

# Estratégia para a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da infertilidade masculina e para o desenvolvimento de contraceptivos não hormonais

.....

Margarida Fardilha<sup>1</sup>, Wenjuan Wu<sup>1</sup>, Catarina Mota<sup>1</sup>, Sara Fidalgo<sup>1</sup>, Rosália Sá<sup>1</sup>, Odete A. B. da Cruz e Silva<sup>2</sup>, Edgar F. da Cruz e Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Transdução de Sinais e <sup>2</sup>Laboratório de Neurociências

Centro de Biologia Celular, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal  
Correspondência: mardilha@bio.ua.pt

## Resumo

O espermatozóide e o óvulo interagem num processo denominado fecundação. Para ser capaz de fecundar o óvulo, o espermatozóide sofre um processo de maturação desde a sua formação nos tubos seminíferos, ao longo da passagem pelo epidídimo e no tracto genital feminino. A regulação da motilidade do esperma é um passo essencial no processo de maturação. É no percurso através do epidídimo que os espermatozóides adquirem motilidade.

A fosforilação reversível de proteínas é um dos mecanismos mais importantes envolvidos no controlo da motilidade do esperma. Diversos estudos atribuíram à proteína fosfatase 1 gama2 (PP1 $\gamma_2$ ) um papel vital no controlo da motilidade do esperma nos mamíferos. A PP1 $\gamma_2$  é uma proteína fosfatase específica para a desfosforilação de resíduos de serina e treonina, cuja especificidade e actividade são reguladas por ligação a outras subunidades proteicas. Estas subunidades reguladoras da PP1 $\gamma_2$  são alvos atractivos para uma terapêutica direccionada, uma vez que, se forem especificamente expressas nos espermatozóides, apenas influenciam a acção da PP1 $\gamma_2$  no esperma, não afectando outros mecanismos de fosforilação dependentes de outras fosfatases ou a ocorrerem noutras células ou noutros tecidos. Assim, dada a importância da identificação de novas subunidades reguladoras da PP1 $\gamma_2$  em testículo humano, com o objectivo, a longo prazo, de as utilizar como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos, para o tratamento da infertilidade e para o desenvolvimento de contraceptivos não-hormonais masculinos, procedeu-se ao rastreio de uma biblioteca de cDNA de testículo humano pelo Método Dois Híbrido de Levedura, utilizando a PP1 $\gamma_2$  como isco. Entre os 155 positivos detectados, identificaram-se não só proteínas previamente conhecidas, como reguladores da PP1, mas também várias novas proteínas. Assim, os resultados obtidos indicam que esta abordagem pode ser bastante produtiva para que no futuro possamos estudar as novas proteínas identificadas. Será interessante comparar a expressão destas

proteínas no esperma de homens férteis com pacientes inférteis, especialmente aqueles com parâmetros normais ou quase normais, excepto pela falta de motilidade do esperma.

**Palavras-chave:** fosforilação, infertilidade, contraceptivos masculinos.

## Abstract

The spermatozoon and the egg interact in a process termed fertilization. To be able to fertilize the egg, spermatozoa undergo a process known as maturation: from their production in the seminiferous tubules, through their passage along the epididymis and in the female genital tract. The regulation of sperm motility is a crucial step in the maturation process. It is during their passage through the epididymis that spermatozoa acquire motility.

Reversible protein phosphorylation is one of the most important mechanisms involved in the control of sperm motility. Several studies have attributed to protein phosphatase 1 gamma2 (PP1 $\gamma_2$ ) a crucial role in the control of mammalian sperm motility. PP1 $\gamma_2$  is a serine/threonine-specific phosphatase whose substrate specificity and activity are dependent on its interaction with other regulatory subunits. These regulatory subunits are potentially attractive targets for directed therapeutics, since if they are specifically expressed in sperm, they will not affect other phosphorylation mechanisms dependent on other phosphatases or occurring in other cells or tissues. Thus, given the importance of the identification of new human, testis-specific regulatory subunits of PP1 $\gamma_2$  with the long-term aim of using them as potential targets for new drugs to treat male infertility and to develop novel male contraceptives, a human testis cDNA library was screened by the Yeast Two Hybrid Method, with PP1 $\gamma_2$  as bait. Of the 155 positives obtained, several were proteins already known as PP1 regulators, while others were previously unknown new proteins. Thus, the results obtained proved the usefulness of this approach, and future work will focus on the new proteins identified. It will be interesting to investigate how the expression of such proteins compares in the sperm of normal fertile men and infertile patients, particularly those with normal or near normal sperm parameters but lacking motility.

