

Identificação de Alvos Terapêuticos e de Diagnóstico Através do *Yeast Two Hybrid System*: A Biologia Molecular na Medicina



Identification of Therapeutic and Diagnostic Targets Through *Yeast Two Hybrid System*: Molecular Biology in Medicine

Maria João FREITAS, Luís KORRODI-GREGÓRIO, Sara ESTEVES, Margarida FARDILHA
Acta Med Port 2012 Nov-Dec;25(6):427-432

RESUMO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da biologia molecular tem impulsionado a medicina, principalmente na identificação de novos alvos terapêuticos e de diagnóstico. Nas células são as proteínas as principais intervenientes responsáveis pelo funcionamento de todos os processos celulares, desde a síntese de novas moléculas de DNA, à formação de RNA e de novas proteínas, ao transporte de todos os componentes celulares bem como da composição estrutural da própria célula. Também são as proteínas um dos componentes mais relevantes das vias de sinalização entre as células. Estudos apontam para que, normalmente, as proteínas não funcionem sozinhas mas em complexos. Daí a importância de estudar as interações entre proteínas e, por outro lado, encontrar compostos que interfiram com esses complexos para tratamentos farmacológicos. Já existem alguns fármacos com estas características. A tricostatina A, um inibidor duma diacetilase de histonas (DH), atua no complexo Proteína Fosfatase 1-DH, sendo um bom alvo na terapia anti-cancerígena.

Em 1989, de um modo revolucionário para a época, Fields e Songs desenvolveram o *Yeast Two Hybrid system* (YTH). Este método baseia-se na genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para detetar interações entre proteínas. Desde a sua descoberta sofreu várias modificações que permitiram a sua aplicação à investigação translacional. Por exemplo, esta técnica permite fazer um rastreio em larga escala para determinar que droga pode interferir com uma determinada interação proteica. Por outro lado, pode também utilizar-se para se determinar que proteínas num determinado tecido (por exemplo, cérebro ou testículo) interagem com a nossa proteína de interesse. Deste modo é possível desvendar funções de novas proteínas, vias de sinalização e funcionamento de tecidos. A grande quantidade de informação produzida por esta abordagem é de eleição para a identificação e validação de alvos de diagnóstico, terapêuticos e mesmo desenvolvimento de novos fármacos.

Esta revisão tem como intuito elucidar o funcionamento do *Yeast Two Hybrid system* e a sua contribuição para a identificação de novos tratamentos farmacológicos.

ABSTRACT

In the last decades, molecular biology development was driven medicine, mainly in identification of novel therapeutic and diagnostics targets. In cells, proteins are the main responsible for the functioning of all cellular processes, from DNA synthesis to RNA and protein production, transport of cellular components and structural composition of the cell. Proteins are also an important component of signaling pathways between cells. Studies show that proteins normally do not function as singular units but as protein complexes. Understand protein interactions and discover compounds that interfere with such protein complexes are important to develop new pharmacologic treatments. There are already some drugs with such characteristics. Trichostatin A, a histone diacetylase, acts in Phosphatase protein 1 – Histone diacetylase complex, being a good target for anti-cancer therapy.

In 1989, in a revolutionary way, Fields and Songs developed the *Yeast Two Hybrid system* (YTH). This method is based in the genetic properties of *Saccharomyces cerevisiae* and allows the detection of protein interactions in vivo. Since its development it suffered a few modifications that allowed its application in translational medicine. For example, this technique allows a high throughput screening to assess if a drug can interfere with a protein interaction. In the other hand, YTH can be used to ascertain which proteins interact with a protein of interest in a specific tissue (for example, brain or testis). Thus it is possible to unveil protein functions, signaling pathways and tissue functions. The great amount of data produced with YTH allows the identification and validation of diagnostic and therapeutic targets and also the development of new drugs.

