

Artigos Originais

A importância do mecanismo de “splicing” alternativo para a identificação de novos alvos terapêuticos

Margarida Fardilha¹, PhD, Odete A. B. da Cruz e Silva², PhD, Edgar F. da Cruz e Silva¹, PhD

1. Laboratório de Transdução de Sinais

2. Laboratório de Neurociências, Centro de Biologia Celular, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

Correspondência: mfardilha@bio.ua.pt

Resumo

A motilidade progressiva dos espermatozóides é um factor essencial para a sua fertilidade. Ao nível molecular, este processo depende da fosforilação de proteínas ainda não identificadas, uma vez que o tratamento de espermatozóides imóveis com agentes moduladores da fosforilação proteica, incluindo inibidores específicos de proteínas fosfatases, induz a sua motilidade. Os nossos estudos anteriores indicam que a proteína fosfatase PP1 γ 2, uma isoforma da proteína fosfatase 1 produzida por “splicing” alternativo e grandemente enriquecida nos espermatozóides, provavelmente tem um papel importante na regulação da sua motilidade. A PP1 actua ligando-se a proteínas reguladoras que a levam para locais específicos da célula e regulam a sua actividade. Através do Sistema Dois Híbrido de Levedura iniciámos um projecto de identificação das proteínas reguladoras da PP1 γ 2 em testículo humano que poderão ser úteis para modular a motilidade dos espermatozóides e, assim, servir como alvos terapêuticos para o tratamento da infertilidade masculina e/ou para o desenvolvimento de novas estratégias de contraceção masculina. Várias das proteínas reguladoras identificadas são novas variantes, também produzidas por mecanismos de “splicing” alternativo, de proteínas previamente conhecidas. Neste artigo focamos a importância do “splicing” alternativo como mecanismo extraordinário de produção de complexidade proteica e para a identificação de alvos terapêuticos de enorme especificidade.

Palavras-chave: Esperma, infertilidade, contraceção, Nek2, PP1.

Abstract

Spermatozoa leave the testis incapable of progressive motility, which is only acquired during transit through the epididymis. At the molecular level, this process is dependent on the phosphorylation of proteins not yet identified, since treatment of non-motile sperm with modulators of protein phosphorylation, including protein phosphatase-specific inhibitors, induces motility. Our previous studies showed that PP1 γ 2,

a protein phosphatase 1 isoform produced by alternative splicing, highly enriched in sperm, has a major role in the regulation of sperm motility. Since PP1 acts via binding to regulatory proteins that target it to specific cellular locations and regulate its activity, we initiated a project to identify putative regulators of PP1 γ 2 in human testis that might serve as therapeutic targets to interfere with sperm motility and thus act on male infertility and contraception. Some of the protein regulators identified are also alternatively spliced variants of previously known proteins. In this paper we will address the importance of alternative splicing as an extraordinary mechanism to produce protein complexity and to identify therapeutic targets of great specificity.

Introdução

Depois de vários genomas terem sido completamente descritos, como o de *Caenorhabditis elegans*, um nemátode com pouco mais de 1000 células e 19,500 genes, ou o do milho, com aproximadamente 40,000 genes, pensou-se que o genoma humano consistiria em mais de 100,000 genes [1]. No entanto, o Projecto do Genoma Humano revelou, com alguma surpresa, que existiam pouco mais de 30,000 genes codificantes [2]. O genoma humano produz uma enorme variedade de proteínas (estima-se que serão mais de 100,000) a partir de um número relativamente reduzido

de genes através do mecanismo conhecido como “splicing” alternativo (SA), que consequentemente explica a discrepância entre as dimensões do genoma e do proteoma [3, 4].

Os genes dos mamíferos estão organizados numa estrutura exão-intrão com uma média de 8.7 exões por gene [5]. Após a transcrição, o pré-mRNA sofre “splicing” e remoção dos intrões, através dum grande complexo de proteínas e RNA designado por spliceossoma [6]. Este complexo reconhece sequências consenso, locais de “splice”, localizadas nas extremidades dos exões e intrões, e une os exões removendo os intrões (Fig. 1A).