**Key words:** Phosphorylation, infertility, male contraceptives.

## Introdução

Os mecanismos bioquímicos que estão na base da maturação dos espermatozoides e do desenvolvimento da motilidade suscitam, hoje em dia, um grande interesse no seio da comunidade científica de todo o mundo. Os espermatozoides de mamífero adquirem a capacidade de motilidade e fertilização na sua passagem ao longo do epidídimo, num processo denominado maturação. No decorrer deste percurso observam-se alterações nos níveis de cálcio, AMPcíclico e pH. Durante o seu trânsito pelo

epidídimo os espermatozoides sofrem também alterações na morfologia, na actividade enzimática e nas propriedades físicas e químicas da membrana plasmática<sup>1</sup>. É de salientar que estas alterações durante a passagem pelo epidídimo, bem como durante o seu trânsito pelo tracto genital feminino (capacitação e hiper-activação), ocorrem na ausência de actividade transcricional e traducional (i.e. sem haver síntese de novas proteínas), sendo, portanto, bastante provável o envolvimento de mecanismos pós-traducionais rápidos e reversíveis, como é o caso da fosforilação.



**Figura 1:** Representação esquemática do processo cíclico de fosforilação reversível de proteínas. Os sistemas de fosforilação proteica são compostos por três componentes principais: uma proteína cinase responsável pela transferência de um grupo fosfato do ATP para a proteína alvo (fosforilação), uma proteína fosfatase responsável pela hidrólise desse grupo fosfato da proteína alvo (desfosforilação), e a proteína alvo, o substrato, também denominada fosfo-proteína, cujas propriedades são alteradas em função do seu estado de fosforilação. A fosforilação de proteínas é o principal mecanismo de regulação metabólica das células eucariotas, estando envolvida no controlo de mecanismos tão distintos como a neurotransmissão e a motilidade dos espermatozoides.

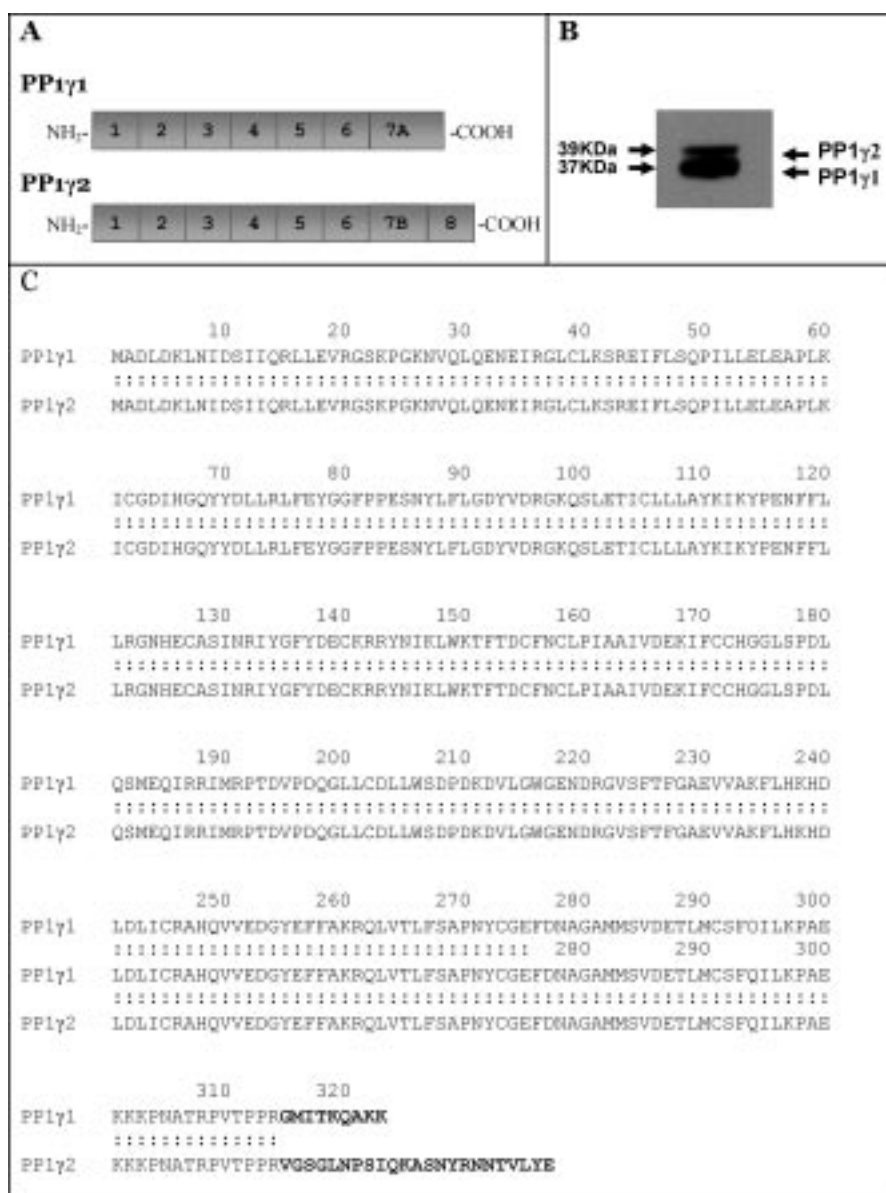
A fosforilação reversível de proteínas é um dos principais mecanismos de controlo que existe nas células eucariotas. Não é pois de admirar que muitas doenças estejam associadas à fosforilação anormal de proteínas-chave específicas (e.g. diabetes<sup>2</sup>, doença de Alzheimer<sup>3-6</sup>, etc.). Consequentemente, os diversos componentes dos sistemas de fosforilação de proteínas são, presentemente, alvos atractivos para o desenvolvimento de novas terapêuticas<sup>7</sup>.