This review has the purpose to clarify the YTH system function and its contribution in identification of new pharmacologic treatments.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o avanço na investigação clínica tem sido notável, com várias áreas da ciência (incluindo a biologia molecular, bioquímica e biomedicina) a trabalharem em conjunto para a identificação de novos alvos terapêuticos e meios de diagnóstico com o intuito de melhorar a intervenção médica. A maior parte da investigação tem-se centrado em proteínas, já que estas são a base funcional de todas as células. A constituição proteica celular é essencial para o correto funcionamento de processos como a transcrição proteica e transdução de sinais. Contudo, as

proteínas raramente exercem as suas funções como uma unidade singular, mas sim em complexos multiproteicos.^{1,2} Atualmente, após uma era de *genómica* intensa, a identificação de interações proteicas, tornou-se crucial para a biomedicina moderna, sendo essencial tanto na determinação de funções de proteínas, como de complexos proteicos.^{2,3} Além disso, a identificação exhaustiva de interações proteicas tornou-se crucial na compreensão da fisiopatologia de certas doenças, assim como essencial para explorar o potencial terapêutico das interações identificadas.^{4, 5} Alte-

M.J.F., L.K.G., S.E.: Laboratório de Transdução de Sinais. Centro de Biologia Celular. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro. Aveiro. Portugal.

M.F.: Laboratório de Transdução de Sinais. Centro de Biologia Celular. Departamento de Biologia & Secção Autónoma de Ciências da Saúde. Universidade de Aveiro. Portugal.

Recebido: 27 de Março de 2012 - Aceite: 23 de Outubro de 2012 | Copyright © Ordem dos Médicos 2012

rações na formação de complexos proteicos específicos, por parte de um fármaco, prevêem-se que seja o futuro da indústria farmacêutica.^{2,5}

Tradicionalmente, a descoberta de novos fármacos foca-se num pequeno número de moléculas, como por exemplo os receptores acoplados à proteína G e proteínas cinase. Estas moléculas, apesar de estarem celular e enzimaticamente bem caracterizadas, podem tornar-se inespecíficas.⁵ Por exemplo, em pacientes com doença cardiovascular e asma é desaconselhado o uso de β -bloqueantes em concentrações elevadas devido à probabilidade de exacerbação dos episódios de asma. Isto deve-se à baixa especificidade do fármaco, que se liga a ambas isoformas do recetor beta adrenérgico, β_1 e β_2 .⁶⁻⁸ Este exemplo demonstra a importância de direcionar a terapia farmacológica para alvos mais específicos de modo a diminuir os efeitos secundários.

Técnicas que permitem o mapeamento de interações proteicas em larga escala tornaram-se cruciais, não só na investigação básica mas também na investigação biomédica e farmacêutica.^{1,5,9} Atualmente, a ferramenta mais utilizada na deteção de interações proteicas e de interactivas completos é o Yeast two hybrid (YTH, do inglês).¹⁰ O conceito do YTH foi desenvolvido por Fields e Songs nos finais da década de 80¹¹ e rapidamente se tornou um marco da biologia molecular. Foi a primeira técnica que permitiu a deteção de interações proteicas num sistema *in vivo*. A simplicidade da ideia por detrás do princípio do YTH baseia-se em duas características do sistema de transcrição dos eucariotas e no sistema genético da *Saccharomyces cerevisiae*. As grandes vantagens do YTH são o facto de ser teoricamente simples de implementar por investigadores experientes na área da biologia molecular, passível de automatização e mais acessível que algumas alternativas bioquímicas, para além de produzir informação em larga escala.^{5,10,12-14}

Este artigo tem como objectivo rever o funcionamento do YTH, as suas aplicações na biologia molecular (criação de redes proteicas) e aplicações na medicina, mais especificamente, na identificação de novos alvos terapêuticos e de diagnóstico.

Princípio do Yeast Two Hybrid System

Antes do desenvolvimento do YTH as ferramentas disponíveis para a identificação e caracterização de interações proteicas eram limitadas a métodos bioquímicos, como por exemplo co-immunoprecipitação. Estas ferramentas necessitam de grandes quantidade de proteína purificada, o que pode ser difícil de obter, e produzem dados limitados na determinação de interações proteicas.¹³

