

**Lucimar Teodoro Ferreira**

**Sinais de tráfego envolvidos no  
endereçamento do Transportador  
Vesicular de Acetilcolina (VAChT)**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular  
Belo Horizonte  
Abril de 2006**

**Lucimar Teodoro Ferreira**

**Sinais de tráfego envolvidos no  
endereçamento do Transportador  
Vesicular de Acetilcolina (VACHT)**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Máximo Prado

Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Ferreira Prado

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores, Marco Antônio Prado e Vânia Prado, pela confiança, discussões e inúmeros conselhos que contribuíram muito para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Professor Marcus Vinícius Gomez, do laboratório de Neurofarmacologia, pelo laboratório tão completo, além da sua presença constante e extremamente agradável.

Aos professores Marco Aurélio Romano-Silva, Luiz Armando Cunha de Marco, Wolfanga Boson, Cristina Guatimosim e Helton Reis por propiciar um agradável ambiente de trabalho.

Aos meus amigos Magda da Silva Santos e José Barbosa Júnior, por tudo que me ensinaram durante nossa convivência e acima de tudo, pela amizade.

As minhas eternas amigas Ana Cristina do Nascimento Pinheiro e Janice Henriques da Silva, por todos os momentos que passamos juntas e por todo o incentivo e conselhos nos momentos mais difíceis.

As minhas amigas, também eternas, Cristina Martins e Silva, Fabíola Ribeiro, Fabiana Caetano, Grace Schenatto Pereira, Luciene Bruno Vieira, Melissa Monteiro Guimarães e Regina, pelas inúmeras contribuições e sobretudo pela amizade.

A querida Caroline Batista, por ter me suportado nos momentos de maior estresse, e pela amizade.

Aos meus amigos queridos do laboratório de Neurofarmacologia, Adriane, Allan, Bernardo, Bráulio Marcone, Bruno Rezende, Bruno Pinheiro, Célio de Castro, Daniela Valadão, Fernando Caetano, Iaci, Juliara Henriques, Livia Paulinelli, Paulo, Raphael Rabelo e Renan Pedra pelos momentos agradáveis no laboratório.

Aos meus amigos do laboratório de Neurobiologia Molecular, Diane, Danuza, Diogo, Rodrigo, Cíntia pela amizade.

Aos meus pais, Clara e João, por terem me apoiado e incentivado em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais “emprestados” Dalila e Lício, por todo o carinho e suporte, indispensáveis para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amados, Lenício e Andrezinho, pelo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência.

# ÍNDICE

Lista de Figuras e Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
<b>I – INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
I.1 Gênese de vesículas sinápticas	03
I.2 Proteínas de vesícula sináptica	05
1.2.1- Proteínas de tráfego envolvidas na exo e endocitose de vesículas Sinápticas e na reciclagem	05
1.2.2- Proteínas envolvidas com a captação e armazenamento dos neurotransmissores	07
I.3 Exocitose de vesículas sinápticas	07
I.4 Endocitose e reciclagem de vesículas sinápticas	08
1.4.1- Endocitose de vesículas sinápticas	08
1.4.1.1- Seleção de proteínas a serem endocitadas	11
1.4.2- Reciclagem de vesículas sinápticas	12
I.5 Tráfego de membrana	14
1.5.1- Tráfego dependente de clatrina	15
1.5.2- Tráfego ao nível do retículo endoplasmático	16
1.5.3- Proteínas envolvidas no tráfego de membrana	17
1.5.4- A participação de lipídeos no tráfego de membrana	18
I.6 Estrutura e função do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT)	18
I.7 Tráfego, endocitose e localização do VACHT	19
I.8 Linhagem celular SN56 como modelo para o estudo de tráfego celular em células colinérgicas	24
<b>II - OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
II.1 Objetivo geral	27