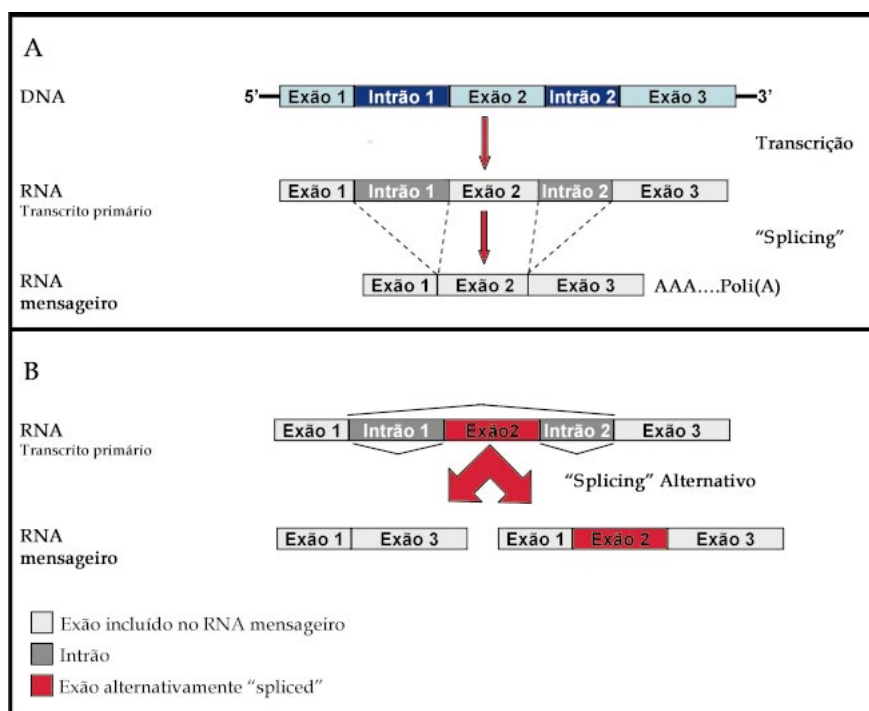
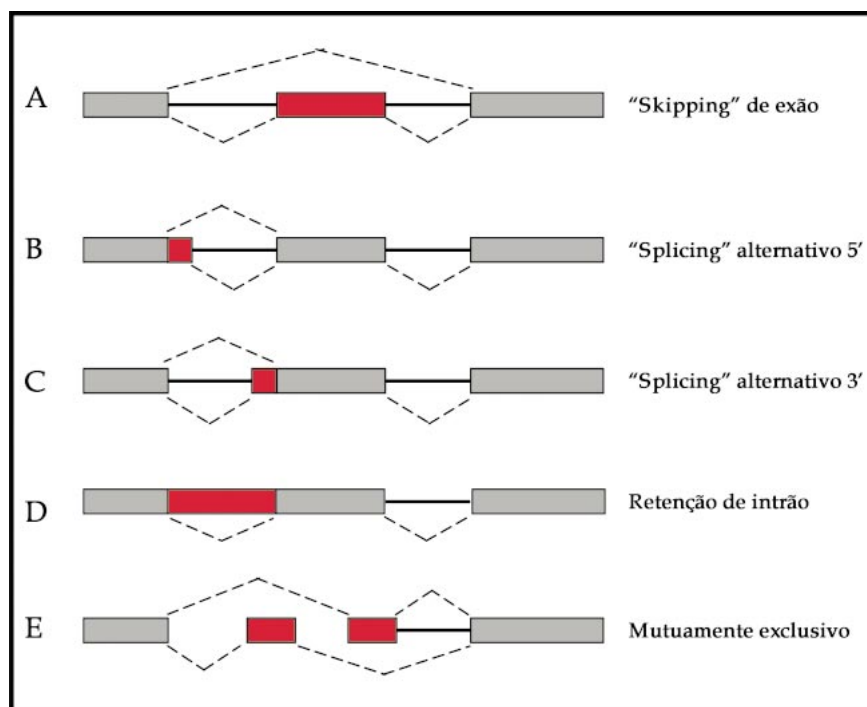


Figura 1: (A) Mecanismo clássico de expressão genética; um gene é transcrito numa cópia de cadeia única de RNA (transcrito primário) que é depois editado pela remoção de intrões (“splicing”) originando o RNA mensageiro que é traduzido numa proteína. (B) Mecanismo de “splicing” alternativo; o transcrito primário de um determinado gene pode ser editado de vários modos, por exemplo, um exão pode ser excluído do RNA mensageiro final ou incluído o que leva à produção de dois RNAs mensageiros diferentes que podem originar duas proteínas diferentes.

Figura 2: Principais tipos de "splicing" alternativo. Exões constitutivos estão desenhados a cinza e regiões que sofrem SA a vermelho. Intrões estão representados por linhas. A tracejado indicam-se os eventos de splicing.