O YTH explora as características dos fatores de transcrição eucariotas e a genética da levedura *S. cerevisiae*. Nos eucariotas, os fatores de transcrição são compostos por dois domínios funcionalmente distintos, o domínio de ligação ao ADN e o domínio de ativação. A transcrição de um gene só ocorre quando os dois domínios estão próximos e se ligam ao promotor, não sendo necessário que

estejam ligados no mesmo polipeptídeo. Inspirados por estas duas características, Fields e Songs, propuseram uma ideia aparentemente simples para a deteção de interações proteicas. O princípio básico é fundir cada uma das proteínas cuja interação se pretende estudar, X e Y, ao domínio de ligação ao ADN e ao domínio de ativação de um fator de transcrição, respectivamente. Gal4 é o fator de transcrição mais frequentemente usado na levedura. A presença de galactose no meio de crescimento é o estímulo para ativação do fator de transcrição Gal4. Se as proteínas X e Y interagirem, Gal4 torna-se funcional, o que leva ao recrutamento da RNA polimerase II para a região promotora do gene da beta galactosidase. Como consequência a enzima beta galactosidase é expressa e a galactose degradada. Por sua vez, a galactose degrada na presença de X-Gal, produz um substrato colorido (azul) identificado, assim, uma interação proteica. Se não ocorrer interação proteica, Gal4 não se torna funcional, mesmo na presença de galactose, e a transcrição do gene da beta galactosidase não ocorre.^{2,11,15-17} A grande vantagem do YTH é o facto de ser possível realizar um rastreio em larga escala de uma biblioteca de expressão (genes codificantes de um conjunto de proteínas), com o objectivo de identificar várias interações proteicas de uma proteína em particular. Neste caso uma proteína específica, isco, é rastreada contra todas as proteínas expressas num tipo de célula, tecido, órgão, ou organismo específico.^{2,15,17,18} Na Fig. 1 está ilustrado o rastreio de uma proteína de interesse contra uma biblioteca de expressão específica.

Atualmente, apesar da utilidade do YTH, existem algumas limitações que podem afetar os resultados. Um dos grandes desafios ainda a ser ultrapassado no YTH é a possibilidade de ocorrência de falsos positivos e falsos negativos.

Falsos negativos são interações que ocorrem no ambiente natural das proteínas mas que passam despercebidas no rastreio. Podem surgir devido a uma incorreta conformação da proteína de fusão ou por incapacidade de serem transportadas para núcleo (onde ocorre a ativação da transcrição).² O facto da *S. cerevisiae* não ser capaz de realizar algumas modificações pós-traducionais essenciais para a interação, como por exemplo fosforilações no resíduo aminoacil de tirosina, também contribui para o número de falsos negativos.¹⁵ Porém, atualmente existem técnicas que permitem contornar algumas destas limitações do YTH. Para compensar a ausência de modificações pós-traducionais, co-expressão de modificadores, como por exemplo tirosina cinases, podem ser usados para estudar vias de transdução de sinal.^{12,16,17}

Por outro lado, falsos positivos são interações que ocorrem apenas no contexto do YTH e são fisiologicamente irrelevantes. A maior fonte de falsos positivos deve-se à elevada expressão proteica na levedura que leva a interações forçadas e a proteínas que ativam a expressão do gene repórter por si só.^{2,15,18} O último problema pode ser eliminado através do uso de vários genes repórter com promotores diferentes.^{19,20} Outro factor que contribui para os falsos po-

