL-4 Stat)	STAT6
Q92966	snRNA-activating protein complex subunit 3 (SNAPc subunit 3) (Proximal sequence element-binding transcription factor subunit beta) (PSE-binding factor subunit beta) (PTF subunit beta) (Small nuclear RNA-activating complex polypeptide 3) (snRNA-activating protein complex 50 kDa subunit) (SNAPc 50 kDa subunit)	SNAPC3 SNAP50
P63208	S-phase kinase-associated protein 1 (Cyclin-A/CDK2-associated protein p19) (Organ of Corti protein 2) (OCP-2) (Organ of Corti protein II) (OCP-II) (RNA polymerase II elongation factor-like protein) (SIII) (Transcription elongation factor B) (p19A) (p19skp1)	SKP1 EMC19 OCP2 SKP1A TCEB1L
P20226	TATA-box-binding protein (TATA sequence-binding protein) (TATA-binding factor) (TATA-box factor) (Transcription initiation factor TFIID TBP subunit)	TBP GTF2D1 TF2D TFIID
O43435	T-box transcription factor TBX1 (T-box protein 1) (Testis-specific T-box protein)	TBX1
Q99593	T-box transcription factor TBX5 (T-box protein 5)	TBX5
P51532	Transcription activator BRG1 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase SMARCA4) (BRG1-associated factor 190A) (BAF190A) (Mitotic growth and transcription activator) (Protein BRG-1) (Protein brahma homolog 1) (SNF2-beta) (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 4)	SMARCA4 BAF190A BRG1 SNF2B SNF2L4
Q15369	Transcription elongation factor B polypeptide 1 (Elongin 15 kDa subunit) (Elongin-C) (EloC) (RNA polymerase II transcription factor SIII subunit C) (SIII p15)	TCEB1
Q15370	Transcription elongation factor B polypeptide 2 (Elongin 18 kDa subunit) (Elongin-B) (EloB) (RNA polymerase II transcription factor SIII subunit B) (SIII p18)	TCEB2
O00267	Transcription elongation factor SPT5 (hSPT5) (DRB sensitivity-inducing factor 160 kDa subunit) (DSIF p160) (DRB sensitivity-inducing factor large subunit) (DSIF large subunit) (Tat-	SUPT5H SPT5 SPT5H

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
	cotransactivator 1 protein) (Tat-CT1 protein)	
Q9BQ70	Transcription factor 25 (TCF-25) (Nuclear localized protein 1)	TCF25 KIAA1049 NULP1 FKSG26
P20290	Transcription factor BTF3 (RNA polymerase B transcription factor 3)	BTF3 NACB OK/SW-cl.8
Q96K17	Transcription factor BTF3 homolog 4 (Basic transcription factor 3-like 4)	BTF3L4
Q04206	Transcription factor p65 (Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit) (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3)	RELA NFKB3
Q33E94	Transcription factor RFX4 (Regulatory factor X 4) (Testis development protein NYD-SP10)	RFX4
O94993	Transcription factor SOX-30	SOX30
Q8TDD2	Transcription factor Sp7 (Zinc finger protein osterix)	SP7 OSX
Q92750	Transcription initiation factor TFIID subunit 4B (Transcription initiation factor TFIID 105 kDa subunit) (TAF(II)105) (TAFII-105) (TAFII105)	TAF4B TAF2C2 TAFII105
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	TRIM28 KAP1 RNF96 TIF1B
O14867	Transcription regulator protein BACH1 (BTB and CNC homolog 1) (HA2303)	BACH1
Q9BYV9	Transcription regulator protein BACH2 (BTB and CNC homolog 2)	BACH2
P10242	Transcriptional activator Myb (Proto-oncogene c-Myb)	MYB
Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha)	PURA PUR1
Q9Y4A5	Transformation/transcription domain-associated protein (350/400 kDa PCAF-associated factor) (PAF350/400) (STAF40) (Tra1 homolog)	TRRAP PAF400
Q9Y6A4	UPF0468 protein C16orf80 (Transcription factor IIB)	C16orf80
Q5SQQ9	Ventral anterior homeobox 1	VAX1
P58304	Visual system homeobox 2 (Ceh-10 homeodomain-containing homolog) (Homeobox protein CHX10)	VSX2 CHX10 HOX10
Proteïnes contenidores de dominis zinc finger i bromodomains		
Q86XD8	AN1-type zinc finger protein 4 (AN1-type zinc finger and ubiquitin domain-containing protein-like 1)	ZFAND4 ANUBL1
Q9P2S6	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 1 (Testis-specific ankyrin-like protein 1) (Zinc finger MYND domain-containing protein 13)	ANKMY1 TSAL1 ZMYND13
Q9UIF9	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A (Transcription termination factor I-interacting protein 5) (TTF-I-interacting protein 5) (Tip5) (hWALp3)	BAZ2A KIAA0314 TIP5
Q9ULD4	Bromodomain and PHD finger-containing protein 3	BRPF3 KIAA1286
Q9NSI6	Bromodomain and WD repeat-containing protein 1 (WD repeat-containing protein 9)	BRWD1 C21orf107 WDR9
Q9NPI1	Bromodomain-containing protein 7 (75 kDa bromodomain protein) (Protein CELTIX-1)	BRD7 BP75 CELTIX1
O43264	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog	ZW10
O14647	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2 (CHD-2) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD2)	CHD2

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q12873	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3
Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (CHD-4) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD4) (Mi-2 autoantigen 218 kDa protein) (Mi2-beta)	CHD4
Q8TD26	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6 (CHD-6) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD6) (Radiation-induced gene B protein)	CHD6 CHD5 KIAA1335 RIGB
Q14D33	CXXC-type zinc finger protein 11	CXXC11 C2orf85
O75928	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 (EC 6.3.2.-) (Androgen receptor-interacting protein 3) (ARIP3) (DAB2-interacting protein) (DIP) (Msx-interacting zinc finger protein) (Miz1) (PIAS-NY protein) (Protein inhibitor of activated STAT x) (Protein inhibitor of activated STAT2)	PIAS2 PIASX
P62877	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1 (EC 6.3.2.-) (Protein ZYP) (RING finger protein 75) (RING-box protein 1) (Rbx1) (Regulator of cullins 1) [Cleaved into: E3 ubiquitin-protein ligase RBX1, N-terminally processed]	RBX1 RNF75 ROC1
Q8NHY2	E3 ubiquitin-protein ligase RFWD2 (EC 6.3.2.-) (Constitutive photomorphogenesis protein 1 homolog) (hCOP1) (RING finger and WD repeat domain protein 2) (RING finger protein 200)	RFWD2 COP1 RNF200
Q6AZZ1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68 (EC 6.3.2.-) (RING finger protein 137) (SSA protein SS-56) (SS-56) (Tripartite motif-containing protein 68)	TRIM68 GC109 RNF137 SS56
Q86WT6	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM69 (EC 6.3.2.-) (RFP-like domain-containing protein trimless) (RING finger protein 36) (Tripartite motif-containing protein 69)	TRIM69 RNF36 HSD-34 HSD34
P53804	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3 (EC 6.3.2.-) (Protein DCRR1) (RING finger protein 105) (TPR repeat protein D) (Tetratricopeptide repeat protein 3) (TPR repeat protein 3)	TTC3 DCRR1 RNF105 TPRD
Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 (EC 6.3.2.-) (600 kDa retinoblastoma protein-associated factor) (N-recognin-4) (Retinoblastoma-associated factor of 600 kDa) (RBAF600) (p600) (Zinc finger UBR1-type protein 1)	UBR4 KIAA0462 KIAA1307 RBAF600 ZUBR1
Q15075	Early endosome antigen 1 (Endosome-associated protein p162) (Zinc finger FYVE domain-containing protein 2)	EEA1 ZFYVE2
Q6ZV73	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6 (Zinc finger FYVE domain-containing protein 24)	FGD6 KIAA1362 ZFYVE24
P56270	Myc-associated zinc finger protein (MAZI) (Pur-1) (Purine-binding transcription factor) (Serum amyloid A-activating factor-1) (SAF-1) (Transcription factor Zif87) (ZF87) (Zinc finger protein 801)	MAZ ZNF801
Q13615	Myotubularin-related protein 3 (EC 3.1.3.48) (FYVE domain-containing dual specificity protein phosphatase 1) (FYVE-DSP1) (Zinc finger FYVE domain-containing protein 10)	MTMR3 KIAA0371 ZFYVE10
Q12830	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF (Bromodomain and PHD finger-containing transcription factor) (Fetal Alz-50 clone 1 protein) (Fetal Alzheimer antigen)	BPTF FAC1 FALZ
Q6GQQ9	OTU domain-containing protein 7B (EC 3.4.19.12) (Cellular zinc finger anti-NF-kappa-B protein) (Zinc finger A20 domain-containing protein	OTUD7B ZA20D1