Um gene pode originar várias proteínas funcionalmente diferentes [7, 8] porque há formas alternativas de remover os intrões de um determinado pré-mRNA ("splicing" alternativo ou SA), resultando em mais do que um mRNA maduro por gene (Fig. 1B). Existem cinco formas principais de SA (Fig. 2). O "skipping" ou saltar de exões (Fig. 2A) contribui para cerca de 38% dos eventos de SA conservados entre os genomas de humano e rato. Já o SA 5' e 3' (Fig. 2B e C) contribuem para 18% e 8% dos eventos de SA conservados, respectivamente. Por outro lado, a retenção de intrões (Fig. 2D) é responsável por menos de 3% do SA conservado entre os genomas de humano e rato. Por fim, os restantes 33% são resultado de mecanismos de SA mais complexos, que incluem SA mutuamente exclusivos (Fig. 2E), locais de iniciação de transcrição alternativos e múltiplos locais de poliadenilação [9]. O SA explica não só a diversidade entre organismos com um conjunto de genes semelhante, mas também permite que diferentes tipos de tecidos tenham diferentes funções com base nos mesmos genes, bastando que os editem de um modo diferente para produzir proteínas diferentes. Assim, a prevalência do SA aumenta com a complexidade de um organismo. Estima-se que mais de 60% dos genes humanos sofrem SA [3], enquanto que, por exemplo, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* nunca foi des-

critado o processo de SA [10]. Actualmente, começamos também a compreender como erros nos mecanismos de "splicing" podem levar a diversas patologias [11-14] e, por isso, como determinadas variantes de "splicing" podem ser úteis como marcadores no diagnóstico dessas disfunções. Por exemplo, a Disautonomia Familiar (ou Neuropatia Hereditária Sensorial e Autónoma, Tipo III) é uma doença neurodegenerativa recessiva que resulta de uma mutação num único nucleótido do gene *IKBKAP* (IkappaB kinase-associated protein) que leva ao seu SA no sistema nervoso. Isto provoca a diminuição da quantidade proteína *IKBKAP* normal, originando o desenvolvimento anormal do sistema nervoso que leva à morte de cerca de metade dos pacientes com esta doença antes dos 30 anos [15, 16]. Sabe-se hoje que cerca de 15% das mutações que originam doenças genéticas fazem-no afectando o "splicing" do RNA mensageiro [17]. As variantes normais duma proteína produzidas por "splicing" alternativo, podem ser específicas de um determinado órgão ou tipo celular, tornando-se alvos terapêuticos ideais para o desenvolvimento de novos fármacos que assim não afectam mecanismos semelhantes noutros tecidos que envolvem as outras variantes de "splicing" dessas proteínas.

O gene que codifica a proteína fosfatase 1 gama (*PP1 γ*) sofre SA para originar duas isoformas: a

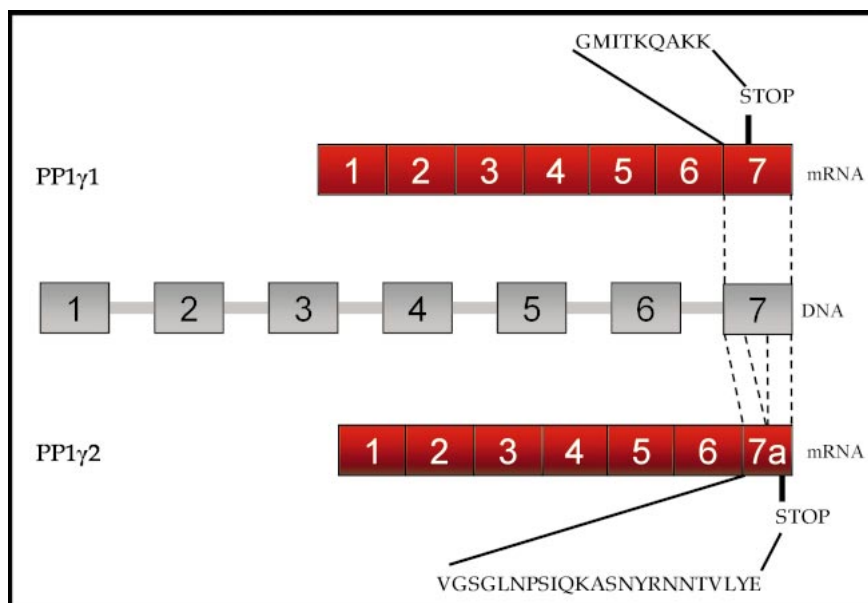


Figura 3: Representação diagramática da produção das variantes de “splicing” do gene da PP1γ (PP1γ1 e PP1γ2). Exões e intrões não estão desenhados à escala, e os exões estão numerados. A variante específica de testículo, PP1γ2, é produzida por “splicing” alternativo do exão 7. A sequência específica de aminoácidos no C-terminal de cada uma das variantes está indicada. STOP, indica a localização do códon stop.

ubíqua PP1γ1 e a PP1γ2 enriquecida no testículo dos mamíferos [18]. Estas duas proteínas diferem apenas nos respectivos terminais carboxílicos (Fig. 3). Assim, um fármaco desenvolvido para actuar sobre o C-terminal da PP1γ2 no testículo, é improvável que afecte outros órgãos. Dado que as fosfatases em geral e a PP1γ2 são enzimas multifuncionais envolvidas no controlo de variados processos intracelulares, e que a sua regulação é feita através da sua interacção com proteínas reguladoras, outra estratégia, possivelmente ainda mais eficiente, seria desenhar novos fármacos terapêuticos contra essas proteínas reguladoras. Estas proteínas reguladoras estão certamente envolvidas num menor número de acontecimentos celulares do que a própria fosfatase, sendo assim ainda mais específicas para essas funções.