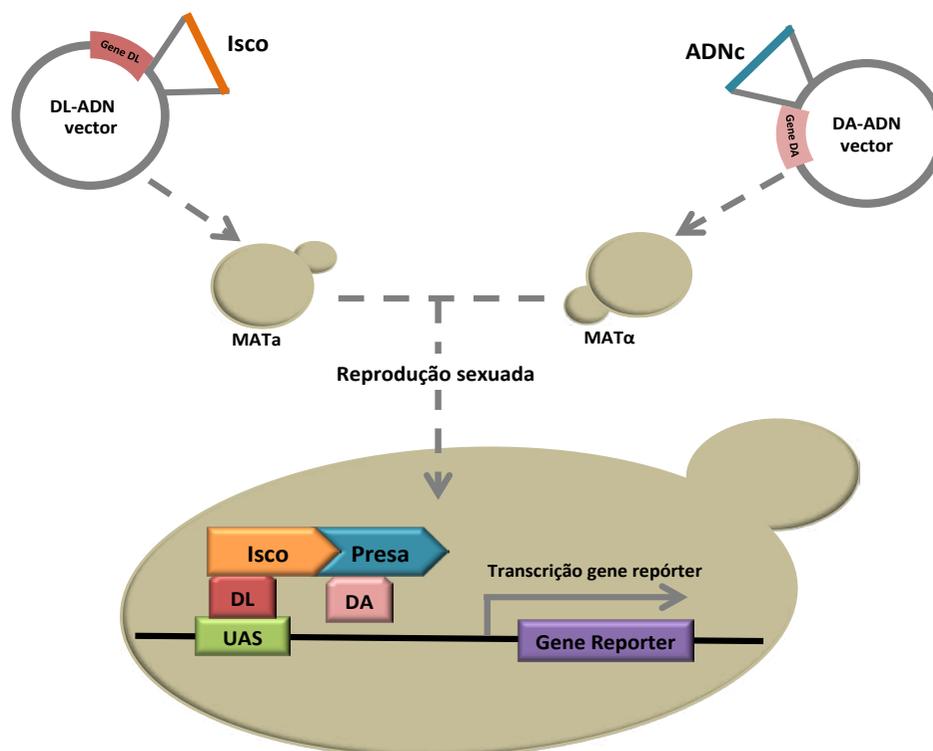


Fig. 1 - Representação esquemática do Yeast Two Hybrid System.

Uma proteína conhecida, isco, é introduzida num vector que contém o gene para o domínio de ligação (DL) ao ADN do fator de transcrição. De seguida, o vector é transformado numa estirpe de levedura específica. Paralelamente, uma biblioteca de ADN complementares de um tecido ou organismo específico, presa, é introduzido num vector que contém o domínio de ativação (DA) do fator de transcrição e transformado numa estirpe de levedura capaz de reproduzir-se sexuadamente com a estirpe do vector que contém o isco. Após a reprodução sexual, qualquer presa que interage com o isco leva à reconstituição do fator de transcrição e consequentemente à transcrição de um gene repórter. Assim, as proteínas que interagem com o isco são identificadas.

sitivos é o facto de num ambiente fisiológico, as proteínas nem sempre serem expressas no mesmo compartimento subcelular ou no mesmo estágio de desenvolvimento celular. Assim sendo, para confirmar a interação entre proteínas, a combinação de dois ou mais métodos deve ser sempre encorajada,^{2,3,15,21} sendo para isso usados métodos bioquímicos, como por exemplo co-imunoprecipitação, e/ou métodos bioinformáticos.

Aplicações do Yeast Two Hybrid System: redes proteicas e bases de dados.

A contribuição do YTH para a biologia molecular e biomedicina está refletida nas inúmeras redes proteicas criadas a partir de dados obtidos por YTH. *Helicobacter pylori*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Plasmodium falciparum* são alguns dos organismos em que o YTH foi usado para desvendar redes de interações proteicas.^{5,21-26} Mais interessante ainda é o uso do YTH para desvendar o interactoma humano. Já foram realizados alguns rastreios sub-genómicos (genoma parcial) com o objectivo de explorar a inter-conetividade proteica humana.^{10,27} No estudo realizado por Rual, et al., foram rastreadas aproximadamente 7000 proteínas resultando em aproximadamente 2800 interações, sendo que

300 eram novas interações associadas a patologias.^{5,10} No trabalho de Stelzl, foram caracterizados dois novos fatores que afetam a via de sinalização Wnt, envolvida na embriogénese e carcinogénese, demonstrando a importância do YTH na identificação de novas proteínas com potenciais papéis em patologias.²⁷ Bases de dados de interações proteicas disponíveis, como IntAct e MINT refletem também a importância do YTH, sendo que aproximadamente metade das interações presentes nestas bases de dados foram identificadas por este método.²⁸

Em Portugal, o YTH já é uma ferramenta de investigação usada há alguns anos.^{29,30} Atualmente, o laboratório de Transdução de Sinais do Centro de Biologia Celular da Universidade de Aveiro desenvolve trabalho com o objectivo de identificar o interactoma de duas proteínas no testículo envolvidas na aquisição de mobilidade do espermatozoide, a PPP1 e a TCTEX1D4.^{30,31} Nas neurociências, o interactoma da PPP1 em cérebro também está a ser alvo de investigação.²⁹