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
	1) (Zinc finger protein Cezanne)	
P55201	Peregrin (Bromodomain and PHD finger-containing protein 1) (Protein Br140)	BRPF1 BR140
Q96QT6	PHD finger protein 12 (PHD factor 1) (Pf1)	PHF12 KIAA1523
Q9BWX1	PHD finger protein 7 (Testis development protein NYD-SP6)	PHF7
Q16342	Programmed cell death protein 2 (Zinc finger MYND domain-containing protein 7) (Zinc finger protein Rp-8)	PDCD2 RP8 ZMYND7
Q8IWT0	Protein archease (Protein ZBTB8OS) (Zinc finger and BTB domain-containing opposite strand protein 8)	ZBTB8OS ARCH
Q9UPA5	Protein bassoon (Zinc finger protein 231)	BSN KIAA0434 ZNF231
A1A519	Protein FAM170A (Zinc finger domain-containing protein) (Zinc finger protein ZNFD)	FAM170A ZNFD
Q9ULU4	Protein kinase C-binding protein 1 (Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen se14-3) (CTCL-associated antigen se14-3) (Rack7) (Zinc finger MYND domain-containing protein 8)	ZMYND8 KIAA1125 PRKCBP1 RACK7
O95785	Protein Wiz (Widely-interspaced zinc finger-containing protein) (Zinc finger protein 803)	WIZ ZNF803
Q9H1K0	Rabenosyn-5 (110 kDa protein) (FYVE finger-containing Rab5 effector protein rabenosyn-5) (Zinc finger FYVE domain-containing protein 20)	ZFYVE20
Q2KHN1	RING finger protein 151	RNF151
Q9BXT8	RING finger protein 17 (Tudor domain-containing protein 4)	RNF17 TDRD4
Q86XN8	RNA-binding protein MEX3D (RING finger and KH domain-containing protein 1) (RING finger protein 193) (TINO)	MEX3D KIAA2031 RKHD1 RNF193
Q96T51	RUN and FYVE domain-containing protein 1 (FYVE-finger protein EIP1) (La-binding protein 1) (Rab4-interacting protein) (Zinc finger FYVE domain-containing protein 12)	RUFY1 RABIP4 ZFYVE12
Q9BUZ4	TNF receptor-associated factor 4 (Cysteine-rich domain associated with RING and Traf domains protein 1) (Metastatic lymph node gene 62 protein) (MLN 62) (RING finger protein 83)	TRAF4 CART1 MLN62 RNF83
Q9Y4K3	TNF receptor-associated factor 6 (EC 6.3.2.-) (E3 ubiquitin-protein ligase TRAF6) (Interleukin-1 signal transducer) (RING finger protein 85)	TRAF6 RNF85
Q9BZH6	WD repeat-containing protein 11 (Bromodomain and WD repeat-containing protein 2) (WD repeat-containing protein 15)	WDR11 BRWD2 KIAA1351 WDR15
Q96DT7	Zinc finger and BTB domain-containing protein 10 (Zinc finger protein RIN ZF)	ZBTB10 RINZF RINZFC
O43298	Zinc finger and BTB domain-containing protein 43 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 22B) (Zinc finger protein 297B) (ZnF-x)	ZBTB43 KIAA0414 ZBTB22B ZNF297B
Q53FD0	Zinc finger C2HC domain-containing protein 1C	ZC2HC1C C14orf140 FAM164C
Q8WU90	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15 (DRG family-regulatory protein 1) (Likely ortholog of mouse immediate early response erythropoietin 4)	ZC3H15 DFRP1 LEREPO4 HSPC303 HT010 MSTP012 PP730
Q8IXZ2	Zinc finger CCCH domain-containing protein 3	ZC3H3 KIAA0150 ZC3HDC3
Q9UHR6	Zinc finger HIT domain-containing protein 2 (Protein FON)	ZNHIT2 C11orf5

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q96PE6	Zinc finger imprinted 3 (Zinc finger protein 657)	ZIM3 ZNF657
O95789	Zinc finger MYM-type protein 6 (Transposon-derived Buster2 transposase-like protein) (Zinc finger protein 258)	ZMYM6 Buster2 KIAA1353 ZNF258
O75800	Zinc finger MYND domain-containing protein 10 (Protein BLu)	ZMYND10 BLU LUCA12.4
Q9H0C1	Zinc finger MYND domain-containing protein 12	ZMYND12
O15231	Zinc finger protein 185 (LIM domain protein ZNF185) (P1-A)	ZNF185
P98182	Zinc finger protein 200	ZNF200 ZNFMF
Q9P2Y4	Zinc finger protein 219	ZNF219
Q96PQ6	Zinc finger protein 317	ZNF317 KIAA1588
O60765	Zinc finger protein 354A (Transcription factor 17) (TCF-17) (Zinc finger protein eZNF)	ZNF354A EZNF HKL1 TCF17
Q96PM9	Zinc finger protein 385A (Hematopoietic zinc finger protein) (Retinal zinc finger protein)	ZNF385A HZF RZF ZNF385
Q9H8N7	Zinc finger protein 395 (HD-regulating factor 2) (HDRF-2) (Huntington disease gene regulatory region-binding protein 2) (HD gene regulatory region-binding protein 2) (HDBP-2) (Papillomavirus regulatory factor 1) (PRF-1) (Papillomavirus-binding factor)	ZNF395 HDBP2 PBF
Q86VK4	Zinc finger protein 410 (Another partner for ARF 1) (Zinc finger protein APA-1)	ZNF410 APA1
Q96MM3	Zinc finger protein 42 homolog (Zfp-42) (Reduced expression protein 1) (REX-1) (hREX-1) (Zinc finger protein 754)	ZFP42 REX1 ZNF754
Q9Y4E5	Zinc finger protein 451 (Coactivator for steroid receptors)	ZNF451 COASTER KIAA0576 KIAA1702
Q96ME7	Zinc finger protein 512	ZNF512 KIAA1805
Q6AHZ1	Zinc finger protein 518A	ZNF518A KIAA0335 ZNF518
Q9C0D4	Zinc finger protein 518B	ZNF518B KIAA1729
Q86YE8	Zinc finger protein 573	ZNF573
Q92610	Zinc finger protein 592	ZNF592 KIAA0211
Q9ULD9	Zinc finger protein 608 (Renal carcinoma antigen NY-REN-36)	ZNF608 KIAA1281
O15014	Zinc finger protein 609	ZNF609 KIAA0295
Q969S3	Zinc finger protein 622 (Zinc finger-like protein 9)	ZNF622 ZPR9
Q9NTW7	Zinc finger protein 64 homolog, isoforms 3 and 4 (Zfp-64) (Zinc finger protein 338)	ZFP64 ZNF338
Q96N77	Zinc finger protein 641	ZNF641
Q9H582	Zinc finger protein 644 (Zinc finger motif enhancer-binding protein 2) (Zep-2)	ZNF644 KIAA1221 ZEP2
Q9H7X3	Zinc finger protein 696	ZNF696
Q9H7S9	Zinc finger protein 703 (Zinc finger elbow-related proline domain protein 1)	ZNF703 ZEPO1 ZPO1
Q8NDX6	Zinc finger protein 740 (OriLyt TD-element-binding protein 7)	ZNF740 TB7
Q5HY98	Zinc finger protein 766	ZNF766
Q68DY9	Zinc finger protein 772	ZNF772
Q3KP31	Zinc finger protein 791	ZNF791
P16415	Zinc finger protein 823 (Zinc finger protein ZFP-36)	ZNF823 ZFP36
Q08AG5	Zinc finger protein 844	ZNF844
P10070	Zinc finger protein GLI2 (Tax helper protein)	GLI2 THP

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
O95159	Zinc finger protein-like 1 (Zinc finger protein MCG4)	ZFPL1
Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein (hZFR) (M-phase phosphoprotein homolog)	ZFR
A7E2V4	Zinc finger SWIM domain-containing protein 8	ZSWIM8 KIAA0913
Q96AP4	Zinc finger with UFM1-specific peptidase domain protein	ZUFSP C6orf113
P98168	Zinc finger X-linked protein ZXDA	ZXDA
O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	ZZEF1 KIAA0399
Q9Y6X8	Zinc fingers and homeoboxes protein 2 (Alpha-fetoprotein regulator 1) (AFP regulator 1) (Regulator of AFP) (Zinc finger and homeodomain protein 2)	ZHX2 AFR1 KIAA0854 RAF
Proteïnes relacionades amb el DNA		
Q6P4R8	Nuclear factor related to kappa-B-binding protein (DNA-binding protein R kappa-B) (INO80 complex subunit G)	NFRKB INO80G
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (Dnmt1) (EC 2.1.1.37) (CXXC-type zinc finger protein 9) (DNA methyltransferase Hsal) (DNA MTase Hsal) (M.Hsal) (MCMT)	DNMT1 AIM, CXXC9, DNMT
O94762	ATP-dependent DNA helicase Q5 (EC 3.6.4.12) (DNA helicase, RecQ-like type 5) (RecQ5) (RecQ protein-like 5)	RECQL5 RECQ5
P54132	Bloom syndrome protein (EC 3.6.4.12) (DNA helicase, RecQ-like type 2) (RecQ2) (RecQ protein-like 3)	BLM RECQ2 RECQL3
Q13609	Deoxyribonuclease gamma (DNase gamma) (EC 3.1.21.-) (DNase I homolog protein DHP2) (Deoxyribonuclease I-like 3) (DNase I-like 3) (Liver and spleen DNase) (LS-DNase) (LSD)	DNASE1L3 DHP2 DNASE1L3
Q92874	Deoxyribonuclease-1-like 2 (EC 3.1.21.-) (DNase I homolog protein DHP1) (Deoxyribonuclease I-like 2) (DNase I-like 2)	DNASE1L2 DHP1 DNASE1L2
Q16531	DNA damage-binding protein 1 (DDB p127 subunit) (DNA damage-binding protein a) (DDBa) (Damage-specific DNA-binding protein 1) (HBV X-associated protein 1) (XAP-1) (UV-damaged DNA-binding factor) (UV-damaged DNA-binding protein 1) (UV-DDB 1) (XPE-binding factor) (XPE-BF) (Xeroderma pigmentosum group E-complementing protein) (XPCE)	DDB1 XAP1
Q9NRW3	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3C (A3C) (EC 3.5.4.-) (APOBEC1-like) (Phorbolin I)	APOBEC3C APOBEC1L PBI
P49916	DNA ligase 3 (EC 6.5.1.1) (DNA ligase III) (Polydeoxyribonucleotide synthase [ATP] 3)	LIG3
Q9NPF5	DNA methyltransferase 1-associated protein 1 (DNMAP1) (DNMT1-associated protein 1)	DMAP1 KIAA1425
P40692	DNA mismatch repair protein Mlh1 (MutL protein homolog 1)	MLH1 COCA2
P43246	DNA mismatch repair protein Msh2 (hMSH2) (MutS protein homolog 2)	MSH2
P52701	DNA mismatch repair protein Msh6 (hMSH6) (G/T mismatch-binding protein) (GTBP) (GTMBP) (MutS-alpha 160 kDa subunit) (p160)	MSH6 GTBP
P06746	DNA polymerase beta (EC 2.7.7.7) (EC 4.2.99.-)	POLB
P49005	DNA polymerase delta subunit 2 (EC 2.7.7.7) (DNA polymerase delta subunit p50)	POLD2
Q07864	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A (EC 2.7.7.7) (DNA polymerase II subunit A)	POLE POLE1
Q9UNA4	DNA polymerase iota (EC 2.7.7.7) (Eta2) (RAD30 homolog B)	POLI RAD30B