Pensa-se que a PP1γ2 tem um papel importante na regulação da motilidade dos espermatozoides humanos [19, 20], dado que os espermatozoides imóveis tratados com inibidores específicos adquirem motilidade. Por outro lado, a PP1 actua sempre associada a outras proteínas, formando holoenzimas e adquirindo assim especificidade para as suas múltiplas funções. Recentemente, investigámos a natureza das proteínas reguladoras da PP1γ2 no testículo humano, algumas das quais podem estar envolvidas na regulação da motili-

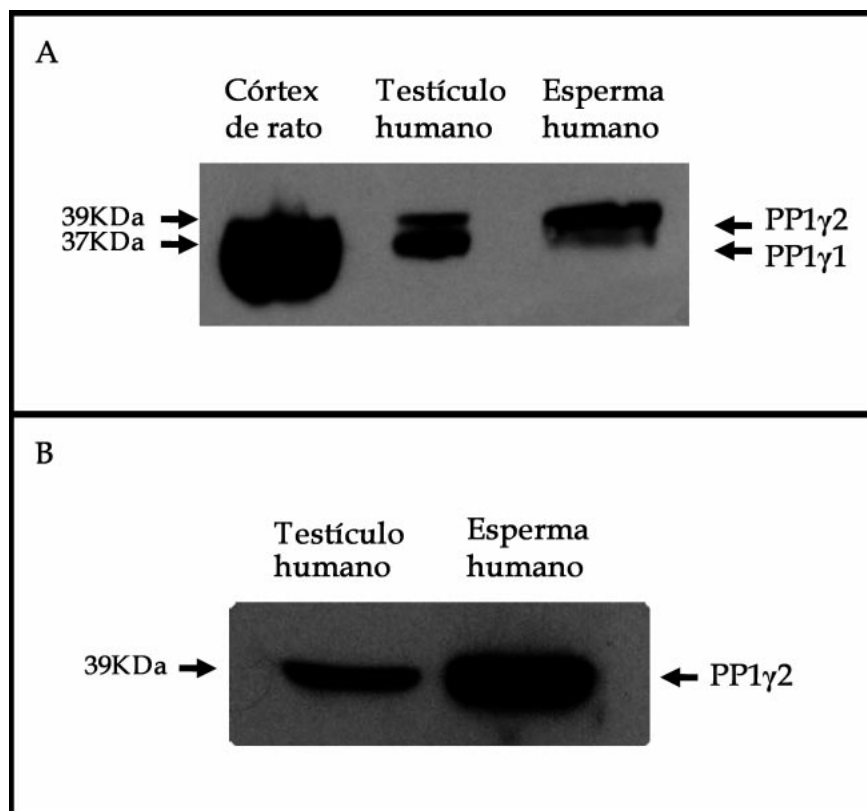
dade [21, 22]. Após a identificação de várias proteínas reguladoras da PP1γ2 em testículo humano, utilizando o Sistema Dois Híbrido de Levedura, constatou-se que muitas dessas proteínas eram elas próprias objecto de SA. Neste momento algumas estão a ser estudadas com o intuito de desenvolver, a longo prazo, estratégias terapêuticas que actuem especificamente nas variantes de SA unicamente expressas no testículo ou nos espermatozoides humanos. Deste modo, pretende-se utilizar os sistemas de sinalização celular da PP1γ2 como alvos específicos de uma terapia de transdução de sinais direccionada para interferir com a espermatogénese ou com a motilidade dos espermatozoides. Espera-se que novas abordagens biomoleculares deste tipo possam levar ao desenvolvimento de novos métodos de contracepção masculina ou ao tratamento de alguns tipos de infertilidade masculina.