A fosforilação de proteínas é um processo dinâmico, controlado pelas proteínas cinases e pelas proteínas fosfatases, através do qual uma multiplicidade de actividades celulares são reguladas (Fig. 1). Ao contrário das proteínas cinases, que pertencem todas a uma única família génica derivada de um gene ancestral comum, as proteínas fosfatases pertencem a várias famílias génicas não relacionadas. Na Tabela I estão descritas as famílias génicas das proteínas fosfatases, bem como as características utilizadas na sua classificação. As proteínas fosfatases, que este artigo trata, são as proteínas fosfatases específicas para a desfosforilação de serina e treonina, em particular as proteínas fosfa-

**Tabela I:** Classificação das proteína fosfatases

Família Génica	Proteína Fosfatase	Inibição por:		Actividade
		AO	I1, I2, DARPP-32	
PPP (Fosfoproteína fosfatases)	PP1	+	+	Desfosforilam preferencialmente a subunidade $\beta$ da fosforilase cinase
	PP2A	+	-	Desfosforilam preferencialmente a subunidade $\alpha$ da fosforilase cinase Actividade independente de catiões divalentes
	PP2B	+	-	Desfosforilam preferencialmente a subunidade $\alpha$ da fosforilase cinase Actividade estimulada pela calmodulina e dependente de cálcio
PPM (Fosfoproteína fosfatases dependentes de iões metálicos)	PP2C	-	-	Desfosforilam preferencialmente a subunidade $\alpha$ da fosforilase cinase Activadas por $Mg^{2+}$
PTP (Fosfatases de Tirosina)	Transmembranares	-	-	Diferentes domínios extracelulares
	Não transmembranares	-	-	Diferentes domínios não catalíticos
	Dupla especificidade	-	-	Capazes de desfosforilar serina, treonina e tirosina

AO: Ácido ocaideico, Inibidor 1 (I1), inibidor 2 (I2) e DARPP-32 são proteínas que foram identificadas e purificadas pela sua acção inibitória da actividade das proteína fosfatases tipo 1.



**Figura 2:** Comparação das duas isoformas de PP1 $\gamma$  produzidas por mecanismos de “splicing” alternativo.

A. Representação esquemática das duas isoformas da PP1 $\gamma$  expressas no testículo dos mamíferos por “splicing” alternativo. Os números e as linhas verticais representam os exões utilizados.

B. Análise por imunoblot das isoformas de PP1 $\gamma$  expressas no testículo humano utilizando um anticorpo que reconhece uma sequência comum a ambas. As duas bandas detectadas correspondem às isoformas PP1 $\gamma$ 1 e PP1 $\gamma$ 2 cujas massas moleculares estão indicadas.