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9UGP5	DNA polymerase lambda (Pol Lambda) (EC 2.7.7.7) (EC 4.2.99.-) (DNA polymerase beta-2) (Pol beta2) (DNA polymerase kappa)	POLL
Q92878	DNA repair protein RAD50 (hRAD50) (EC 3.6.-.-)	RAD50
P49736	DNA replication licensing factor MCM2 (EC 3.6.4.12) (Minichromosome maintenance protein 2 homolog) (Nuclear protein BM28)	MCM2 BM28 CCNL1 CDCL1 KIAA0030
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6 (EC 3.6.4.12) (p105MCM)	MCM6
P33993	DNA replication licensing factor MCM7 (EC 3.6.4.12) (CDC47 homolog) (P1.1-MCM3)	MCM7 CDC47 MCM2
P11387	DNA topoisomerase 1 (EC 5.99.1.2) (DNA topoisomerase I)	TOP1
P11388	DNA topoisomerase 2-alpha (EC 5.99.1.3) (DNA topoisomerase II, alpha isozyme)	TOP2A TOP2
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta (EC 5.99.1.3) (DNA topoisomerase II, beta isozyme)	TOP2B
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (EC 3.1.-.-) (EC 4.2.99.18) (APEX nuclease) (APEN) (Apurinic-apyrimidinic endonuclease 1) (AP endonuclease 1) (APE-1) (REF-1) (Redox factor-1) [Cleaved into: DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, mitochondrial]	APEX1 APE APE1 APEX APX HAP1 REF1
Q9UBZ4	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase 2 (EC 3.1.-.-) (EC 4.2.99.18) (AP endonuclease XTH2) (APEX nuclease 2) (APEX nuclease-like 2) (Apurinic-apyrimidinic endonuclease 2) (AP endonuclease 2)	APEX2 APE2 APEXL2 XTH2
P38935	DNA-binding protein SMUBP-2 (EC 3.6.4.12) (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent helicase IGHMBP2) (Glial factor 1) (GF-1) (Immunoglobulin mu-binding protein 2)	IGHMBP2 SMBP2 SMUBP2
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1) (DNP1) (p460)	PRKDC HYRC HYRC1
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1 (RNA polymerase II subunit B1) (EC 2.7.7.6) (DNA-directed RNA polymerase II subunit A) (DNA-directed RNA polymerase III largest subunit) (RNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1) (EC 2.7.7.48)	POLR2A POLR2
Q9H1A7	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11-b2 (RNA polymerase II subunit B11-b2) (RPB11b2) (DNA-directed RNA polymerase II subunit J3)	POLR2J3
P30876	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2 (EC 2.7.7.6) (DNA-directed RNA polymerase II 140 kDa polypeptide) (DNA-directed RNA polymerase II subunit B) (RNA polymerase II subunit 2) (RNA polymerase II subunit B2)	POLR2B
Q9NVU0	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5 (RNA polymerase III subunit C5) (DNA-directed RNA polymerase III 80 kDa polypeptide)	POLR3E KIAA1452
P52434	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3 (RNA polymerases I, II, and III subunit ABC3) (DNA-directed RNA polymerase II subunit H) (DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 17.1 kDa polypeptide) (RPB17) (RPB8 homolog) (hRPB8)	POLR2H
P26583	High mobility group protein B2 (High mobility group protein 2) (HMG-2)	HMGB2 HMG2
Q8WW32	High mobility group protein B4	HMGB4
P17096	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y (HMG-I(Y)) (High mobility group AT-hook protein 1) (High mobility group protein A1) (High mobility group protein R)	HMGA1 HMG1Y

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q68E01	Integrator complex subunit 3 (Int3) (SOSS complex subunit A) (Sensor of single-strand DNA complex subunit A) (SOSS-A) (Sensor of ssDNA subunit A)	INTS3 C1orf193 C1orf60
Q6N021	Methylcytosine dioxygenase TET2 (EC 1.14.11.n2)	TET2 KIAA1546
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO protein) (54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein) (55 kDa nuclear protein) (DNA-binding p52/p100 complex, 52 kDa subunit) (NMT55) (p54(nrb)) (p54nrb)	NONO NRB54
Q9NTK5	Obg-like ATPase 1 (DNA damage-regulated overexpressed in cancer 45) (DOC45) (GTP-binding protein 9)	OLA1 GTPBP9
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) (EC 2.4.2.30) (ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 1) (ARTD1) (NAD(+) ADP-ribosyltransferase 1) (ADPRT 1) (Poly[ADP-ribose] synthase 1)	PARP1 ADPRT PPOL
Q9Y2S7	Polymerase delta-interacting protein 2 (38 kDa DNA polymerase delta interaction protein) (p38)	POLDIP2 PDIP38 POLD4
Q01105	Protein SET (HLA-DR-associated protein II) (Inhibitor of granzyme A-activated DNase) (IGAAD) (PHAPII) (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (Template-activating factor I) (TAF-I)	SET
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP-1) (EC 3.6.4.12) (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent DNA helicase VIII) (hDH VIII) (GAP SH3 domain-binding protein 1)	G3BP1 G3BP
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit (RP-A p14) (Replication factor A protein 3) (RF-A protein 3)	RPA3 REPA3 RPA14
Q6P6C2	RNA demethylase ALKBH5 (EC 1.14.11.-) (Alkylated DNA repair protein alkB homolog 5) (Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5)	ALKBH5 ABH5 OFOX1
P13051	Uracil-DNA glycosylase (UDG) (EC 3.2.2.27)	UNG DGU UNG1 UNG15
Q14191	Werner syndrome ATP-dependent helicase (EC 3.6.4.12) (DNA helicase, RecQ-like type 3) (RecQ3) (Exonuclease WRN) (EC 3.1.-.-) (RecQ protein-like 2)	WRN RECQ3 RECQL2
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 (EC 3.6.4.-) (86 kDa subunit of Ku antigen) (ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2) (ATP-dependent DNA helicase II 80 kDa subunit) (CTC box-binding factor 85 kDa subunit) (CTC85) (CTCBF) (DNA repair protein XRCC5) (Ku80) (Ku86) (Lupus Ku autoantigen protein p86) (Nuclear factor IV) (Thyroid-lupus autoantigen) (TLAA) (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining))	XRCC5 G22P2
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 (EC 3.6.4.-) (EC 4.2.99.-) (5'-deoxyribose-5-phosphate lyase Ku70) (5'-dRP lyase Ku70) (70 kDa subunit of Ku antigen) (ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1) (ATP-dependent DNA helicase II 70 kDa subunit) (CTC box-binding factor 75 kDa subunit) (CTC75) (CTCBF) (DNA repair protein XRCC6) (Lupus Ku autoantigen protein p70) (Ku70) (Thyroid-lupus autoantigen) (TLAA) (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6)	XRCC6 G22P1
Proteïnes implicades en meiosis i cicle cel·lular		
Q96BM9	ADP-ribosylation factor-like protein 8A (ADP-ribosylation factor-like protein 10B) (Novel small G protein indispensable for equal chromosome segregation 2)	ARL8A ARL10B GIE2