Yeast Two Hybrid System: desvendando a complexidade do espermatozoide

A versatilidade da aplicação do YTH permite que seja usado na identificação de novos alvos terapêuticos em

diversas patologias, como por exemplo infertilidade masculina. Atualmente em Portugal a taxa de infertilidade em casais em idade reprodutora é de aproximadamente 15%. Apesar de não existirem dados concretos, fatores masculinos, como mobilidade reduzida dos espermatozoides, aparenta ser uma das razões predominantes (30%).^{32,33} O espermatozoide é uma célula altamente especializada que tem como objectivo percorrer o sistema reprodutor feminino e fertilizar o ócito. Curiosamente, no espermatozoide, alterações da expressão genética não são responsáveis pela aquisição de características funcionais, como por exemplo, mobilidade, já que são virtualmente desprovidos de transcrição. Assim é possível afirmar que as modificações funcionais que o espermatozoide sofre ao longo da sua maturação no epidídimo são resultado de alterações no interactoma, ou seja, alterações de complexos proteicos, ativação de proteínas e inibição de outras.³⁴

O primeiro passo para a compreensão do funcionamento do espermatozoide é a determinação do proteoma e do interactoma desta célula, sendo o YTH o método de eleição para tal. Alguns esforços têm sido feitos nesse sentido, nomeadamente com o trabalho de Fardilha, et al.^{30,31} Contudo ainda existem muitas mais proteínas para serem identificadas, particularmente em espermatozoides normais versus espermatozoides disfuncionais. A identificação de proteínas específicas do espermatozoide e, conseqüentemente, complexos proteicos únicos (normal ou disfuncional) são ótimos candidatos para intervenção farmacológica e diagnóstico de diversas patologias, como por exemplo astenozoospermia.^{32, 35} Um bom exemplo da importância da aplicação do YTH na identificação de novos alvos terapêuticos é a fosfo proteína fosfatase 1 (PPP1 do inglês *phospho protein phosphatase 1*). Esta proteína tem apenas 4 iso-

formas para desempenhar inúmeras funções em diversos tecidos, demonstrando que o mecanismo de controlo da atividade catalítica da PPP1 reside nas proteínas com que interage. Foi demonstrado por Smith, et al. e Vijayaraghavan, et al. que uma isoforma específica de espermatozoide, a PPP1CC2, tem um papel preponderante na motilidade do espermatozoide, já que a atividade desta fosfatase é maior em espermatozoides imóveis, quando comparada com espermatozoides móveis.^{36,37} Globalmente já foram identificadas inúmeras interações proteicas para a PPP1 usando o YTH, sendo que quatro são específicas do espermatozoide, tornando estes complexos proteicos excelentes alvos terapêuticos e de diagnóstico. O facto da intervenção farmacológica, a este nível, ser específica para o espermatozoide, e não interferir com a produção dos mesmos, nem com a síntese hormonal, reduzindo assim os riscos de efeitos secundários, torna este modelo atrativo para o desenvolvimento de alvos farmacológicos para a infertilidade masculina ou para o desenvolvimento de contraceptivos masculinos seguros. Tendo em conta que, atualmente, as únicas opções de contraceção masculina são a vasectomia e o preservativo, o potencial mercado para um novo contraceptivo masculino a nível mundial é enorme, estando envolvidos milhões de euros.³² Atualmente, na vertente clínica, o diagnóstico de infertilidade masculina baseia-se em testes básicos como concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides,³⁸ excluindo fatores funcionais, e assim levando a que muitos casos de infertilidade masculina sejam classificados como idiopáticos. O diagnóstico focado em características funcionais, como por exemplo, complexos proteicos essenciais na aquisição de mobilidade dos espermatozoides (PPP1CC2/I2-L/GSK-3; PPP1CC2/PPP1R11; entre outros) podem ser parte da solução para um