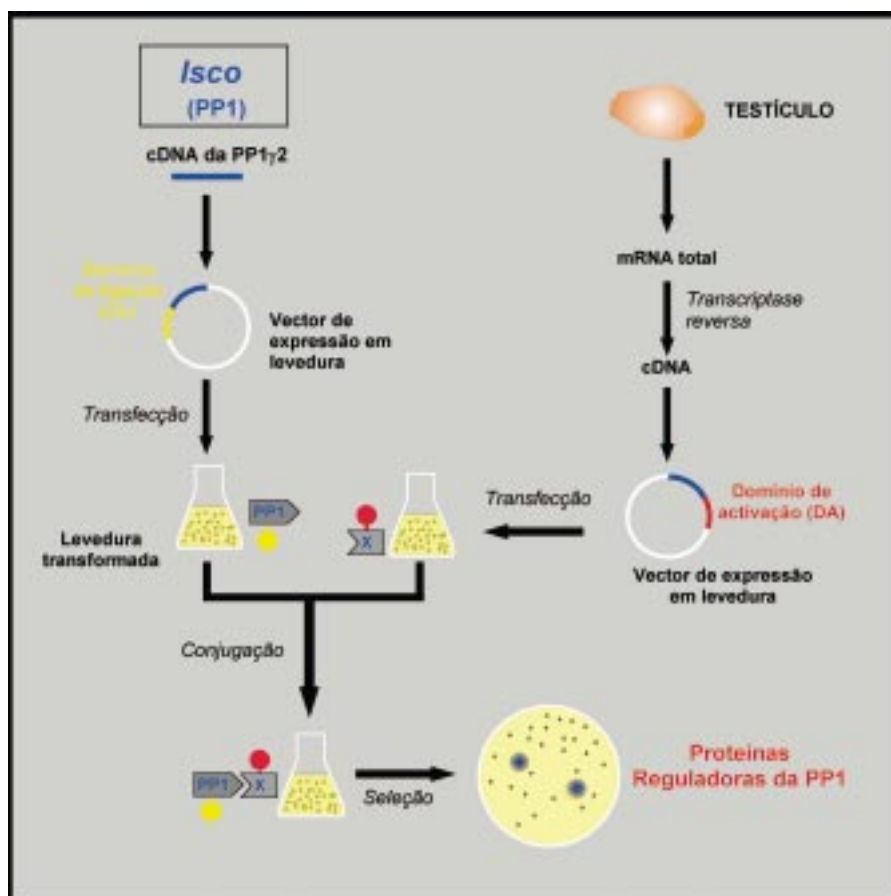
C. Alinhamento das sequências de aminoácidos da PP1 $\gamma$ 1 e da PP1 $\gamma$ 2. Os diferentes terminais carboxílicos resultantes da utilização de diferentes exões estão indicados a negrito.

tases do tipo 1 (PP1)<sup>8</sup>. No genoma humano existem três genes diferentes que dão origem às isoformas PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  e PP1 $\gamma$ . O gene que codifica a PP1 $\gamma$  pode produzir a PP1 $\gamma$ 1, ubíqua, e a PP1 $\gamma$ 2 específica de testículo<sup>9,11</sup>, através de mecanismos de “splice” alternativo (Fig. 2). Estas fosfatases são inibidas por uma variedade de toxinas naturais, como o ácido ocadeico (OA) e a caliculina A (CA), sendo a concentração inibitória característica para cada um dos diferentes tipos de fosfatase.

A PP1 foi descrita, pela primeira vez, em 1943 como a enzima responsável pela conversão da fosforilase a em fosforilase b<sup>12</sup> e as suas características enzimáticas foram amplamente estudadas em rela-

ção ao metabolismo do glicogénio<sup>13-17</sup>. No entanto, mais recentemente, verificou-se que a PP1 está envolvida numa grande diversidade de funções celulares para além do metabolismo do glicogénio, incluindo o ciclo celular, a contracção muscular, a morte celular programada, a aprendizagem e, entre outros<sup>18, 9</sup>, a memória. Resultados de Smith *et al.*<sup>20</sup> e Vijayaraghavan *et al.*<sup>1</sup> vieram demonstrar que a PP1 é também um importante regulador da motilidade do esperma em mamíferos, pois espermatozoides imóveis tratados com inibidores de fosfatases, como o AO e a CA, adquirem motilidade. Estudos posteriores confirmaram e alargaram estas observações, demonstrando a importância da PP1 e dos seus

**Figura 3:** Diagrama representativo do método de rastreio de bibliotecas de cDNA através do Sistema Dois Híbrido de Levedura. Os diplóides, provenientes da conjugação entre as duas leveduras previamente transformadas, são plaqueados em meio selectivo com X- $\alpha$ -Gal para detectar as proteínas de testículo humano (predadores) que interagem com a PP1 $\gamma_2$  (isco).



reguladores no processo de regulação da motilidade do esperma<sup>21-24</sup>. Noutro estudo, utilizando ratinhos, nos quais o gene PP1 $\gamma$  foi inactivado por “knockout”, ou seja, que não expressam nem a PP1 $\gamma_1$ , nem a PP1 $\gamma_2$ , demonstrou-se que este gene é essencial para a espermatogénese: os machos eram inférteis, enquanto que as fêmeas eram férteis<sup>25</sup>. Por conseguinte, diversos indícios indiciam a PP1 $\gamma_2$  como a principal fosfatase envolvida no controlo da motilidade do esperma.

A grande variedade de funções atribuídas à PP1 só é possível graças à formação de complexos específicos entre a subunidade catalítica da fosfatase e uma ou mais subunidades reguladoras<sup>7, 26</sup>. Estas subunidades reguladoras têm como principais funções modular a actividade e/ou levar a PP1 para um determinado local da célula, controlando, assim, a sua especificidade relativamente a um determinado substrato<sup>8</sup>. Deste modo, a mesma subunidade catalítica pode exercer diversas funções, consoante a subunidade reguladora a que se liga. Até à data, já foram identificadas mais de 50 subunidades reguladoras da PP1<sup>27</sup>, sendo muitas delas especificamente

expressas num determinado tecido ou célula ou num dado estágio de desenvolvimento.