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9NVJ2	ADP-ribosylation factor-like protein 8B (ADP-ribosylation factor-like protein 10C) (Novel small G protein indispensable for equal chromosome segregation 1)	ARL8B ARL10C GIE1
Q99459	Cell division cycle 5-like protein (Cdc5-like protein) (Pombe cdc5-related protein)	CDC5L KIAA0432 PCDC5RP
P49454	Centromere protein F (CENP-F) (AH antigen) (Kinetochore protein CENPF) (Mitosis)	CENPF
Q7L2Z9	Centromere protein Q (CENP-Q)	CENPQ C6orf139
Q13352	Centromere protein R (CENP-R) (Beta-3-endonexin) (Integrin beta-3-binding protein) (Nuclear receptor-interacting factor 3)	ITGB3BP CENPR NRIF3
Q8N2Z9	Centromere protein S (CENP-S) (Apoptosis-inducing TAF9-like domain-containing protein 1) (FANCM-interacting histone fold protein 1) (Fanconi anemia-associated polypeptide of 16 kDa)	APITD1 CENPS FAAP16 MHF1
Q02224	Centromere-associated protein E (Centromere protein E) (CENP-E) (Kinesin-related protein CENPE)	CENPE
O95239	Chromosome-associated kinesin KIF4A (Chromokinesin-A)	KIF4A KIF4
Q9UJ98	Cohesin subunit SA-3 (SCC3 homolog 3) (Stromal antigen 3) (Stromalin-3)	STAG3
Q15021	Condensin complex subunit 1 (Chromosome condensation-related SMC-associated protein 1) (Chromosome-associated protein D2) (hCAP-D2) (Non-SMC condensin I complex subunit D2) (XCAP-D2 homolog)	NCAPD2 CAPD2 CNAP1 KIAA0159
Q9BPX3	Condensin complex subunit 3 (Chromosome-associated protein G) (Condensin subunit CAP-G) (hCAP-G) (Melanoma antigen NY-MEL-3) (Non-SMC condensin I complex subunit G) (XCAP-G homolog)	NCAPG CAPG NYMEL3
Q6IBW4	Condensin-2 complex subunit H2 (Chromosome-associated protein H2) (hCAP-H2) (Kleisin-beta) (Non-SMC condensin II complex subunit H2)	NCAPH2 CAPH2
P49959	Double-strand break repair protein MRE11A (Meiotic recombination 11 homolog 1) (MRE11 homolog 1) (Meiotic recombination 11 homolog A) (MRE11 homolog A)	MRE11A HNGS1 MRE11
Q8NEH6	Meiosis-specific nuclear structural protein 1	MNS1
Q66K74	Microtubule-associated protein 1S (MAP-1S) (BPY2-interacting protein 1) (Microtubule-associated protein 8) (Variable charge Y chromosome 2-interacting protein 1) (VCY2-interacting protein 1) (VCY2IP-1) [Cleaved into: MAP1S heavy chain; MAP1S light chain]	MAP1S BPY2IP1 C19orf5 MAP8 VCY2IP1
Q6P0N0	Mis18-binding protein 1 (Kinetochore-associated protein KNL-2 homolog) (HsKNL-2) (P243)	MIS18BP1 C14orf106 KIAA1903 KNL2 M18BP1
O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3
Q99549	M-phase phosphoprotein 8 (Two hybrid-associated protein 3 with RanBPM) (Twa3)	MPHOSPH8 MPP8
Q9P258	Protein RCC2 (RCC1-like protein TD-60) (Telophase disk protein of 60 kDa)	RCC2 KIAA1470 TD60
Q8IYS8	Putative biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 2 (Putative biorientation of chromosomes in cell division protein 1 pseudogene) (Putative protein FAM44C)	BOD1L2 BOD1P FAM44C
Q8WYR4	Radial spoke head 1 homolog (Cancer/testis antigen 79) (CT79) (Male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein)	RSPH1 TSA2 TSGA2

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
	(Meichroacidin) (Testis-specific gene A2 protein)	
P18754	Regulator of chromosome condensation (Cell cycle regulatory protein) (Chromosome condensation protein 1)	RCC1 CHC1
Q9NWS8	Required for meiotic nuclear division protein 1 homolog	RMND1 C6orf96
Q8NCR6	Spermatid-specific manchette-related protein 1 (Ciliated bronchial epithelial protein 1) (Testis development protein NYD-SP22)	SMRP1 C9orf24 CBE1
Q96BD8	Spindle and kinetochore-associated protein 1	SKA1 C18orf24
A6NHR9	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 (SMC hinge domain-containing protein 1)	SMCHD1 KIAA0650
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A (SMC protein 1A) (SMC-1-alpha) (SMC-1A) (Sb1.8)	SMC1A DXS423E KIAA0178 SB1.8 SMC1 SMC1L1
Q8NDV3	Structural maintenance of chromosomes protein 1B (SMC protein 1B) (SMC-1-beta) (SMC-1B)	SMC1B SMC1L2
Q9UQE7	Structural maintenance of chromosomes protein 3 (SMC protein 3) (SMC-3) (Basement membrane-associated chondroitin proteoglycan) (Bamacan) (Chondroitin sulfate proteoglycan 6) (Chromosome-associated polypeptide) (hCAP)	SMC3 BAM BMH CSPG6 SMC3L1
Q9BX26	Synaptonemal complex protein 2 (SCP-2) (Synaptonemal complex lateral element protein) (hsSCP2)	SYCP2 SCP2
Q8IYF3	Testis-expressed sequence 11 protein	TEX11
Q9BXU0	Testis-expressed sequence 12 protein	TEX12
Q9GZS3	WD repeat-containing protein 61 (Meiotic recombination REC14 protein homolog) (SKI8 homolog) (Ski8)	WDR61
Proteïnes del porus nuclear		
P52594	Arf-GAP domain and FG repeat-containing protein 1 (HIV-1 Rev-binding protein) (Nucleoporin-like protein RIP) (Rev-interacting protein) (Rev/Rex activation domain-binding protein)	AGFG1 HRB RAB RIP
P49792	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 (EC 6.3.2.-) (358 kDa nucleoporin) (Nuclear pore complex protein Nup358) (Nucleoporin Nup358) (Ran-binding protein 2) (RanBP2) (p270) [Includes: Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8) (Rotamase)]	RANBP2 NUP358
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107 (107 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup107)	NUP107
Q8WUM0	Nuclear pore complex protein Nup133 (133 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup133)	NUP133
P49790	Nuclear pore complex protein Nup153 (153 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup153)	NUP153
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155 (155 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup155)	NUP155
Q12769	Nuclear pore complex protein Nup160 (160 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup160)	NUP160 KIAA0197 NUP120
Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205 (205 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup205)	NUP205 C7orf14 KIAA0225
P35658	Nuclear pore complex protein Nup214 (214 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup214) (Protein CAN)	NUP214 CAIN CAN KIAA0023
Q9UKX7	Nuclear pore complex protein Nup50 (50 kDa nucleoporin) (Nuclear pore-associated protein 60 kDa-like) (Nucleoporin Nup50)	NUP50 NPAP60L
Q9BW27	Nuclear pore complex protein Nup85 (85 kDa nucleoporin) (FROUNT) (Nucleoporin Nup75) (Nucleoporin Nup85) (Pericentrin-1)	NUP85 NUP75 PCNT1

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q99567	Nuclear pore complex protein Nup88 (88 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup88)	NUP88
Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93 (93 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup93)	NUP93 KIAA0095
P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96 [Cleaved into: Nuclear pore complex protein Nup98 (98 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup98) (Nup98); Nuclear pore complex protein Nup96 (96 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup96) (Nup96)]	NUP98 ADAR2
Q92617	Nuclear pore complex-interacting protein-like 3 (Protein pps22-1)	NPIP3 KIAA0220 NPIPL3
P37198	Nuclear pore glycoprotein p62 (62 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup62)	NUP62
Q8TEM1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210 (Nuclear pore protein gp210) (Nuclear envelope pore membrane protein POM 210) (POM210) (Nucleoporin Nup210) (Pore membrane protein of 210 kDa)	NUP210 KIAA0906
Q5VU65	Nuclear pore membrane glycoprotein 210-like (Nucleoporin 210 kDa-like) (Nucleoporin Nup210-like)	NUP210L
Q53GS7	Nucleoporin GLE1 (hGLE1) (GLE1-like protein)	GLE1 GLE1L
Q9BTX1	Nucleoporin NDC1 (hNDC1) (Transmembrane protein 48)	NDC1 TMEM48
Q5SRE5	Nucleoporin NUP188 homolog (hNup188)	NUP188 KIAA0169
Q8NFH4	Nucleoporin Nup37 (p37) (Nup107-160 subcomplex subunit Nup37)	NUP37
Q8NFH3	Nucleoporin Nup43 (Nup107-160 subcomplex subunit Nup43) (p42)	NUP43
Q8NFH5	Nucleoporin NUP53 (35 kDa nucleoporin) (Mitotic phosphoprotein 44) (MP-44) (Nuclear pore complex protein Nup53) (Nucleoporin Nup35)	NUP35 MP44 NUP53
Q7Z3B4	Nucleoporin p54 (54 kDa nucleoporin)	NUP54
Q9BVL2	Nucleoporin p58/p45 (Nucleoporin-like protein 1)	NUPL1 KIAA0410
Q96EE3	Nucleoporin SEH1 (Nup107-160 subcomplex subunit SEH1) (SEC13-like protein)	SEH1L SEC13L SEH1
P12270	Nucleoprotein TPR (Megator) (NPC-associated intranuclear protein) (Translocated promoter region protein)	TPR
Ribonucleoproteïnes		
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component (Elongation factor Tu GTP-binding domain-containing protein 2) (SNU114 homolog) (hSNU114) (U5 snRNP-specific protein, 116 kDa) (U5-116 kDa)	EFTUD2 KIAA0031 SNRP116
P03950	Angiogenin (EC 3.1.27.-) (Ribonuclease 5) (RNase 5)	ANG RNASE5
Q13609	Deoxyribonuclease gamma (DNase gamma) (EC 3.1.21.-) (DNase I homolog protein DHP2) (Deoxyribonuclease I-like 3) (DNase I-like 3) (Liver and spleen DNase) (LS-DNase) (LSD)	DNASE1L3 DHP2 DNASE1L3
Q96HR8	H/ACA ribonucleoprotein complex non-core subunit NAF1 (hNAF1)	
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B) (APOBEC1-binding protein 1) (ABBP-1)	HNRNPAB ABBP1 HNRNPAB
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 (hnRNP A0)	HNRNPA0 HNRPA0
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (Helix-	HNRNPA1 HNRPA1