II.2	Objetivos específicos	27
<b>III –</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
III.1	Construções utilizadas	29
III.2	Cultura de células	34
III.3	Transfecção	35
III.4	Imunofluorescência	36
III.5	Marcação com transferrina	37
III.6	Aquisição de imagens	37
III.7	Análises de Co-localização	38
III.8	Extrato protéico bacteriano	38
III.9	Extrato protéico de córtex de rato	39
III.10	Ensaio "Pull Down"	39
III.11	Western blot	40
III.12	Duplo híbrido em leveduras	40
III.13	Co-imunoprecipitação	42
III.14	Biotinilação de proteínas de superfície celular	43
<b>IV –</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
IV.1	GFP-VACHT colocaliza-se com VAMP2 em organelas tipo vesículas sinápticas	45
IV.2	Os aminoácidos 481-490 da região C-terminal parecem conter os sinais relevantes para o tráfego do VACHT	49
IV.3	Os aminoácidos ácidos próximos ao motivo baseado em leucina parecem não afetar o tráfego e internalização do VACHT	54
IV.4	A primeira leucina do motivo baseado em leucina parece exercer um papel significativo no tráfego do VACHT	56
IV.5	Os aminoácidos 481-485 parecem conter um sinal de exportação para a saída do VACHT do retículo endoplasmático	58
IV.6	A expressão de mutantes do VACHT na membrana plasmática	61
IV.7	Interação entre a região C-terminal do VACHT e o complexo adaptador de clatrina AP-2	62

IV.8	O efeito da superexpressão de AP180-C na internalização e o tráfego do VACHT	66
IV.9	Os aminoácidos 471-490 parecem conter os sinais de internalização mais relevantes para a interação com a maquinaria endocítica dependente de clatrina	71
IV.10	Interação entre VACHT e SEC14	76
<b>V -</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>84</b>
<b>VI -</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>101</b>
<b>VII -</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>103</b>
<b>VIII -</b>	<b>ANEXO 1</b>	<b>122</b>
<b>IX -</b>	<b>ANEXO 2</b>	<b>123</b>
<b>X -</b>	<b>ANEXO 3</b>	<b>124</b>

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1:	Sequência de aminoácidos e topologia propostas para o transportador vesicular de acetilcolina humano (hVACHT)	20
Figura 2:	Ilustração esquemática das construções do GFP-VACHT e mutantes utilizadas neste trabalho	32
Figura 3:	Colocalização entre GFP-VACHT e myc-VAMP2	47
Figura 4:	A sequência de 10 aminoácidos em torno do motivo baseado em leucina contém os sinais relevantes para o tráfego de GFP-VACHT em células SN56	52
Figura 5:	A deleção dos aminoácidos 471-490 afeta a distribuição e tráfego do VACHT	53
Figura 6:	Os resíduos acídicos próximos ao motivo baseado em leucina não são importantes para o tráfego do VACHT	55
Figura 7:	O resíduo de leucina 485 parece exercer um papel significativo no tráfego do VACHT	57
Figura 8:	Os aminoácidos 481-485 parecem conter um sinal de exportação do retículo endoplasmático	60
Figura 9:	Expressão de mutantes do VACHT na membrana plasmática	63
Figura 10:	Interação do motivo baseado em leucina do VACHT com AP-2	65
Figura 11:	Ilustração esquemática do experimento de imunofluorescência sem permeabilização	68
Figura 12:	Localização de HA-VACHT durante a superexpressão de AP180-C em células PC12	69

Figura 13:	O bloqueio da endocitose mediada por clatrina afeta a endocitose e o tráfego do VACHT em células SN56	70
Figura 14:	A localização do GFP-VACHT $\Delta$ 491-530 depende de endocitose mediada por clatrina.	74
Figura 15:	A distribuição subcelular de GFP-HA-VACHT wt e GFP-HA-VACHT $\Delta$ 491-530 é similar em células PC12	75
Figura 16:	Estrutura primária de SEC14 <i>like</i>	78
Figura 17:	VACHT C-terminal e SEC14 <i>like</i> interagem no duplo híbrido em leveduras	79
Figura 18:	Co-imunoprecipitação de HA-VACHT e SEC14 <i>like</i> -myc em células PC12	80
Figura 19:	Co-localização entre SEC14 <i>like</i> -myc e GFP-VACHT em células SN56	82
Figura 20:	SEC14 <i>like</i> -myc não co-localiza com YFP-Golgi e tfn-568	83
Tabela 1:	Iniciadores utilizados para a amplificação do VACHT selvagem e mutantes, e do Sec14	33
Tabela 2:	Porcentagem de co-localização entre as diferentes construções do GFP-VACHT e myc-VAMP2	48