Uma vez que, qualquer fármaco que actue directamente sobre as subunidades catalíticas da PP1 pode potencialmente afectar outros mecanismos regulados pela PP1 noutros tecidos, dada a elevada homologia entre as várias isoformas, o nosso objectivo, a longo prazo, é encontrar uma proteína reguladora da PP1 $\gamma_2$  (expressa especificamente no esperma) que possa ser um alvo terapêutico para o tratamento da infertilidade. Tal regulador poderia também levar ao desenvolvimento de novas abordagens anticoncepcionais masculinas. A identificação de uma proteína reguladora da PP1 $\gamma_2$  específica de testículo permitir-nos-ia actuar directamente no controlo da motilidade dos espermatozoides, sem afectar outros processos vitais.

Para encontrar reguladores da PP1 específicos de testículo recorreremos aos métodos da biologia molecular. Especificamente, o Sistema Dois Híbrido de Levedura (Fig. 3) foi utilizado para detectar interacções entre uma proteína de interesse (a PP1 $\gamma_2$ , neste caso) e uma biblioteca de cDNA de testículo, que

expressa a totalidade das proteínas de testículo humano<sup>28</sup>. Este método baseia-se no facto dos factores de transcrição de levedura possuírem dois domínios funcionais, um de ligação ao DNA (DL), que reconhece uma sequência específica no promotor de determinados genes, e um domínio de activação (DA), que recruta as proteínas necessárias na transcrição desse gene. Estes domínios podem ser separados por técnicas de DNA recombinante e ligados a outras proteínas, originando, assim, duas proteínas de fusão. Quando estas proteínas interagem, arrastam os dois domínios e a sua proximidade viabiliza a transcrição de genes que possuam no seu promotor uma sequência nucleotídica reconhecida pelo DL da proteína de fusão. Estes genes chamam-se genes repórter, pois permitem-nos distinguir as colónias de leveduras, em que ocorre a interacção entre as duas proteínas de fusão, pela cor das colónias ou pela capacidade de crescer num meio selectivo. O rastreio de uma biblioteca de cDNA de testículo humano, através desta metodologia, resultou na identificação de várias proteínas que são potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da infertilidade masculina e para o desenvolvimento de contraceptivos masculinos.

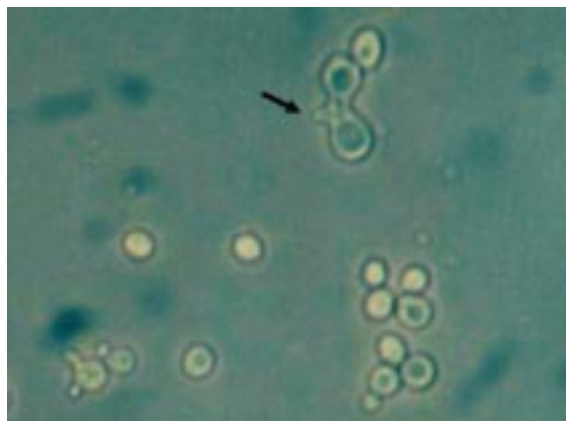
## Métodos

**Sistema Dois Híbrido de Levedura:** Para identificar proteínas reguladoras da PP1 utilizou-se o Sistema Dois Híbrido de Levedura<sup>28</sup> (Fig. 3). Assim, o cDNA da proteína PP1 $\gamma_2$ , o isco, foi clonado num vector que possui o DL do factor de transcrição GAL4, produzindo o plasmídeo recombinante pAS2-1-PP1 $\gamma_2$ , o qual foi, posteriormente, inserido numa estirpe de levedura (AH109) do tipo sexual mat a. A biblioteca de cDNA de testículo humano foi, por sua vez, clonada num vector de expressão com o DA e pré-transformada na estirpe Y187 de levedura (mat  $\alpha$ ). Para identificar proteínas de testículo humano com a capacidade de se ligarem à PP1 $\gamma_2$ , as duas estirpes de levedura foram conjugadas. A mistura da conjugação foi plaqueada em meio selectivo e as colónias resultantes foram, posteriormente, plaqueadas em meio selectivo com X- $\alpha$ -Gal, tornando azuis as colónias dos verdadeiros positivos. Por fim, os clones positivos obtidos foram identificados por sequenciação do respectivo DNA e comparação com uma base de dados de sequências de DNA, utilizando o algoritmo BLAST<sup>29</sup>.