Métodos

Imunodeteccção de proteínas

Os tecidos utilizados foram homogeneizados em 1% SDS, a concentração proteica foi determinada pelo método de BCA e, consoante o tecido e o anticorpo utilizados, uma quantidade adequada de proteína (indicada nas legendas das figuras) foi

Figura 4: (A) Expressão da PP1 γ 1 e da PP1 γ 2 em córtex de rato (25 μ g), testículo humano (200 μ g) e esperma humano (100 μ g). A detecção foi realizada com o anticorpo CBC3C que reconhece as duas isoformas pois estas só diferem numa pequena porção do C-terminal. (B) Expressão da PP1 γ 2 em testículo e esperma humanos (50 μ g). A detecção foi realizada com o anticorpo CBC502 específico para a PP1 γ 2.



separada por electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). De seguida, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose e a membrana foi depois incubada com o anticorpo anti-PP1 γ 1 (CBC3C) ou anti-PP1 γ 2 (CBC502), seguido de um anticorpo secundário conjugado com peroxidase, sendo a detecção efectuada por ECL (Amersham).

Detecção de PP1 γ 2 em espermatozoides por imunofluorescência

Espermatozoides humanos (500 μ l) ressuspendidos em 1XPBS, depois de lavados e centrifugados a 350g durante 7min, foram incubados em lamelas tratadas com poli-L-ornitina durante 15 minutos. De seguida, os espermatozoides foram fixados com 4% paraformaldeído, lavados com 1XPBS e permeabilizados com metanol durante 2min. Depois, foram incubados com anticorpo primário CBC502 diluído 1:250 em 3%BSA em PBS durante 1h à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi removido e após 3 lavagens com 1XPBS, o anticorpo secundário diluído 1:300 em 3%BSA em PBS foi incubado durante 1h. Depois de lavar 3 vezes com 1XPBS, as lamelas foram montadas numa lâmina com uma gota de Fluoro-

guard. Os espermatozoides foram visualizados num microscópio de epifluorescência Olympus.

Resultados

Realizou-se anteriormente um rastreio a uma biblioteca de cDNAs de testículo humano, para identificar proteínas reguladoras da PP1 γ 2 que potencialmente pudessem ser alvos para a regulação da motilidade dos espermatozoides. Os resultados obtidos poderão ter aplicação prática no tratamento da infertilidade masculina associada à baixa motilidade, ou mesmo ausência de motilidade, dos espermatozoides ou, no sentido oposto, para o desenvolvimento de um contraceptivo masculino que iniba por completo a motilidade dos espermatozoides, impedindo-os assim de alcançar o óvulo.

A PP1 γ 2 é uma proteína fosfatase específica para serina e treonina enriquecida no testículo, ao contrário da PP1 γ 1 que é ubíqua. Curiosamente, a PP1 γ 2 é a forma predominante nos espermatozoides, sendo a sua expressão relativamente mais elevada do que em testículo (Fig. 4). Por imunocitoquímica, localizámos a PP1 γ 2 em espermatozoides humanos utilizando o anticorpo primário

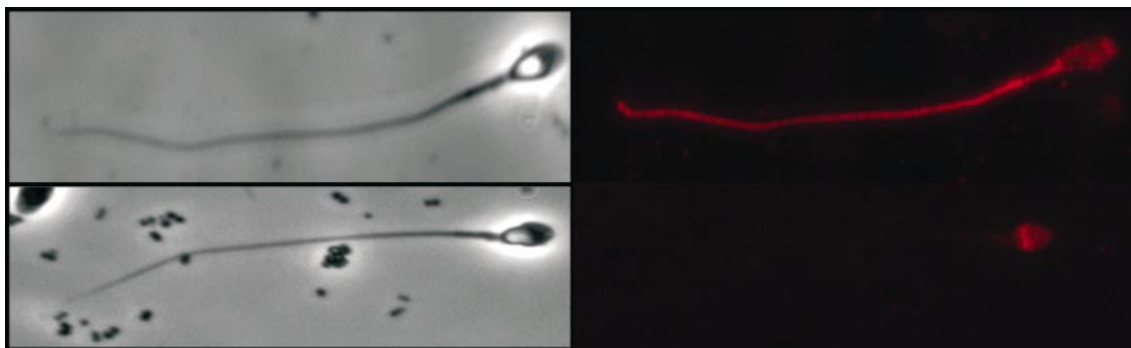


Figura 5: Imunolocalização da PP1 γ 2 em espermatozoides humanos. A figura da esquerda mostra dois espermatozoides humanos em contraste de fase (60X). À direita estão os mesmos espermatozoides marcados com o anticorpo específico anti-PP1 γ 2 (CBC502). Na figura mostram-se duas células diferentes para melhor exemplificar os locais onde a PP1 γ 2 está presente uma vez que a cauda e a cabeça do espermatozóide estão em planos diferentes; na célula do painel superior a PP1 γ 2 está presente na cauda e na célula do painel inferior na zona equatorial da cabeça.

anti-PP1 γ 2 (CBC502) e um anticorpo secundário fluorescente. A PP1 γ 2 está presente na cauda e também na cabeça do espermatozóide, em especial na zona equatorial que é a área que contacta com o óvulo aquando da fecundação (Fig. 5). A sua localização sugere que a PP1 γ 2 pode estar não só envolvida na regulação da motilidade, mas possivelmente também na fecundação.