## Lista de Abreviaturas

AAK1	Quinase associada à adaptador 1
ACh	Acetilcolina
AP	Proteína adaptadora
ATPase	Adenosina trifosfatase
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
GFP	Proteína fluorescente verde
GGA	Golgi-localizing, $\gamma$ -adaptin ear homology domain and ARF binding protein
GST	Glutathione S-transferase
HA	Hemaglutinina
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LDCV	Grande vesícula de centro denso
pH	Potencial de hidrogênio
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PTB	Domínio de ligação à fosfotirosina
ER	Retículo endoplasmático
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLMV	Pequena vesícula do tipo sináptica
TGN	Trans-Golgi network
VACht	Transportador vesicular de acetilcolina
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
VMAT	Transportador vesicular de monoamina

## Resumo

O transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) é a proteína responsável pelo empacotamento de acetilcolina (ACh) citoplasmática em vesículas sinápticas de neurônios colinérgicos. A região C-terminal do transportador, que é voltada para o citosol, é importante nos eventos de tráfego intracelular e direcionamento para organelas secretórias. Neste estudo, nós procuramos identificar os sinais de tráfego presentes nessa região. Utilizando a GFP (proteína fluorescente verde) como etiqueta molecular e a microscopia confocal, o tráfego intracelular de diversas construções do VACHT, com mutações e deleções, foi avaliado. Nossos resultados sugerem que os aminoácidos 471-490 contêm sinais importantes para a saída do retículo endoplasmático, endocitose, tráfego e direcionamento do VACHT para “synaptic like microvesicles” (SLMVs). Entre os resíduos 481-485 parece existir um sinal de exportação do retículo endoplasmático, uma vez que a mutação destes aminoácidos levou à retenção do transportador neste compartimento. A mutação do motivo di-leucina, presente nas posições 485 e 486, leva à um acúmulo do transportador na membrana plasmática. Experimentos de interação proteína-proteína mostraram que a região C-terminal do VACHT interage com a subunidade  $\mu$  do complexo adaptador de clatrina AP-2, de uma maneira dependente do motivo baseado em leucina. Com o intuito de avaliarmos o papel da clatrina no tráfego e endocitose do VACHT, utilizamos a construção AP180-C que, quando superexpressa, bloqueia a endocitose de proteínas que dependem de clatrina. Estes experimentos demonstraram que a endocitose mediada por clatrina é um evento essencial para o tráfego do VACHT. Além disso, nossos resultados também demonstraram que os aminoácidos envolvidos na interação com a maquinaria endocítica estão presentes na sequência compreendida entre os resíduos 471-490

da região C-terminal do transportador. Nosso próximo passo foi tentar identificar proteínas que interagem com o VACHT e auxiliam no seu tráfego e direcionamento para as vesículas sinápticas. Para isso, realizamos a varredura de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano. A interação entre VACHT e SEC14*like* foi detectada neste sistema, e confirmada através de co-imunoprecipitação. SEC14 é uma proteína envolvida com tráfego de vesículas e na transferência de fosfatidilinositol e fosfatidilcolina entre membranas. Experimentos de co-localização, sugerem não apenas que VACHT e SEC14 se co-localizam, como também que a distribuição subcelular do transportador parece estar alterada na presença de SEC14. Outros estudos ainda precisam ser realizados para avaliar a implicação da superexpressão de SEC14*like* no tráfego do VACHT. Os resultados deste trabalho sugerem fortemente que, existe um sinal de exportação do retículo endoplasmático entre os aminoácidos 481-485, o motivo baseado em leucina é o responsável pela interação entre o VACHT e AP-2, a endocitose mediada por clatrina tem um papel fundamental na endocitose e tráfego do transportador e que a superexpressão de SEC14*like* parece interferir no tráfego do VACHT.