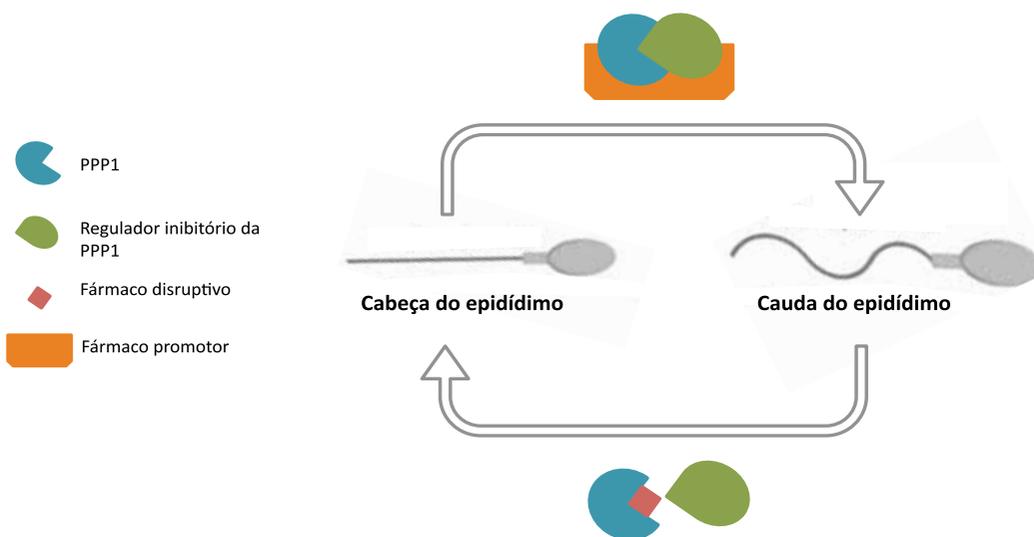


Fig. 2 - Modelo para interação farmacológica com base em complexos proteicos da PPP1 e seus reguladores.

Teoricamente ao interferir com complexos proteicos da PPP1, é possível controlar a mobilidade dos espermatozoides. Se a interação da PPP1 com os seus inibidores é promovida, o espermatozoide está móvel. Na situação inversa, quando a interação da PPP1 e seus inibidores é impedida o espermatozoide é imóvel. Assim, os complexos proteicos são proeminentes alvos terapêuticos para a infertilidade masculina e/ou contraceção masculina.

diagnóstico mais objectivo e preciso de infertilidade masculina.³² A intervenção farmacológica com base em complexos proteicos da PPP1 e seus reguladores, maioritariamente inibidores, seria no sentido de interferir com esses complexos de modo a favorecer ou impedir determinadas interações proteicas. No caso de impedir a interação proteica entre a PPP1 e seus inibidores estaríamos perante um tratamento para a infertilidade masculina. No caso contrário, o espermatozoide ficaria imóvel e estaríamos perante um novo contraceptivo masculino. Na Fig. 2 está ilustrado o modelo de intervenção farmacológica com base em complexos proteicos da PPP1 e seus inibidores.

Futuro

As redes proteicas são cada vez mais essenciais para a compreensão de sistemas celulares complexos, como por exemplo vias de sinalização. Conhecimento das interações proteicas são a chave para a compreensão de processos fisiológicos e principalmente de patologias, permitindo assim uma intervenção específica. Apesar de até à data o conhecimento adquirido sobre interações proteicas ter sido notório, ainda existe um longo caminho a percorrer, já que a identificação e análise de todas as interações proteicas está longe de estar completa e compreendida.³⁹ É esperado que existam aproximadamente 250 000 interações no proteoma humano.⁵ O YTH é um método de eleição para, no futuro, ser possível construir o interactoma humano.^{2,5} O

YTH cada vez mais terá um papel preponderante na compreensão da fisiopatologia de certas doenças, como por exemplo, infertilidade masculina³² e doenças neurológicas²⁹ e permitirá identificar novos alvos terapêuticos.

Com a identificação de interações proteicas, quer por YTH, quer por métodos complementares, como imunoprecipitação acoplada a espectroscopia de massa, as possibilidades de intervenção farmacológica são vastas. Contudo, até ao momento, apenas um pequeno número de fármacos capazes de interferir complexos proteicos foram identificados.⁵ Ainda assim, dois complexos da PPP1 estão a ser alvos de ensaios clínicos, PPP1-GADD34 e PPP1-DH6: o primeiro (salubrinal) inibe a replicação do vírus Herpes simplex e o segundo (tricotatina A) tem ação em terapia anticancerígena, no cancro da próstata e em glioblastoma.^{40,41} Assim, o futuro parece promissor para fármacos que atuam via complexos proteicos formados por PPP1 e seus reguladores.⁴²