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
	destabilizing protein) (Single-strand RNA-binding protein) (hnRNP core protein A1)	
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (hnRNP A3)	HNRNPA3 HNRPA3
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (hnRNP D0) (AU-rich element RNA-binding protein 1)	HNRNPD AUF1 HNRPD
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (hnRNP D-like) (hnRNP DL) (AU-rich element RNA-binding factor) (JKT41-binding protein) (Protein laAUF1)	HNRNPDL HNRPDL JKTBP
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F) (Nucleolin-like protein mcs94-1) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed]	HNRNPF HNRPF
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed]	HNRNPH1 HNRPH HNRPH1
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (hnRNP H2) (FTP-3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H') (hnRNP H') [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2, N-terminally processed]	HNRNPH2 FTP3 HNRPH2
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNPH3 HNRPH3
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HNRNPK HNRPK
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)	HNRNPL HNRPL P/OKcl.14
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNP M)	HNRNPM HNRPM NAGR1
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein) (GRY-RBP) (NS1-associated protein 1) (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein)	SYNCRIP HNRPQ NSAP1
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R)	HNRNPR HNRPR
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) (Scaffold attachment factor A) (SAF-A) (p120) (pp120)	HNRNPU HNRPU SAFA U21.1
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 (Scaffold-attachment factor A2) (SAF-A2)	HNRNPUL2 HNRPUL2
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	HNRNPA2B1 HNRPA2B1
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (hnRNP C1/C2)	HNRNPC HNRPC
Q6PKG0	La-related protein 1 (La ribonucleoprotein domain family member 1)	LARP1 KIAA0731 LARP
P05455	Lupus La protein (La autoantigen) (La ribonucleoprotein) (Sjogren syndrome type B antigen) (SS-B)	SSB
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 (Alpha-CP1) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1) (hnRNP E1) (Nucleic acid-binding protein SUB2.3)	PCBP1
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 (Alpha-CP2) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E2) (hnRNP E2)	PCBP2
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB) (57 kDa RNA-binding protein PPTB-1) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) (hnRNP I)	PTBP1 PTB

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9NRR4	Ribonuclease 3 (EC 3.1.26.3) (Protein Drosha) (Ribonuclease III) (RNase III) (p241)	DROSHA RN3 RNASE3L RNASEN
Q5TBB1	Ribonuclease H2 subunit B (RNase H2 subunit B) (Aicardi-Goutieres syndrome 2 protein) (AGS2) (Deleted in lymphocytic leukemia 8) (Ribonuclease HI subunit B)	RNASEH2B DLEU8
P78345	Ribonuclease P protein subunit p38 (RNaseP protein p38) (EC 3.1.26.5)	RPP38
P52758	Ribonuclease UK114 (EC 3.1.-.-) (14.5 kDa translational inhibitor protein) (p14.5) (Heat-responsive protein 12) (UK114 antigen homolog)	HRSP12 PSP
Q9HCJ3	Ribonucleoprotein PTB-binding 2 (Protein raver-2)	RAVER2 KIAA1579
O75526	RNA-binding motif protein, X-linked-like-2 (Testis-specific heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-T) (hnRNP G-T)	RBMXL2 HNRNPGT
Q9Y5S9	RNA-binding protein 8A (Binder of OVCA1-1) (BOV-1) (RNA-binding motif protein 8A) (RNA-binding protein Y14) (Ribonucleoprotein RBM8A)	RBM8A RBM8 HSPC114 MDS014
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E (snRNP-E) (Sm protein E) (Sm-E) (SmE)	SNRPE
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 (Sm-D1) (Sm-D autoantigen) (snRNP core protein D1)	SNRPD1
P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B' (snRNP-B) (Sm protein B/B') (Sm-B/B') (SmB/B')	SNRPB COD SNRPB1
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa (U1 snRNP 70 kDa) (U1-70K) (snRNP70)	SNRNP70 RNPU1Z RPU1 SNRP70 U1AP1
Q9Y5J1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog (WD repeat-containing protein 50)	UTP18 WDR50 CDABP0061 CGI-48
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13) (Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD)	SNRNP200 ASCC3L1 HELIC2 KIAA0788
Q9Y333	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2 (Protein G7b) (Small nuclear ribonuclear protein D homolog) (snRNP core Sm-like protein Sm-x5)	LSM2 C6orf28 G7B
Altres nucleoproteïnes		
O96019	Actin-like protein 6A (53 kDa BRG1-associated factor A) (Actin-related protein Baf53a) (ArpNbeta) (BRG1-associated factor 53A) (BAF53A) (INO80 complex subunit K)	ACTL6A BAF53 BAF53A INO80K
Q96M93	Adenosine deaminase domain-containing protein 1 (Testis nuclear RNA-binding protein)	ADAD1 TENR
Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6 (AK6) (EC 2.7.4.3) (Adrenal gland protein AD-004) (Coilin-interacting nuclear ATPase protein) (hCINAP) (Dual activity adenylate kinase/ATPase) (AK/ATPase)	TAF9 AK6 CINAP AD-004 CGI-137
P50995	Annexin A11 (56 kDa autoantigen) (Annexin XI) (Annexin-11) (Calcyclin-associated annexin 50) (CAP-50)	ANXA11 ANX11
P46013	Antigen KI-67	MKI67
Q9UKV3	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus (Acinus)	ACIN1 ACINUS KIAA0670
Q6PL18	ATPase family AAA domain-containing protein 2 (EC 3.6.1.3) (AAA nuclear coregulator cancer-associated protein) (ANCCA)	ATAD2 L16 PRO2000

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A (RHA) (EC 3.6.4.13) (DEAH box protein 9) (Leukophysin) (LKP) (Nuclear DNA helicase II) (NDH II)	DHX9 DDX9 LKP NDH2
Q9NUU7	ATP-dependent RNA helicase DDX19A (EC 3.6.4.13) (DDX19-like protein) (DEAD box protein 19A)	DDX19A DDX19L
Q9UMR2	ATP-dependent RNA helicase DDX19B (EC 3.6.4.13) (DEAD box RNA helicase DEAD5) (DEAD box protein 19B)	DDX19B DBP5 DDX19 TDBP
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 39) (Nuclear RNA helicase URH49)	DDX39A DDX39
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 3, X-chromosomal) (DEAD box, X isoform) (Helicase-like protein 2) (HLP2)	DDX3X DBX DDX3
O15523	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 3, Y-chromosomal)	DDX3Y DBY
P29374	AT-rich interactive domain-containing protein 4A (ARID domain-containing protein 4A) (Retinoblastoma-binding protein 1) (RBBP-1)	ARID4A RBBP1 RBP1
Q6PL18	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2 (Antigen nuclear dot 52 kDa protein) (Nuclear domain 10 protein NDP52) (Nuclear domain 10 protein 52) (Nuclear dot protein 52)	CALCOCO2 NDP52
Q9NX58	Cell growth-regulating nucleolar protein	NOC4L
O00299	Chloride intracellular channel protein 1 (Chloride channel ABP) (Nuclear chloride ion channel 27) (NCC27) (Regulatory nuclear chloride ion channel protein) (hRNCC)	CLIC1 G6 NCC27
Q96S65	Cysteine/serine-rich nuclear protein 1 (CSRNP-1) (Axin-1 up-regulated gene 1 protein) (Protein URAX1) (TGF-beta-induced apoptosis protein 3) (TAIP-3)	CSRNP1 AXUD1 TAIP3
Q9H175	Cysteine/serine-rich nuclear protein 2 (CSRNP-2) (Protein FAM130A1) (TGF-beta-induced apoptosis protein 12) (TAIP-12)	CSRNP2 C12orf22 FAM130A1 TAIP12
Q58WW2	DDB1- and CUL4-associated factor 6 (Androgen receptor complex-associated protein) (ARCAP) (IQ motif and WD repeat-containing protein 1) (Nuclear receptor interaction protein) (NRIP)	DCAF6 IQWD1 MSTP055
Q96L91	E1A-binding protein p400 (EC 3.6.4.-) (CAG repeat protein 32) (Domino homolog) (hDomino) (Trinucleotide repeat-containing gene 12 protein) (p400 kDa SWI2/SNF2-related protein)	EP400 CAGH32 KIAA1498 KIAA1818 TNRC12
P50402	Emerin	GTPBP4 CRFG NOG1
O14980	Exportin-1 (Exp1) (Chromosome region maintenance 1 protein homolog)	NOP14 C4orf9 NOL14 RES4-25
P55060	Exportin-2 (Exp2) (Cellular apoptosis susceptibility protein) (Chromosome segregation 1-like protein) (Importin-alpha re-exporter)	NOL3 ARC NOP
Q96QU8	Exportin-6 (Exp6) (Ran-binding protein 20)	XPO6 KIAA0370 RANBP20
Q9UIA9	Exportin-7 (Exp7) (Ran-binding protein 16)	XPO7 KIAA0745 RANBP16
O43592	Exportin-T (Exportin(tRNA)) (tRNA exportin)	XPOT
Q9UNN5	FAS-associated factor 1 (hFAF1) (UBX domain-containing protein 12) (UBX domain-containing protein 3A)	FAF1 UBXD12 UBXN3A CGI-03
P85037	Forkhead box protein K1 (Myocyte nuclear factor) (MNF)	FOXK1 MNF
Q5SSJ5	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Protein HP1-BP74)	HP1BP3