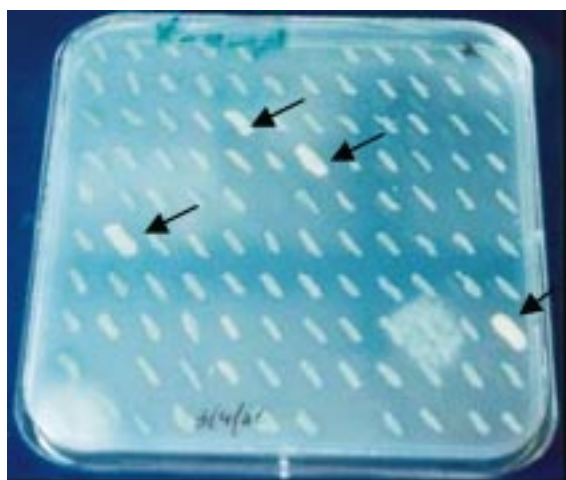
## Resultados e Discussão

De modo a identificar possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da infertilidade masculina ou para o desenvolvimento de contraceptivos masculinos não-hormonais, recorreu-se ao Sistema Dois Híbrido de Levedura<sup>28</sup>. Para tal, clonou-se o cDNA, que codifica a PP1 $\gamma_2$  num vector capaz de expressar uma proteína de fusão entre a PP1 $\gamma_2$  e o DL do factor de transcrição GAL4 de levedura, e introduziu-se na levedura AH109 (mat a) por transformação. Conjugou-se esta levedura, que expressa a proteína de fusão GAL4-DL-PP1 $\gamma_2$  com outra, de tipo sexual oposto, expressando proteínas de fusão entre o DA do factor de transcrição GAL4 e proteínas de uma biblioteca de cDNA de testículo humano (Fig. 3). A confirmação da conjugação fez-se através da visualização, ao microscópio, da mistura de conjugação das leveduras diplóides, com a sua forma característica de três lóbulos (Fig. 4). Em seguida, plaqueou-se a mistura de conjugação em meio selectivo e as colónias obtidas foram transferidas para meio selectivo contendo X- $\alpha$ -Gal. As colónias azuis neste meio são aquelas em que ocorreu uma interacção específica entre a PP1 $\gamma_2$  e uma proteína proveniente da biblioteca de testículo (Fig. 5). Assim, obtiveram-se 155 colónias positivas, que foram armazenadas para posterior análise. Os plasmídeos que codificam proteínas da biblioteca de cDNA de testículo foram recuperados da levedura por transformação em *Escherichia coli*. Após purificação e análise com enzimas de restrição, os correspondentes cDNAs foram analisados por sequenciação (Fig. 6). A comparação das sequências obtidas com o GenBank permitiu a sua identificação inequívoca. Assim, foi possível dividir os 155 positivos identificados em três classes: (1) proteínas previamente identificadas como reguladoras da PP1 (90 positivos); (2) proteínas previamente conhecidas, mas não em relação à PP1 (11 positivos); (3) proteínas previamente desconhecidas (54 positivos). Neste último caso, encontravam-se algumas proteínas nunca antes descritas em revistas científicas, nem mesmo presentes na base de dados como proteínas, mas sim apenas ao nível do DNA genómico. A Tabela II resume os resultados obtidos.

A proteína Nek2 destacou-se neste rastreio por ser o positivo mais abundante (66 clones positivos). A Nek2 é uma proteína cinase, anteriormente identi-



**Figura 4:** Fotografia obtida num microscópio óptico invertido (Leica DMIL) dos zigotos presentes na “mistura de conjugação”, com a forma típica de três lóbulos (40X). A seta aponta a gemulação da célula diplóide; os dois lóbulos são as células haplóides (parentais).



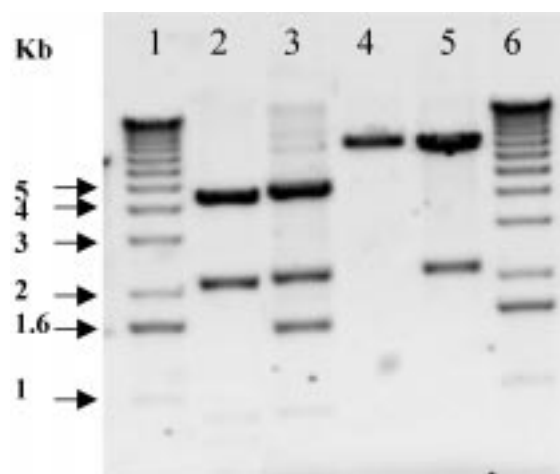
**Figura 5:** Teste de expressão do gene repórter MEL-1, que codifica a  $\alpha$ -galactosidase. Os verdadeiros positivos obtidos no Sistema Dois Híbrido de Levedura produzem colónias azuis, enquanto que os falsos positivos produzem colónias brancas (indicado pelas setas).

ficada como regulador da PP1<sup>30</sup>. Localiza-se nos centrossomas durante todo o ciclo celular<sup>31</sup> e regula a sua estrutura durante a transição G2/M. Sabe-se que a Nek2 interacciona com a PP1, que desfosforila a própria Nek2 e também outros substratos da Nek2<sup>30</sup>. Esta proteína tem uma expressão muito elevada em testículo de rato, a qual é dependente das várias etapas da espermatogénese<sup>32</sup>. É interessante verificar que a proteína mais abundante no conjunto dos positivos detectados com a proteína fosfatase PP1 $\gamma_2$  foi, precisamente, uma proteína cinase. O papel

exacto do complexo PP1 $\gamma_2$ -Nek2, na regulação do metabolismo do espermatozóide, necessita de ser cuidadosamente avaliado no futuro.