## Abstract

The vesicular acetylcholine transporter (VACHT) is the protein responsible for packaging cytoplasmic acetylcholine (ACh) into the synaptic vesicle of cholinergic neurons. The cytosolic C-terminal region of VACHT is important in intracellular trafficking events and targeting to secretory organelles. In this study, we evaluate the existence of trafficking signals in this region. Using confocal microscopy and GFP (green fluorescent protein) as a molecular label, the intracellular trafficking of several VACHT constructs was observed. Our results suggest that amino acids 471-490 contain important signals for endocytosis, trafficking, endoplasmic reticulum (ER) export and the targeting of VACHT to “synaptic like microvesicles” (SLMVs). In the region comprehended by residues 481-485 seems to exist a signal for endoplasmic reticulum export since the mutation of these amino acids retains the transporter in the ER. Mutation of the di-leucine motif (L485 L486) relocates the transporter to the soma plasma membrane. Protein-protein interaction experiments demonstrated that the C-terminal region of VACHT interacts with  $\mu$  subunit of clathrin adaptor complex AP2 in a di-leucine motif dependent manner. To evaluate the role of clathrin in the trafficking and endocytosis of VACHT, we used the AP180-C construct. When AP180-C is overexpressed the clathrin-mediated endocytosis is blockade. These experiments demonstrated that clathrin mediated endocytosis is an essential event for VACHT trafficking. In addition, our results showed that the amino acids involved in the interaction with the clathrin endocytic machinery are present in the sequence between residues 471-490 of the C-terminal region of VACHT. In our next step, we tried to identify proteins that interact with VACHT and contribute in its trafficking and sorting to synaptic vesicles. For this reason, we performed a screening in a human brain cDNA library. The interaction between VACHT and *SEC14like* was detected in

this system and was confirmed by co-immunoprecipitation. SEC14 is implicated in vesicle trafficking and in phosphatidylinositol and phosphatidylcholine transfer between membranes. Co-localization experiments suggest not only that VACHT and SEC14*like* co-localize but also that the subcellular distribution of VACHT appears to be altered in the SEC14 presence. Further studies must be performed to verify the implications of SEC14*like* overexpression on VACHT trafficking. Our results strongly suggest that: 1- there is an ER export signal between amino acids 481-485; 2- the di-leucine motif is responsible for VACHT interaction with AP2; 3- the clathrin dependent endocytosis has a fundamental role in endocytosis and trafficking of the transporter; and 4- the overexpression of SEC14*like* seems to interfere with VACHT trafficking.

## **I. Introdução**

A transmissão química é a principal forma de comunicação entre os neurônios no sistema nervoso central. Com a chegada de um potencial de ação ao terminal nervoso, a membrana despolariza-se levando a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem. O influxo de cálcio dispara então a exocitose de vesículas sinápticas, resultando na liberação de neurotransmissores (Kelly, 1993). A membrana da vesícula sináptica é internalizada por endocitose e então reutilizada na formação de novas vesículas. Estas são novamente preenchidas com neurotransmissores para outro evento de exocitose, podendo este ciclo ser repetido por várias vezes. Portanto, os compartimentos pré-sinápticos podem ser considerados unidades autônomas, pois possuem todos os elementos necessários para síntese e armazenamento de neurotransmissores, exocitose e reciclagem de membrana (Jahn e Südhof, 1994).

Os neurônios possuem duas classes distintas de vesículas secretórias, as vesículas sinápticas e os grânulos secretórios, que armazenam moléculas mensageiras e as liberam sob estimulação (De Camilli e Jahn 1990, Kelly 1991, Huttner e cols. 1995). Estas duas classes de vesículas secretórias possuem mecanismos diferentes para transportar a molécula mensageira para o interior do sistema de endomembranas (Hannah e cols. 1999).

Os grânulos secretórios (em neurônios também chamados de large dense core vesicles - LDCV) medeiam a secreção regulada de neuropeptídeos e de monoaminas. O empacotamento de neuropeptídeos nos grânulos acontece no complexo de Golgi e por isso, a reciclagem da membrana destas estruturas apresenta certas limitações quanto à velocidade (Hannah e cols. 1999).

As vesículas sinápticas medeiam a secreção regulada de moléculas mensageiras não-protéicas, os neurotransmissores. Estes são transportados do

citoplasma para o interior das vesículas graças à maquinaria da própria vesícula. Isto permite a reutilização local da membrana das vesículas, independente das maquinarias do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (Hannah e cols. 1999).

Na neurotransmissão colinérgica, a acetilcolina (ACh) é sintetizada pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT) que cataliza a reação entre colina e acetil-CoA. Uma vez formada, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas graças à ação de dois componentes importantes da membrana das vesículas. Um deles, a bomba de prótons vacuolar denominada ATPase do tipo V, bombeia prótons para o interior das vesículas (Parsons 2000). O outro, o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), medeia a armazenagem de ACh em vesículas sinápticas por trocar ACh citoplasmática por prótons vesiculares (Usdin e cols. 1995; Nguyen e cols. 1998).