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
P52294	Importin subunit alpha-5 (Karyopherin subunit alpha-1) (Nucleoprotein interactor 1) (NPI-1) (RAG cohort protein 2) (SRP1-beta)	KPNA1 RCH2
Q14974	Importin subunit beta-1 (Importin-90) (Karyopherin subunit beta-1) (Nuclear factor p97) (Pore targeting complex 97 kDa subunit) (PTAC97)	KPNB1 NTF97
P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha (Thymopoietin isoform alpha) (TP alpha) (Thymopoietin-related peptide isoform alpha) (TPRP isoform alpha) [Cleaved into: Thymopoietin (TP) (Splenin); Thymopentin (TP5)]	TMPO LAP2
Q14739	Lamin-B receptor (Integral nuclear envelope inner membrane protein) (LMN2R)	LBR
P20700	Lamin-B1	LMNB1 LMN2 LMNB
Q03252	Lamin-B2	LMNB2 LMN2
P07199	Major centromere autoantigen B (Centromere protein B) (CENP-B)	CENPB
P43243	Matrin-3	MATR3 KIAA0723
Q9HCI5	Melanoma-associated antigen E1 (Alpha-dystrobrevin-associated MAGE Protein) (DAMAGE) (Hepatocellular carcinoma-associated protein 1) (MAGE-E1 antigen)	MAGEE1 HCA1 KIAA1587
O00255	Menin	MEN1 SCG2
Q8NF91	Nesprin-1 (Enaptin) (Myocyte nuclear envelope protein 1) (Myne-1) (Nuclear envelope spectrin repeat protein 1) (Synaptic nuclear envelope protein 1) (Syne-1)	SYNE1 C6orf98 KIAA0796 KIAA1262 KIAA1756 MYNE1
Q8WXH0	Nesprin-2 (Nuclear envelope spectrin repeat protein 2) (Nucleus and actin connecting element protein) (Protein NUANCE) (Synaptic nuclear envelope protein 2) (Syne-2)	SYNE2 KIAA1011 NUA
Q6ZM23	Nesprin-3 (Nuclear envelope spectrin repeat protein 3)	SYNE3 C14orf49
Q8IVL0	Neuron navigator 3 (Pore membrane and/or filament-interacting-like protein 1) (Steerin-3) (Unc-53 homolog 3) (unc53H3)	NAV3 KIAA0938 POMFIL1 STEERIN3
P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP
Q09161	Nuclear cap-binding protein subunit 1 (80 kDa nuclear cap-binding protein) (CBP80) (NCBP 80 kDa subunit)	NCBP1 CBP80 NCBP
Q9NXR1	Nuclear distribution protein nudE homolog 1 (NudE)	NDE1 NUDE
Q9GZM8	Nuclear distribution protein nudE-like 1 (Protein Nudel) (Mitosis-associated protein 1)	NDEL1 EOPA MITAP1 NUDEL
Q8N9A8	Nuclear envelope phosphatase-regulatory subunit 1 (NEP1-R1) (Transmembrane protein 188)	CNEP1R1 C16orf69 TMEM188
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC (Nuclear distribution protein C homolog)	NUDC
Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog (Protein NPL4)	NPLOC4 KIAA1499 NPL4
Q9HCD5	Nuclear receptor coactivator 5 (NCoA-5) (Coactivator independent of AF-2) (CIA)	NCOA5 KIAA1637
O75376	Nuclear receptor corepressor 1 (N-CoR) (N-CoR1)	NCOR1 KIAA1047
P13056	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 1 (Orphan nuclear receptor TR2) (Testicular receptor 2)	NR2C1 TR2
Q9UHY1	Nuclear receptor-binding protein	NRBP1 BCON3 NRBP
Q9NSY0	Nuclear receptor-binding protein 2 (Transformation-related gene 16 protein) (TRG-16)	NRBP2 PP9320 TRG16

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
P61970	Nuclear transport factor 2 (NTF-2) (Placental protein 15) (PP15)	NUTF2 NTF2
Q02818	Nucleobindin-1 (CALNUC)	NUCB1 NUC
P80303	Nucleobindin-2 (DNA-binding protein NEFA) (Gastric cancer antigen Zg4) (Prepronesfatin) [Cleaved into: Nesfatin-1]	NUCB2 NEFA
Q9BVI4	Nucleolar complex protein 4 homolog (NOC4 protein homolog) (NOC4-like protein) (Nucleolar complex-associated protein 4-like protein)	NOP56 NOL5A
Q9BZE4	Nucleolar GTP-binding protein 1 (Chronic renal failure gene protein) (GTP-binding protein NGB)	NOP58 NOL5 NOP5 HSPC120
P78316	Nucleolar protein 14 (Nucleolar complex protein 14)	NPM1 NPM
O60936	Nucleolar protein 3 (Apoptosis repressor with CARD) (Muscle-enriched cytoplasmic protein) (Myp) (Nucleolar protein of 30 kDa) (Nop30)	TPR
O00567	Nucleolar protein 56 (Nucleolar protein 5A)	XPO1 CRM1
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58 (Nucleolar protein 5)	CSE1L CAS XPO2
P06748	Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Nucleolar protein NO38) (Numatrin)	LYAR PNAS-5
P12270	Nucleoprotein TPR (Megator) (NPC-associated intranuclear protein) (Translocated promoter region protein)	EMD EDMD STA
Q6DKJ4	Nucleoredoxin (EC 1.8.1.8)	NXN NRX
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A (NDK A) (NDP kinase A) (EC 2.7.4.6) (Granzyme A-activated DNase) (GAAD) (Metastasis inhibition factor nm23) (Tumor metastatic process-associated protein) (nm23-H1)	NME1 NDPKA NM23
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP-1-related protein) (hNRP)	NAP1L1 NRP
Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4 (Nucleosome assembly protein 2) (NAP-2)	NAP1L4 NAP2
Q13416	Origin recognition complex subunit 2	ORC2 ORC2L
Q9UBD5	Origin recognition complex subunit 3 (Origin recognition complex subunit Latheo)	ORC3 LATHEO ORC3L
Q15022	Polycomb protein SUZ12 (Chromatin precipitated E2F target 9 protein) (ChET 9 protein) (Joined to JAZF1 protein) (Suppressor of zeste 12 protein homolog)	SUZ12 CHET9 JAZ1 KIAA0160
P02545	Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C (70 kDa lamin) (Renal carcinoma antigen NY-REN-32)]	LMNA LMN1
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19 (Nuclear matrix protein 200) (PRP19/PSO4 homolog) (hPso4) (Senescence evasion factor)	PRPF19 NMP200 PRP19 SNEV
Q86U86	Protein polybromo-1 (hPB1) (BRG1-associated factor 180) (BAF180) (Polybromo-1D)	PBRM1 BAF180 PB1
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (EC 3.6.4.-) (ATP-dependent helicase RENT1) (Nonsense mRNA reducing factor 1) (NORF1) (Up-frameshift suppressor 1 homolog) (hUpf1)	UPF1 KIAA0221 RENT1
Q9HAU5	Regulator of nonsense transcripts 2 (Nonsense mRNA reducing factor 2) (Up-frameshift suppressor 2 homolog) (hUpf2)	UPF2 KIAA1408 RENT2
Q08999	Retinoblastoma-like protein 2 (130 kDa retinoblastoma-associated protein) (p130) (Retinoblastoma-related protein 2) (RBR-2) (pRb2)	RBL2 RB2
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 (SR-related nuclear matrix protein of 160 kDa) (SRm160) (Ser/Arg-related nuclear matrix protein)	SRRM1 SRM160

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q9Y2H1	Serine/threonine-protein kinase 38-like (EC 2.7.11.1) (NDR2 protein kinase) (Nuclear Dbf2-related kinase 2)	STK38L KIAA0965 NDR2
Q13535	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	ATR FRP1
Q8TF76	Serine/threonine-protein kinase haspin (EC 2.7.11.1) (Germ cell-specific gene 2 protein) (H-haspin) (Haploid germ cell-specific nuclear protein kinase)	GSG2
O43805	Sjogren syndrome nuclear autoantigen 1 (Nuclear autoantigen of 14 kDa)	SSNA1 NA14
Q8TAD8	Smad nuclear-interacting protein 1 (FHA domain-containing protein SNIP1)	SNIP1
Q9NS26	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome A (Cancer/testis antigen 11.1) (CT11.1) (Nuclear-associated protein SPAN-Xa) (SPAN-X) (SPANX-A) (SPANX family member A)	SPANXA1 SPANXA; SPANXA2
Q9NS25	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome B/F (Cancer/testis antigen 11.2) (CT11.2) (Nuclear-associated protein SPAN-Xb) (SPANX-B) (Nuclear-associated protein SPAN-Xf) (SPANX-F) (SPANX family member B/F)	SPANXB1 SPANXB; SPANXB2; SPANXF1
Q9NY87	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome C (Cancer/testis antigen 11.3) (CT11.3) (Cancer/testis-associated protein CTp11) (Nuclear-associated protein SPAN-Xc) (SPANX-C) (SPANX family member C)	SPANXC
Q9BXN6	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome D (Cancer/testis antigen 11.4) (CT11.4) (Nuclear-associated protein SPAN-Xd) (SPANX-D) (SPANX family member D)	SPANXD
Q8TAD1	Sperm protein associated with the nucleus on the X chromosome E (Nuclear-associated protein SPAN-Xe) (SPANX-E) (SPANX family member E)	SPANXE
Q01081	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit (U2 auxiliary factor 35 kDa subunit) (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1) (U2 snRNP auxiliary factor small subunit)	U2AF1 U2AF35 U2AFBP FP793
Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1 (BRG1-associated factor 155) (BAF155) (SWI/SNF complex 155 kDa subunit) (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 1)	SMARCC1 BAF155
Q99973	Telomerase protein component 1 (Telomerase-associated protein 1) (Telomerase protein 1) (p240) (p80 telomerase homolog)	TEP1 TLP1 TP1
Q86US8	Telomerase-binding protein EST1A (EC 3.1.-.-) (EST1-like protein A) (Ever shorter telomeres 1A) (Smg-6 homolog) (Telomerase subunit EST1A) (hSmg5/7a)	SMG6 C17orf31 EST1A KIAA0732
Q9Y4R8	Telomere length regulation protein TEL2 homolog (Protein clk-2 homolog) (hCLK2)	TELO2 KIAA0683
Q9P016	Thymocyte nuclear protein 1 (Thymocyte protein Thy28)	THYN1 THY28 HSPC144 MDS012 My0054
Q3YBR2	Transforming growth factor beta regulator 1 (Nuclear interactor of ARF and Mdm2)	TBRG1 NIAM
Q92973	Transportin-1 (Importin beta-2) (Karyopherin beta-2) (M9 region interaction protein) (MIP)	TNPO1 KPNB2 MIP1 TRN