Entre as proteínas do segundo grupo há a destacar a RanBPM. A RanBPM é uma proteína de 90 kDa, inicialmente identificada como reguladora da polimerização dos microtúbulos<sup>33</sup>. Esta proteína possui um domínio SPRY, envolvido na interacção com outras proteínas, e dois motivos pouco caracterizados (LisH e CTLH), presentes em diversas proteínas envolvidas na regulação dinâmica dos microtúbulos. A RanBPM também tem elevada expressão em testículo e interage com o receptor de androgénio (na presença de ligando)<sup>34</sup>, podendo assim influenciar a resposta hormonal aos androgénios e/ou regular a formação do axonema.

Relativamente às proteínas designadas 1 e 2 na Tabela II, não se conhece actualmente as suas funções na célula, nem podemos inferir qualquer função da análise das suas sequências de aminoácidos, excepto que são reguladores da PP1 $\gamma_2$ , visto possuírem uma cópia da sequência consenso de ligação à PP1 (RVXF). Provavelmente, estão envolvidas no controlo da motilidade do esperma, sendo alvos bastante atractivos para potenciais futuras terapias anticoncepcionais ou para o tratamento da infertilidade masculina.



**Figura 6:** Análise do DNA plasmídico purificado de *Escherichia coli* com a enzima de restrição HindIII. Coluna 1, marcador de DNA (“1Kb Ladder”); Coluna 2, vector pAS2-1 (4.6+2.2+0.9Kb); Coluna 3, pAS-PP1 $\gamma_2$  (4.6+2.2+1.5+0.9+0.3Kb); Lane 4, vector pACT-2 utilizado para a biblioteca de cDNA (7.4+0.7Kb); Lane 5, pACT-2+cDNA da biblioteca [7.4+2.2 (0.7 do vector+cDNA da biblioteca)Kb].

**Tabela II:** Classificação dos clones positivos obtidos com a PP1 $\gamma_2$  como isco.

Classe	Número	Exemplos
Reguladores da PP1	90	Nek2 NIPP
Outras Proteínas Conhecidas	11	RANBPM DAPPER1
Novas Proteínas	54	Proteína 1 Proteína 2

Em conclusão, a metodologia acima descrita permitiu a identificação de um elevado número de proteínas expressas no testículo humano que ligam a PP1 $\gamma_2$ , assim, constituem potenciais reguladores do seu envolvimento no controlo da motilidade do esperma. As novas proteínas identificadas são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento da infertilidade masculina em pacientes, cujos espermatozoides aparentemente são, ao nível morfológico, normais, mas com motilidade subnormal ou ausente. Por outro lado, o seu potencial como alvos, para o desenvolvimento de novas terapias anticoncepcionais masculinas, também pode, futuramente, vir a ser explorado. A “Terapêutica de Transdução de Sinais”, baseada nos sistemas de fosforilação, pode vir a ser uma realidade clínica num futuro não muito distante. Vários projectos estão a ser desenvolvidos no nosso laboratório com o intuito de aprofundar o conhecimento acerca destas novas proteínas e também no estudo da sua relação com a PP1 $\gamma_2$ .

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projecto POCTI/CBO/39799/2001 e bolsa de doutoramento PRAXIS/BD/13658/97), com o apoio do Centro de Biologia Celular da Universidade de Aveiro.

## Bibliografia

- Vijayaraghavan, S., Stephens, D. T., Trautman, K., Smith, G. D., Khatra, B., da Cruz e Silva, E. F., & Greengard, P. (1996). Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3