### **I.1 - Gênese de vesículas sinápticas**

As vesículas sinápticas são organelas uniformemente pequenas com raio aproximado de 22nm, responsáveis pela captação e liberação de neurotransmissores (Sudhof 2004). Para o entendimento dos mecanismos envolvidos com a biogênese de vesículas sinápticas, é necessário o conhecimento das vias de tráfego utilizadas pelas proteínas residentes nestas organelas.

Diversos estudos sugerem que proteínas de vesícula sináptica são transportadas em vesículas de transporte diferentes, na morfologia e composição protéica, das vesículas sinápticas maduras (Tsukita e Ishikawa 1980), e então transformadas em vesículas de reciclagem depois de alcançarem a sinapse (Tsukita

e Ishikawa, 1980; Régnier-Vigouroux e cols. 1991; Hannah e cols. 1999; Ahmari e cols. 2000).

Em um estudo clássico, Tsukita e Ishikawa (1980) demonstraram o acúmulo de vesículas de transporte do lado proximal do axônio, através do resfriamento local do nervo safeno de camundongos. Estas estruturas apresentavam forma túbulo-vesicular, com dimensões entre 50-80nm, diferente da forma das vesículas sinápticas que se apresentam como esferas de 50 nm. Estas observações foram importantes, pois demonstraram que em neurônios “maduros”, as vesículas sinápticas não são formadas no soma e não se originam do *trans*-Golgi network (TGN). Régnier-Vigouroux e colaboradores (1991) demonstraram que a sinaptofisina, proteína de vesícula sináptica, é transportada do TGN para a membrana plasmática em vesículas secretórias constitutivas e que, após sua chegada na superfície celular, esta proteína cicla entre a membrana plasmática e compartimentos intracelulares que parecem ser endossomas iniciais, antes de ser direcionada para a membrana de SLMVs (synaptic-like microvesicles), em células PC12. Nakata e colaboradores (1998) observaram que proteínas do TGN, proteínas de membrana plasmática e proteínas de vesícula sináptica eram transportadas pelos axônios em estruturas túbulo-vesiculares. Estas estruturas parecem realizar não apenas o transporte unidirecional, mas também parecem circular dentro dos axônios até que ocorra sua fusão com a membrana plasmática. Uma vez presentes na membrana plasmática, outros mecanismos devem regular o tráfego destas proteínas para as vesículas durante sua formação ou reciclagem. Ahmari e colaboradores (2000), transfectaram neurônios de hipocampo com a construção VAMP (vesicular-associated membrane protein)-GFP e visualizaram estruturas fluorescentes que se translocavam rapidamente pelos axônios, tanto no sentido anterógrado quanto no

retrógrado. Estas estruturas foram chamadas de “transport packets” e apresentaram-se maiores do que as vesículas sinápticas. Além disso, foi demonstrada ainda a presença de vários componentes necessários para a formação de uma pré-sinapse ativa nestes “transport packets”, tais como a subunidade  $\alpha 1a$  de canal de cálcio, e as proteínas vesiculares SV2, sinapsina e anfidisina.

## **I.2- Proteínas de vesícula sináptica**

As vesículas sinápticas contêm duas classes obrigatórias de componentes: proteínas envolvidas na captação de neurotransmissores, e proteínas de tráfego que participam na exo e endocitose de vesículas sinápticas e na reciclagem. Estas proteínas não possuem domínios comuns óbvios que possam explicar o direcionamento seletivo para as vesículas sinápticas. Além disso, o mecanismo de ancoragem à membrana da vesícula pode acontecer de diferentes maneiras, podendo ocorrer através de regiões transmembrana múltiplas (sinaptofisina, SV2) ou únicas (sinaptotagmina, VAMP), via modificações pós-traducionais (proteínas rab) ou interações hidrofóbicas (sinapsinas) (Südhof e Jahn, 1991). Finalmente, a maioria das proteínas de vesículas sinápticas são modificadas pós-traducionalmente por múltiplos mecanismos, dentre eles glicosilação e fosforilação.

### **I.2.1- Proteínas de tráfego envolvidas na exo e endocitose de vesículas sinápticas e na reciclagem**

A maioria das proteínas de vesícula sináptica estão envolvidas no tráfego e direcionamento destas organelas. Uma descrição simplificada de algumas destas proteínas é dada a seguir:

- Sinaptobrevina ou VAMP é abundante nas vesículas sinápticas (revisto por Fernández-Chacón e Sudhof 1999). Esta proteína é uma das envolvidas na formação do complexo SNARE, fundamental para exocitose de vesículas sinápticas (Littleton e cols. 1998).