Do rastreio da biblioteca de cDNAs de testículo humano com a PP1 γ 2 resultou a identificação de 28 proteínas que se ligam à PP1 γ 2, e por isso possíveis reguladoras da motilidade dos espermatozoides. Várias destas proteínas são novas variantes, produzidas por “splicing” alternativo, de proteínas já conhecidas. Um exemplo é a proteína Nek2C [21-23], uma nova variante da proteína cinase Nek2, que é produzida por SA 3’ de um pré-mRNA que também produz a proteína originalmente identificada como Nek2A [24]. A Nek2A é uma proteína cinase que regula a estrutura dos centrosomas durante o ciclo celular [25], especificamente durante a transição G2/M. Sabe-se que a PP1 desfosforila a Nek2A assim como alguns dos seus substratos [24].

No rastreio efectuado obtiveram-se 71 clones positivos para a Nek2, 65 dos quais codificavam a Nek2A e 6 a Nek2C. Obtivemos vários clones independentes para ambas as isoformas, fragmentos de cDNA com diferentes tamanhos, o que indicia que esta nova variante de “splicing” não é simplesmente um artefacto da biblioteca. Através da sequenciação completa dos clones verificou-se que a nova isoforma, Nek2C, tem 24 nucleótidos a menos que a isoforma já conhecida, Nek2A, correspondendo à ausência de 8 aminoácidos (Fig.

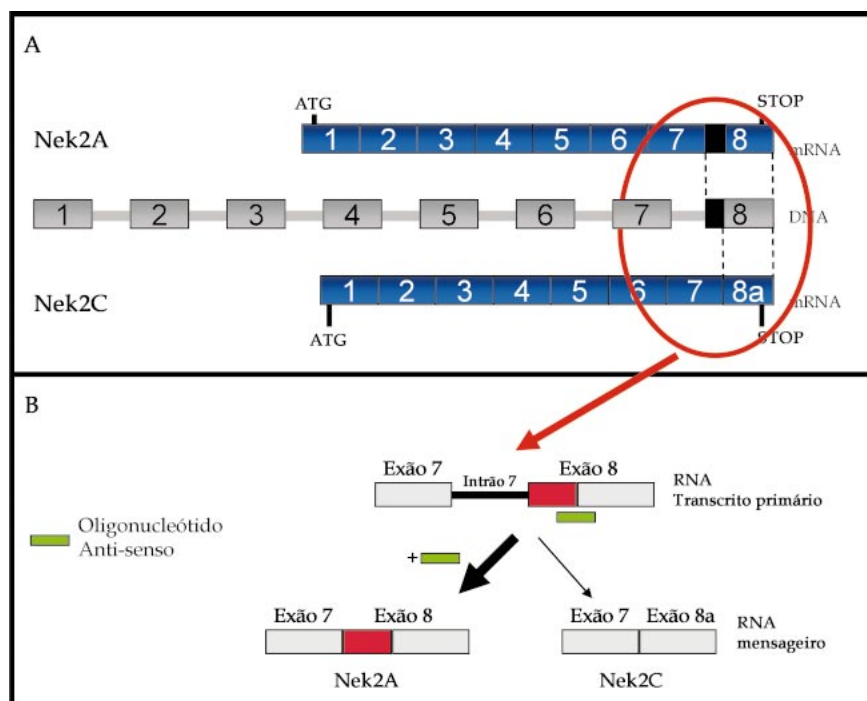
6A). Ambas possuem o motivo consenso de ligação à PP1 (RVHF), presente na grande maioria das proteínas que se ligam à PP1. Como consequência, a Nek2C possui um sinal de localização nuclear activo que não existe na Nek2A. Assim, a localização celular de uma proteína pode ser controlada pelo mecanismo de SA [23]. O gene da Nek2A está localizado no cromossoma 1 [26]. Alinhando o cDNA da Nek2A com o cromossoma 1 é possível identificar os exões e intrões (Fig. 6A). A Nek2A é codificada por 8 exões distribuídos ao longo de 13Kb, e o “splice” alternativo da Nek2C ocorre no exão 8 [22].