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
O14787	Transportin-2 (Karyopherin beta-2b)	TNPO2
P42685	Tyrosine-protein kinase FRK (EC 2.7.10.2) (FYN-related kinase) (Nuclear tyrosine protein kinase RAK) (Protein-tyrosine kinase 5)	FRK PTK5 RAK
Q8WVY7	Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1 (EC 3.1.3.16) (Nuclear proteasome inhibitor UBLCP1)	UBLCP1
O95619	YEATS domain-containing protein 4 (Glioma-amplified sequence 41) (Gas41) (NuMA-binding protein 1) (NuBI-1) (NuBI1)	YEATS4 GAS41
P49750	YLP motif-containing protein 1 (Nuclear protein ZAP3) (ZAP113)	YLPM1 C14orf170 ZAP3
<i>Proteïnes que podrien tenir una localització nuclear i/o citoplasmàtica</i>		
Q86YW0	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase zeta-1 (EC 3.1.4.11) (Phosphoinositide phospholipase C-zeta-1) (Phospholipase C-zeta-1) (PLC-zeta-1) (Testis-development protein NYD-SP27)	PLCZ1
Q96PN6	Adenylate cyclase type 10 (EC 4.6.1.1) (AH-related protein) (Adenylate cyclase homolog) (Germ cell soluble adenylyl cyclase) (hsAC) (sAC) (Testicular soluble adenylyl cyclase)	ADCY10 SAC
P84077	ADP-ribosylation factor 1	ARF1
P61204	ADP-ribosylation factor 3	ARF3
P84085	ADP-ribosylation factor 5	ARF5
Q15041	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1 (ARL-6-interacting protein 1) (Aip-1)	ARL6IP1 ARL6IP KIAA0069
Q12802	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKA13) (p47)	AKAP13 BRX HT31 LBC
Q9NRG9	Aladin (Adracalin)	AAAS ADRACALA GL003
O43707	Alpha-actinin-4 (F-actin cross-linking protein) (Non-muscle alpha-actinin 4)	ACTN4
P07355	Annexin A2 (Annexin II) (Annexin-2) (Calpactin I heavy chain) (Calpactin-1 heavy chain) (Chromobindin-8) (Lipocortin II) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV) (Protein I) (p36)	ANXA2 ANX2 ANX2L4 CAL1H LPC2D
Q13625	Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (Bcl2-binding protein) (Bbp) (Renal carcinoma antigen NY-REN-51) (Tumor suppressor p53-binding protein 2) (53BP2) (p53-binding protein 2) (p53BP2)	TP53BP2 ASPP2 BBP
P09917	Arachidonate 5-lipoxygenase (5-LO) (5-lipoxygenase) (EC 1.13.11.34)	ALOX5 LOG5
O60238	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (Adenovirus E1B19K-binding protein B5) (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3A) (NIP3-like protein X) (NIP3L)	BNIP3L BNIP3A BNIP3H NIX
P16278	Beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) (Acid beta-galactosidase) (Lactase) (Elastin receptor 1)	GLB1 ELNR1
Q9HB71	Calcyclin-binding protein (CacyBP) (hCacyBP) (S100A6-binding protein) (Siah-interacting protein)	CACYBP S100A6BP SIP PNAS-107
P68400	Casein kinase II subunit alpha (CK II alpha) (EC 2.7.11.1)	CSNK2A1 CK2A1

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
P10909	Clusterin (Aging-associated gene 4 protein) (Apolipoprotein J) (Apo-J) (Complement cytolysis inhibitor) (CLI) (Complement-associated protein SP-40,40) (Ku70-binding protein 1) (NA1/NA2) (Testosterone-repressed prostate message 2) (TRPM-2) [Cleaved into: Clusterin beta chain (ApoJalpha) (Complement cytolysis inhibitor a chain); Clusterin alpha chain (ApoJbeta) (Complement cytolysis inhibitor b chain)]	CLU APOJ CLI KUB1 AAG4
O95476	CTD nuclear envelope phosphatase 1 (EC 3.1.3.16) (Serine/threonine-protein phosphatase dullard)	CTDNEP1 DULLARD
O14976	Cyclin-G-associated kinase (EC 2.7.11.1)	GAK
Q02750	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP kinase kinase 1) (MAPKK 1) (MKK1) (EC 2.7.12.2) (ERK activator kinase 1) (MAPK/ERK kinase 1) (MEK 1)	MAP2K1 MEK1 PRKMK1
Q9H201	Epsin-3 (EPS-15-interacting protein 3)	EPN3
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III (eIF-4A-III) (eIF4A-III) (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DDX48) (ATP-dependent RNA helicase eIF4A-3) (DEAD box protein 48) (Eukaryotic initiation factor 4A-like NUK-34) (Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 3) (Nuclear matrix protein 265) (NMP 265) (hNMP 265) [Cleaved into: Eukaryotic initiation factor 4A-III, N-terminally processed]	EIF4A3 DDX48 KIAA0111
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (eIF3e) (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6) (Viral integration site protein INT-6 homolog) (eIF-3 p48)	EIF3E EIF3S6 INT6
Q8N2G8	GH3 domain-containing protein	GHDC D11LGP1E LGP1
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran (Androgen receptor-associated protein 24) (GTPase Ran) (Ras-like protein TC4) (Ras-related nuclear protein)	RAN ARA24 OK/SW-cl.81
O00165	HCLS1-associated protein X-1 (HS1-associating protein X-1) (HAX-1) (HS1-binding protein 1) (HSP1BP-1)	HAX1 HS1BP1
P52292	Importin subunit alpha-1 (Karyopherin subunit alpha-2) (RAG cohort protein 1) (SRP1-alpha)	KPNA2 RCH1 SRP1
O00629	Importin subunit alpha-3 (Importin alpha Q1) (Qip1) (Karyopherin subunit alpha-4)	KPNA4 QIP1
O00505	Importin subunit alpha-4 (Importin alpha Q2) (Qip2) (Karyopherin subunit alpha-3) (SRP1-gamma)	KPNA3 QIP2
O15131	Importin subunit alpha-6 (Karyopherin subunit alpha-5)	KPNA5
O60684	Importin subunit alpha-7 (Karyopherin subunit alpha-6)	KPNA6 IPOA7
Q9UI26	Importin-11 (Imp11) (Ran-binding protein 11) (RanBP11)	IPO11 RANBP11
O94829	Importin-13 (Imp13) (Karyopherin-13) (Kap13) (Ran-binding protein 13) (RanBP13)	IPO13 KIAA0724 RANBP13
Q8TEX9	Importin-4 (Imp4) (Importin-4b) (Imp4b) (Ran-binding protein 4) (RanBP4)	IPO4 IMP4B RANBP4
O00410	Importin-5 (Imp5) (Importin subunit beta-3) (Karyopherin beta-3) (Ran-binding protein 5) (RanBP5)	IPO5 KPNB3 RANBP5
O95373	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7) (RanBP7)	IPO7 RANBP7
O15397	Importin-8 (Imp8) (Ran-binding protein 8) (RanBP8)	IPO8 RANBP8
Q96P70	Importin-9 (Imp9) (Ran-binding protein 9) (RanBP9)	IPO9 IMP9 KIAA1192 RANBP9 HSPC273
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cell proliferation-inducing gene 46 protein) (Cytokeratin-18) (CK-18) (Keratin-18) (K18)	KRT18 CYK18 PIG46

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9) (K9)	KRT9
Q8N4N8	Kinesin-like protein KIF2B	KIF2B
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59 (Ribosome-binding protein p34) (p34)	LRRC59 PRO1855
Q14764	Major vault protein (MVP) (Lung resistance-related protein)	MVP LRP
P78406	mRNA export factor (Rae1 protein homolog) (mRNA-associated protein mrnp 41)	RAE1 MRNP41
Q9UDY8	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 (EC 3.4.22.-) (MALT lymphoma-associated translocation) (Paracaspase)	MALT1 MLT
P41218	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA
Q9Y217	Myotubularin-related protein 6 (EC 3.1.3.-)	MTMR6
Q9BUP3	Oxidoreductase HTATIP2 (EC 1.1.1.-) (30 kDa HIV-1 TAT-interacting protein) (HIV-1 TAT-interactive protein 2)	HTATIP2 CC3 TIP30
P43034	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha (Lissencephaly-1 protein) (LIS-1) (PAF acetylhydrolase 45 kDa subunit) (PAF-AH 45 kDa subunit) (PAF-AH alpha) (PAFAH alpha)	PAFAH1B1 LIS1 MDCR MDS PAFAHA
Q53EL6	Programmed cell death protein 4 (Neoplastic transformation inhibitor protein) (Nuclear antigen H731-like) (Protein 197/15a)	PDCD4 H731
Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4 (Cell cycle protein p38-2G4 homolog) (hG4-1) (ErbB3-binding protein 1)	PA2G4 EBP1
P61289	Proteasome activator complex subunit 3 (11S regulator complex subunit gamma) (REG-gamma) (Activator of multicatalytic protease subunit 3) (Ki nuclear autoantigen) (Proteasome activator 28 subunit gamma) (PA28g) (PA28gamma)	PSME3
Q96JY0	Protein maelstrom homolog	MAEL
Q8WY54	Protein phosphatase 1E (EC 3.1.3.16) (Ca ²⁺)/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase N) (CaMKP-N) (CaMKP-nucleus) (CaMKN) (Partner of PIX 1) (Partner of PIX-alpha) (Partner of PIXA)	PPM1E CAMKN KIAA1072 POPX1
Q9H3U1	Protein unc-45 homolog A (Unc-45A) (GCUNC-45) (Smooth muscle cell-associated protein 1) (SMAP-1)	UNC45A SMAP1
Q14289	Protein-tyrosine kinase 2-beta (EC 2.7.10.2) (Calcium-dependent tyrosine kinase) (CADTK) (Calcium-regulated non-receptor proline-rich tyrosine kinase) (Cell adhesion kinase beta) (CAK-beta) (CAKB) (Focal adhesion kinase 2) (FADK 2) (Proline-rich tyrosine kinase 2) (Related adhesion focal tyrosine kinase) (RAFTK)	PTK2B FAK2 PYK2 RAFTK
P61457	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase (PHS) (EC 4.2.1.96) (4-alpha-hydroxy-tetrahydropterin dehydratase) (Dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1-alpha) (DCoH) (Dimerization cofactor of HNF1) (Phenylalanine hydroxylase-stimulating protein) (Pterin carbinolamine dehydratase) (PCD)	PCBD1 DCOH PCBD
Q9H0N5	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2 (PHS 2) (EC 4.2.1.96) (4-alpha-hydroxy-tetrahydropterin dehydratase 2) (DcoH-like protein DCoHm) (Dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 from muscle) (HNF-1-alpha dimerization cofactor)	PCBD2 DCOH2 DCOHM
P46060	Ran GTPase-activating protein 1 (RanGAP1)	RANGAP1 KIAA1835 SD
Q9H2T7	Ran-binding protein 17	RANBP17
Q684P5	Rap1 GTPase-activating protein 2 (Rap1GAP2) (GTPase-activating Rap/Ran-GAP domain-like protein 4)	RAP1GAP2 GARNL4 KIAA1039 RAP1GA2