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Petschnigg J, Snider J, Stagljar I. Interactive proteomics research technologies: recent applications and advances. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22:50-8.
- Suter B, Kittanakom S, Stagljar I. Two-hybrid technologies in proteomics research. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19:31-323.
- Auerbach D, Thaminy S, Hottiger MO, Stagljar I. The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. *Proteomics.* 2002;2:611-23.
- Lentze N, Auerbach D. The yeast two-hybrid system and its role in drug discovery. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12:05-515.
- Ruffner H, Bauer A, Bouwmeester T. Human protein-protein interaction networks and the value for drug discovery. *Drug Discov Today.* 2007;12:709-16.
- Gomperts B, Kramer I, Tatham P. *Signal Transduction. 2.ition.* New York: Elsevier; 2009.
- Sanfiorenzo C, Pipet A. Facteurs déclenchants : médicaments]. *Rev Mal Respir.* 1;28(8):1059-70.
- Talbert RL, Wells B, Dipiro J, Schwinghammer T, Dipiro C. *Pharmacotherapy Handbook edition.* New York: McGraw Hill Medical; 2008.
- Charbonnier S, Gallego O, Gavin AC. The social network of a cell: recent advances in interactome mapping. *Biotechnol Annu Rev.* 2008;14:1-28.
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature.* 2005;437:1173-8.
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 1989;340:245-6.
- Ratushny V, Golemis E. Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system. *Biotechniques.* 200;44(5):655-662.
- Topcu Z, Borden KL. The yeast two-hybrid system and its pharmaceutical significance. *Pharms.* 2000;17(9):1049-55.
- Young KH. Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biol Reprod.* 1998;58:302-11.
- Hamdi A, Colas P. Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery. *Trends Pharmacol Sc.* 2012;33:109-118.
- Keegan K, Cooper JA. Use of the two hybrid system to detect the association of the protein-tyrosine-phosphatase, SHPTP2, with another SH2-containing protein, Grb7. *Oncogene.* 1996;12:1537-44.
- Osborne MA, Dalton S, Kochan JP. The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactiotechnology (N Y). 1995;13:1474-8.
- Von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, et al. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature.* 2002;417:399-403.
- Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.* 1993;14(6):920-4.
- Serebriiskii IG, Golemis EA. Two-hybrid system and false positives. Approaches to detection and elimination. *Methods Mol Biol.* 2001;177:123-34.
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2000;403:623-7.
- Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, et al. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2003;302:1727-36.
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings Natl Acad Sc of the USA.* 2001;98:4569-74.
- Lacount DJ, Vignali M, Chettier R, Phansalkar A, Bell R, Hesselberth JR, et al. A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2005;438:103-7.
- Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, et al. A

- map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*. 2004;303:540-3.
26. Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2001;409:211-5
 27. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*. 2005;122(6):957-968.
 28. Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci*. 2009;10:2763-88.
 29. Esteves SL, Domingues SC, Da Cruz E, Silva OA, Fa Da Cruz Ee Silva EF Silva EF. Protein phosphatase 1alpha interacting proteins in the human brain. *OMICS*. 2012;16:3-17.
 30. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, Vintem AP, Domingues SC, Rebelo S, et al. Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(10):1403-15.
 31. Korrodi-Gregório L. Characterization of PP1 Interacting proteins in ale reproduction [(PhD Thesis)]. Aveiro: Universidade de Aveiro; 2012.
 32. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, Pelech S, Da Cruz uz e Silva EF, Da Cruz E Silva EF. Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(8):466-77.
 33. Isaacs JC. The patient voice in infertility. *AWHONN Lifelines*. 2005;9(5):363-4.
 34. Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl* 2011;13(1):88-96.
 35. Barratt CL. The human sperm proteome: the potential for new biomarkers of male fertility and a transformation in our understanding of the spermatozoon as a machine. *Hum Reprod* 2008;23(6):1240-1.
 36. Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, Da Cruz Ee Silva EF, Greengard P, Vijayaraghavan S. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol Reprod*. 1996;54(3):719-727.
 37. Vijayaraghavan S, Stephens DT, Tratman K, Smith GD, Khatra B, Da Cruz Ee 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):709-718.
 38. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of semen. 5th ed. Geneva: WHO; 5th edition 2012.
 39. Hart GT, Ramani AK, Marcotte EM. How complete are current yeast and human protein-protein interaction networks? *Genome Biol*. 2006;7(11):120.
 40. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, et al. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects from ER stress. *Science*. 2005;307(5711):935-9.
 41. Chen CS, Weng SC, Tseng PH, Lin HP. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38879-87.
 42. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-gregorio L, Da Cruz Ee Silva OA, Da Cruz Ee Silva EF. The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interaction with the head domain of the sperm. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17(33):3996-4017.