Discussão

A importância do SA como mecanismo de produção de diversidade proteica é evidente pelo crescente número de genes identificados que são objecto de SA, bem como do cada vez maior número de investigadores envolvidos no seu estudo. Esta investigação, apesar de ainda estar numa fase embrionária, aponta num futuro próximo para aplicações terapêuticas quer em doenças hereditárias quer nas adquiridas, como o cancro. Um exemplo descrito em 2003 consiste em induzir o “splice” de um exão que normalmente seria passado. Usou-se este método em células humanas em cultura para corrigir defeitos de “splicing” em versões mutadas do gene BRCA1, implicado no cancro da mama, e no gene SMN2, que causa atrofia muscular espinal [27].

Várias evidências atribuem um papel importante à PP1 na regulação da mitose. A PP1 está presente em múltiplas estruturas mitóticas como cro-

Figura 6: (A) Mecanismo de "slicing" alternativo da Nek2. Os exões e intrões não estão desenhados à escala, e os exões estão numerados. (B) Possível uso de oligonucleótidos anti-senso para alterar a expressão genética. Desenhando um oligonucleótido específico para o local de "splicing" (barra verde) poder-se-ia tentar favorecer a formação do RNA mensageiro da Nek2A uma vez que o local de 'splice' da Nek2C fica mascarado, aumentando assim o rácio Nek2A/Nek2C.



mossomas, fuso e centrossomas. Muitas das alterações que ocorrem durante o ciclo do centrossoma devem-se a fosforilação proteica [28], sendo uma das proteínas cinase envolvidas a Nek2A, relacionada com a separação dos centrossomas. A Nek2A está associada aos centríolos através da ligação a uma outra proteína, C-Nap1 [29], também relacionada com a separação dos centrossomas e que é fosforilada pelo complexo Nek2-PP1. Além da Nek2A e da Nek2B [26], identificados em linfócitos primários, nenhuma outra isoforma da Nek2 tinha sido descrita até muito recentemente. Neste trabalho, descrevemos a identificação de uma variante de "splice" da Nek2 em testículo humano, a que chamamos Nek2C (AY863109), e reforçamos a importância do SA. A expressão da Nek2A em testículo de rato é muito elevada e dependente das várias etapas da espermatogénese [30]. A ocorrência de SA em testículo foi já amplamente demonstrada [31], não sendo talvez inesperada a identificação de um novo "splice" da Nek2 neste órgão. Como já referido acima, a nova variante tem menos 24 nucleótidos, o que corresponde a menos 8 aminoácidos (ELLNLPSS) que podem ter um papel importante na regulação da PP1. Esta nova isoforma da Nek2, a Nek2C, pode ter um papel importante na regulação específica da PP1 γ 2 em testículo. No entanto, outras experiências necessitam ainda de ser realizadas para perceber o significado

biológico deste novo "splice" em testículo. De qualquer modo, a Nek2C, sendo específica de testículo, é potencialmente um alvo bastante atractivo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de infertilidade ou para o desenvolvimento de um contraceptivo oral masculino, não-hormonal. Por exemplo, poder-se-ia, através do controlo do mecanismo de SA do gene da Nek2 favorecer uma ou outra isoforma, através de técnicas de oligonucleótidos anti-senso (Fig. 6B). Ao contrário da técnica de RNA de interferência [32] ou outras que destinam o RNA para a destruição, a técnica dos oligonucleótidos anti-senso permite actuar sobre o SA mudando o rácio das variantes de "splicing" que ocorrem naturalmente, modulando assim a expressão do RNA. Por exemplo, o antigénio de membrana específico da próstata (PSM) tem uma isoforma curta e outra longa (PSM e PSM') produzidas por uso alternativo de locais de 'splice' 3' no exão 3. A razão PSM/PSM' é 150 vezes maior no cancro da próstata do que em tecidos normais. Este rácio pode ser usado como marcador do aparecimento e progressão deste tipo de cancro [33]. Apesar de não haver evidências de que a PSM' cause o cancro da próstata, trabalhos recentes sugerem a sua aplicabilidade como alvo terapêutico [34, 35]. No caso presente, seria interessante avaliar se alterações no rácio Nek2A/Nek2C teriam alguma influência na espermatogé-

nese e na motilidade dos espermatozóides. Esta técnica já foi utilizada para restaurar a produção de hemoglobina funcional em células humanas progenitoras do sangue de pacientes com talassemia em que um local de splice 5' aberrante leva à produção de hemoglobina mutante. Mascaramento a mutação com oligonucleótidos anti-senso que se ligam especificamente àquela região do RNA foi possível restaurar o local de "splicing" [36].

Esta abordagem é facilitada pelo facto dos oligonucleótidos anti-senso já estarem aprovados para o tratamento de pacientes. Vitravene foi a primeira destas drogas a ser usada para o tratamento da retinite provocada por citomegalovirus [37], actuando na diminuição da expressão do gene causador da doença. Hoje, o grande desafio é utilizar oligonucleótidos anti-senso para manipular as vias de SA.