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
A1A4S6	Rho GTPase-activating protein 10 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase 2) (Graf-related protein 2) (Rho-type GTPase-activating protein 10)	ARHGAP10 GRAF2
Q8IUC4	Rhopilin-2 (76 kDa RhoB effector protein) (GTP-Rho-binding protein 2) (p76RBE)	RHPN2
Q15633	RISC-loading complex subunit TARBP2 (TAR RNA-binding protein 2) (Trans-activation-responsive RNA-binding protein)	TARBP2 TRBP
Q9BYT3	Serine/threonine-protein kinase 33 (EC 2.7.11.1)	STK33
Q6P5Z2	Serine/threonine-protein kinase N3 (EC 2.7.11.13) (Protein kinase PKN-beta) (Protein-kinase C-related kinase 3)	PKN3 PKNBETA
Q15172	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit alpha isoform (PP2A B subunit isoform B'-alpha) (PP2A B subunit isoform B56-alpha) (PP2A B subunit isoform PR61-alpha) (PR61alpha) (PP2A B subunit isoform R5-alpha)	PPP2R5A
P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform (PP2A-alpha) (EC 3.1.3.16) (Replication protein C) (RP-C)	PPP2CA
P62714	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform (PP2A-beta) (EC 3.1.3.16)	PPP2CB
P63279	SUMO-conjugating enzyme UBC9 (EC 6.3.2.-) (SUMO-protein ligase) (Ubiquitin carrier protein 9) (Ubiquitin carrier protein I) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I) (Ubiquitin-protein ligase I) (p18)	UBE2I UBC9 UBCE9
Q9Y2Z0	Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog (Protein 40-6-3) (Sgt1)	SUGT1
O95271	Tankyrase-1 (TANK1) (EC 2.4.2.30) (ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin-like 5) (ARTD5) (Poly [ADP-ribose] polymerase 5A) (TNKS-1) (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase) (Tankyrase I)	TNKS PARP5A PARPL TIN1 TINF1 TNKS1
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)	TCP1 CCT1 CCTA
Q9BZW7	Testis-specific gene 10 protein (Testis development protein NYD-SP7)	TSGA10 CEP4L
O14656	Torsin-1A (Dystonia 1 protein) (Torsin family 1 member A)	TOR1A DQ2 DYT1
Q2TAA8	Translin-associated factor X-interacting protein 1 (Trax-interacting protein 1)	TSNAXIP1 TXI1
Q99598	Translin-associated protein X (Translin-associated factor X)	TSNAX TRAX
P55327	Tumor protein D52 (Protein N8)	TPD52
Q16890	Tumor protein D53 (hD53) (Tumor protein D52-like 1)	TPD52L1
P07948	Tyrosine-protein kinase Lyn (EC 2.7.10.2) (Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase) (V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog) (p53Lyn) (p56Lyn)	LYN JTK8
Q9UMX0	Ubiquilin-1 (Protein linking IAP with cytoskeleton 1) (PLIC-1) (hPLIC-1)	UBQLN1 DA41 PLIC1
Q9UHP3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 25) (USP on chromosome 21) (Ubiquitin thioesterase 25) (Ubiquitin-specific-processing protease 25)	USP25 USP21
Q13107	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 4) (Ubiquitin thioesterase 4) (Ubiquitin-specific-processing protease 4) (Ubiquitous nuclear protein homolog)	USP4 UNP UNPH
Q9NQ7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme CYLD) (Ubiquitin thioesterase CYLD) (Ubiquitin-specific-processing protease CYLD)	CYLD CYLD1 KIAA0849 HSPC057

8. Annexos

Núm. d'accés UniprotKB	Noms de les proteïnes	Nom del Gen
Q92575	UBX domain-containing protein 4 (Erasin) (UBX domain-containing protein 2)	UBXN4 KIAA0242 UBXD2 UBXDC1
O00159	Unconventional myosin-Ic (Myosin I beta) (MMI-beta) (MMIb)	MYO1C
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166 (CLE7 homolog) (CLE)	C14orf166 CGI-99
Q9BZF9	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA KIAA1561

9. Llistat d'abreviatures

9. Listat d'abreviatures

µg	Microgram/s
µl	Microlitre/s
1D	Monodimensional
2D	Bidimensional

B

BP	<i>Biological Process</i> / Procès biològic
BRDT	<i>Testis-specific bromodomain-containing protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> / albúmina de sèrum boví

C

CASA	<i>Computer-aided sperm analysis</i>
CC	<i>Cellular Component</i> / Component cel·lular
CCiTUB	Centres Científics i Tecnològics de la UB
CHAPS	<i>3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-propanesulfonate</i>
CMA3	Cromomicina A3
CpG	Dinucleòtids citosina-guanina
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>

D

Da	Dalton/s
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery</i>
<i>DGC Sample</i>	<i>Density Gradient Centrifuged Sample</i> / Mostra centrifugada amb gradient de densitat
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / àcid desoxiribonucleic
DNMT	<i>DNA (cytosine-5) methyl transferases</i> / DNA metiltransferases

E

ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
-----	--------------------------------

F

F	<i>Forward</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FI	Fracció insoluble de la cromatina
FIV	Fecundació <i>in vitro</i>
FS	Fracció soluble de la cromatina
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i> / Hormona fol·liculostimulant

G

<i>g</i>	Velocitat de centrifugació
g	Gram/s
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> / Hormona alliberadora de gonadotropina
GO	<i>Gene Ontology</i>

H

h	hora/es
H1t	<i>Testicular H1 histone</i>

I

I2PP2A	<i>Phosphatase 2A inhibitor (protein SET)</i>
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> / Injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides
IDIBAPS	Institut De Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer
IF	<i>Impact factor</i> / Factor d'impacte
IMPPC	Institut de Medicina Preventiva i Personal del Càncer

9. Llistat d'abreviatures

J

JmjC Domini Jumonji-C

K

K Lisina

L

L Litre/s

LC *Liquid Chromatography*/ Cromatografia líquida

LH *Luteinizing hormone* / Hormona luteïnitzant

M

m Massa

MALDI *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*

me Metilació

me₂ Dimetilació

me₃ Trimetilació

mg Mil·ligram/s

min Minut/s

ml Mil·lilitre/s

MNP *Micrococcal Nuclease Pellet* / Sediment de la nucleasa micrococcal

MNS *Micrococcal Nuclease Supernatant* / Sobrenedant de la nucleasa micrococcal

MS *Mass Spectrometry* / Espectrometria de masses

MS/MS *Tandem Mass Spectrometry*/ Espectrometria de masses en tàndem

N

ng Nanogram/s

NH Nucli-histona / Domini nucli-histònic

nLC *nano-liquid chromatography* / nano-cromatografia líquida

nm Nanometres

NM Nucleasa Micrococcal

NP Nucli-protamina / Domini nucli-protamínic

O

O/N *Over Night* / durant tota la nit

P

p/v pes/volum

P1 Protamina 1

P2 Protamina 2

PAGE *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* / Electroforesi en gel de poliacrilamida

pb Parells de bases

PBS *Phosphate buffered saline*

PCA *Perchloracetic acid* / Àcid percloracètic

PCR *Polymerase Chain Reaction* / Reacció en cadena de la polimerasa

PFA Paraformaldehid

PHD *Plant homeodomain*

PHF8 *Histone demethylase PHF8*

PLCZ Fosfolipasa C ζ

ppm Parts per milió

pre-P2 Precursor de la Protamina 2

PRM1 Gen de la Protamina 1

PRM2 Gen de la Protamina 2

PSA	Persulfat amònic
PT32	<i>32-kD perinuclear theca protein</i>
PTMs	<i>Post-translational modifications / modificacions postraduccional</i> s

R

R	<i>Reverse</i>
RA	Reproducció Assistida
RNA	<i>Ribonucleic acid / àcid ribonucleic</i>
RPL9	<i>60S ribosomal protein L9</i>
RT	<i>Reverse Transcription / Transcripció Reversa</i>

S

s	Segon/s
SCD	<i>Sperm Chromatin Dispersion</i>
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPANX	<i>Sperm protein associated with nucleus in the X chromosome</i>

T

TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
Tbx	<i>T-Box</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid / Àcid tricloracètic</i>
TGS	Tampó d'electroforesi d'electroforesi (amb Tris, Glicina i SDS)
TOF	<i>Time Of Fly</i>
TP1	<i>Transition protein 1 / Proteïna de transició 1</i>
TP2	<i>Transition protein 2 / Proteïna de transició 2</i>
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP)-Nick End Labelling</i>

U

U	Unitats
UB	Universitat de Barcelona

V

v/v	volum/volum
-----	-------------

W

WHO	<i>World Health Organization / Organització Mundial de la Salut</i>
-----	---

Z

z	Càrrega
---	---------