- and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod*, 54, 709-718.
- Sridhar, R., Hanson-Painton, O., & Cooper, D. R. (2000) Protein kinases as therapeutic targets. *Pharm Res* 17, 1345-1353.
- Planel, E., Yasutake, K., Fujita, S. C., & Ishiguro, K. (2001). Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J Biol Chem*, 276, 34298-34306.
- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Delacourte, A., Vilain, J. P., & Buee, L. (2002) Modelling Alzheimer-specific abnormal Tau phosphorylation independently of GSK3beta and PKA kinase activities. *FEBS Lett*, 516, 151-155.
- da Cruz e Silva, E. F., da Cruz e Silva, O. A., Zaia, C. T., & Greengard, P. (1995). Inhibition of protein phosphatase 1 stimulates secretion of Alzheimer amyloid precursor protein. *Mol Med*, 1, 535-541.
- da Cruz e Silva, E. F., & da Cruz e Silva, O. (2003). A. Protein phosphorylation and APP metabolism. *Neurochem Res*, 28, 1553-1561.
- da Cruz e Silva, O. A. B., Fardilha, M., Henriques, A. G., Rebelo, S., Guerra e Paz, S., & da Cruz e Silva, E. F. (2003). Signal Transduction Therapeutics: a novel approach in Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* in press.
- Watanabe, T., da Cruz e Silva, E. F., Huang, H. B., Starkova, N., Kwon, Y. G., Horiuchi, A., Greengard, P., & Nairn, A. C. (2003). Preparation and characterization of recombinant protein phosphatase 1. *Methods Enzymol*, 366, 321-338.
- Kitagawa, Y., Sasaki, K., Shima, H., Shibuya, M., Sugimura, T., & Nagao, M. (1990). Protein phosphatases possibly involved in rat spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 230-235.
- Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T., & Nagao, M. (1990). Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 81, 1272-1280.
- da Cruz e Silva, E. F., Fox, C. A., Ouimet, C. C., Gustafson, E., Watson, S. J., & Greengard, P. (1995). Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci*, 15, 3375-3389.
- Cori, G., & Green. (1943). Crystalline muscle phosphorylase II. Prosthetic Group. *J Biol Chem*, 151, 31-38.
- Shenolikar, S., & Nairn, A. C. (1991). Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 23, 1-121.
- Bollen, M., & Stalmans, W. (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 27, 227-281.



15. Brautigan, D. L. (1994). Protein phosphatases. *Recent Prog Horm Res*, 49, 197-214.
16. Shenolikar, S. (1994). Protein serine/threonine phosphatases — new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol*, 10, 55-86.
17. Lee, E. Y. C. (1995). Studies of phosphorylase phosphatase:Protein phosphatase 1 - A personal perspective. *Zool Studies*, 34, 149-163.
18. Oliver, C. J., & Shenolikar, S. (1998). Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci*, 3, D961-972.
19. Amador, F. C., Henriques, A. G., da Cruz e Silva, O. A. B., & da Cruz e Silva, E. F. (2003). Monitoring protein phosphatase 1 isoform levels as a marker for cellular stress. *Neurotoxicology and Teratology*, in press.
20. Smith, G. D., Wolf, D. P., Trautman, K. C., da Cruz e Silva, E. F., Greengard, P., & Vijayaraghavan, S. (1996). Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol Reprod*, 54, 719-727.
21. Mishra, S., Somanath, P. R., Huang, Z., & Vijayaraghavan, S. (2003). Binding and inactivation of the germ cell-specific protein phosphatase PP1 $\gamma$ 2 by sds 22 during epididymal sperm maturation. *Biol Reprod*, 69, 1572-1579.
22. Smith, G. D., Wolf, D. P., Trautman, K. C., & Vijayaraghavan, S. (1999) Motility potential of macaque epididymal sperm: the role of protein phosphatase and glycogen synthase kinase-3 activities. *J Androl*, 20, 47-53.
23. Huang, Z., Khatra, B., Bollen, M., Carr, D. W., & Vijayaraghavan, S. (2002). Sperm PP1 $\gamma$ 2 is regulated by a homologue of the yeast protein phosphatase binding protein sds22. *Biol Reprod*, 67, 1936-1942.
24. Vijayaraghavan, S., Trautman, K. D., Goueli, S. A., & Carr, D. W. (1997). A tyrosine-phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and calcium. *Biol Reprod*, 56, 1450-1457.
25. Varmuza, S., Jurisicova, A., Okano, K., Hudson, J., Boekelheide, K., & Shipp, E. B. (1999). Spermiogenesis is impaired in mice bearing a targeted mutation in the protein phosphatase 1 $\gamma$  gene. *Dev Biol*, 205, 98-110.
26. Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, 58, 453-508.
27. Cohen, P. T. (2002). Protein phosphatase 1—targeted in many directions. *J Cell Sci*, 115, 241-256.
28. Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340, 245-246.
29. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
30. Helps, N. R., Luo, X., Barker, H. M., & Cohen, P. T. (2000). NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, 349, 509-518.
31. Fry, A. M., Meraldi, P., & Nigg, E. A. (1998). A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J*, 17, 470-481.
32. Tanaka, K., Parvinen, M., & Nigg, E. A. (1997). The in vivo expression pattern of mouse Nek2, a NIMA-related kinase, indicates a role in both mitosis and meiosis. *Exp Cell Res*, 237, 264-274.
33. Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M., & Nishimoto, T. (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol*, 143, 1041-1052.
34. Rao, M. A., Cheng, H., Quayle, A. N., Nishitani, H., Nelson, C. C., & Rennie, P. S. (2002). RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 277, 48020-48027.