Agradecimentos

Este projecto foi apoiado pelo Centro de Biologia Celular da Universidade de Aveiro, e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através dos projectos POCI/SAL-OBS/57394/2004 e REEQ/1023/BIO/2005. MF é recipiente de uma bolsa de pós-doutoramento (SFRH/BPD/16132/2004).

Bibliografia

- Pennisi E. Human Genome Project. And the gene number is...? *Science* 2000; 288 (5469): 1146-7.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409 (6822): 860-921.
- Modrek B, and Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genet* 2002; 30: 13-19.
- Woodley L, and Valcarcel J. Regulation of alternative pré-mRNA splicing. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2002; 1: 226-27.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420 (6915): 520-62.
- Will CL, Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13 (3): 290-301.
- Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 2001; 17 (2): 100-7.
- Rogers J, Wall R. A mechanism for RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci US A* 1980; 77 (4): 1877-9.
- Sugnet CW, Kent WJ, Ares M, Jr., Haussler D. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput* 2004: 66-77.
- Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS. Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res* 1999; 9 (12): 1288-93.
- Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 2002; 30 (1): 13-9.
- Stoilov P, Meshorer E, Gencheva M, Glick D, Soreq H, Stamm S. Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases. *DNA Cell Biol* 2002; 21 (11): 803-18.
- Hastings ML, Krainer AR. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13 (3): 302-9.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002; 18 (3): 123-7.
- Axelrod FB. Familial dysautonomia. *Muscle Nerve* 2004; 29 (3): 352-63.
- Carmel I, Tal S, Vig I, Ast G. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. *Rna* 2004; 10 (5): 828-40.
- Ast G. The alternative genome. *Sci Am* 2005; 292 (4): 40-7.
- da Cruz e Silva EF, Fox CA, Ouimet CC, Gustafson E, Watson SJ, Greengard P. Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci* 1995; 15 (5 Pt 1): 3375-89.
- Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, da Cruz e Silva EF, Greengard P, Vijayaraghavan S. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol Reprod* 1996; 54 (3): 719-27.
- Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, da Cruz e Silva EF, et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod* 1996; 54 (3): 709-18.
- Fardilha M, Wu W, Mota C, Fidalgo S, Sá R, da Cruz e Silva OAB, et al. Estratégia para a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da infertilidade masculina e para o desenvolvimento de contraceptivos não hormonais. *Acta Urol Port* 2004; 21 (2): 17-25.
- Fardilha M, Wu W, Sá R, Fidalgo S, Sousa C, Mota C, et al. Alternatively spliced protein variants as potential therapeutic targets for male infertility and contraception. *Annals New York Acad Sci* 2004; in press.
- Wu W, Baxter JE, Wattam SL, Hayward DG, Fardilha M, Knebel A, et al. Alternative splicing controls nuclear translocation of the cell cycle-regulated Nek2 kinase. *J Biol Chem* 2007; 282 (36): 26431-40.
- Helps NR, Luo X, Barker HM, Cohen PT. NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is comple-

- xed to protein phosphatase 1. *Biochem J* 2000; 349 (Pt 2): 509-18.
25. Fry AM, Meraldi P, Nigg EA. A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J* 1998; 17 (2): 470-81.
 26. Hames RS, Fry AM. Alternative splice variants of the human centrosome kinase Nek2 exhibit distinct patterns of expression in mitosis. *Biochem J* 2002; 361 (Pt 1): 77-85.
 27. Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 2003; 10 (2): 120-5.
 28. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2 (1): 21-32.
 29. Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* 1998; 141 (7): 1563-74.
 30. Tanaka K, Parvinen M, Nigg EA. The in vivo expression pattern of mouse Nek2, a NIMA-related kinase, indicates a role in both mitosis and meiosis. *Exp Cell Res* 1997; 237 (2): 264-74.
 31. Venables JP. Alternative splicing in the testes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12 (5): 615-19.
 32. Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6 (6): 829-34.
 33. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res* 1997; 57 (12): 2321-4.
 34. Tasch J, Gong M, Sadelain M, Heston WD. A unique folate hydrolase, prostate-specific membrane antigen (PSMA): a target for immunotherapy? *Crit Rev Immunol* 2001; 21 (1-3): 249-61.
 35. Stamey TA, Warrington JA, Caldwell MC, Chen Z, Fan Z, Mahadevappa M, et al. Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2001; 166 (6): 2171-7.
 36. Suwanmanee T, Sierakowska H, Fucharoen S, Kole R. Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with beta-thalassemia/HbE disorder. *Mol Ther* 2002; 6 (6): 718-26.
 37. Crooke ST. Vitravene - another piece in the mosaic. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998; 8 (4): vii-viii.