- Sinaptofisina foi a primeira proteína integral de membrana de vesícula a ser isolada e clonada (revisto por Valtorta e cols. 2004). Esta proteína parece desempenhar papéis importantes tanto na exo-endocitose quanto na biogênese de vesículas sinápticas. Sinaptofisina também parece ser importante para o direcionamento correto de VAMP2 para as vesículas sinápticas (Pennuto e cols. 2003).

- Sinaptotagminas atuam como proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$  para a exocitose rápida. São proteínas compostas por uma sequência N-terminal intravesicular curta, uma única região transmembrana e 2 domínios  $\text{C}_2$  citoplasmáticos. Os domínios  $\text{C}_2$  da sinaptotagmina ligam-se a íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudos com camundongos nocaute para sinaptotagmina mostraram que esta proteína é essencial para exocitose rápida dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fernández-Chacón e Sudhof 1999).

- As vesículas sinápticas contêm membros de pelo menos 3 famílias de proteínas rab, que são GTPases monoméricas importantes para o tráfego e direcionamento de vesículas: Rab3 (Rab3A, 3B, 3C e 3D), Rab5 e Rab11 (Sudhof 2004). Rab3 alterna em um ciclo de associação e dissociação com vesículas sinápticas em paralelo com exo e endocitose (Fischer von Mollard e cols. 1991).

- SV2s são proteínas que possuem múltiplos domínios transmembrana. A estrutura de SV2 sugere que esta proteína seja um transportador. O fenótipo de sinapses deficientes em SV2 indica que esta proteína pode ser um transportador de

$\text{Ca}^{2+}$  , o que é corroborado pela presença de um par de resíduos carregados negativamente na primeira região transmembrana (Janz e Sudhof 1999).

- Sinapsinas ligam-se a lipídios de superfície (Benfenati e cols. 1989) através do domínio N-terminal (Hosaka e cols. 1999). Este domínio é fosforilado por PKA e proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmoldulina, e a fosforilação abole a ligação da sinapsina às vesículas sinápticas. As sinapsinas ligam-se também a vários elementos do citoesqueleto, especialmente actina, sugerindo que estas proteínas possam ancorar as vesículas sinápticas no citoesqueleto, formando um “pool” de reserva (Pieribone e cols. 1995).

### **1.2.2- Proteínas envolvidas com a captação e armazenamento dos neurotransmissores**

Vesículas sinápticas armazenam neurotransmissores em altas concentrações por um transporte ativo dirigido por uma bomba de próton ATPase vacuolar, cuja atividade estabelece um gradiente eletroquímico através da membrana da vesícula que dirige a captação de neurotransmissores (Maycox 1988). Os transportadores vesiculares utilizam este gradiente para promoverem o armazenamento de neurotransmissores dentro das vesículas sinápticas (Sudhof 2004).

### **1.3- Exocitose de vesículas sinápticas**

A liberação regulada de neurotransmissores, conhecida como exocitose, medeia a comunicação neuronal e suporta funções do sistema nervoso, como percepção sensorial, aprendizado e memória (Li e Chin 2003). Vesículas sinápticas, contendo neurotransmissores, encontram-se ancoradas em uma região especializada da membrana plasmática pré-sináptica, conhecida como zona ativa

(Akert e cols. 1971; revisto por Li e Chin 2003). Uma vez ancoradas na zona ativa, as vesículas sinápticas passam por um processo de maturação conhecido como “priming” para se tornarem competentes para a fusão (Klenchin e Martin 2002). Em resposta a um influxo de cálcio induzido por um potencial de ação, as vesículas passam por uma fusão exocitótica rápida e liberam neurotransmissores.

Muitas proteínas têm sido identificadas como elementos importantes para a fusão de membrana da vesícula com a membrana plasmática. Os principais elementos em todos os eventos de fusão de membrana intracelular parecem ser os SNAREs [soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor] (revisto por Li e Chin 2003; Chen e cols. 2001). A exocitose de vesículas sinápticas requer 3 SNAREs neuronais: uma proteína associada com a vesícula, conhecida como sinaptobrevina ou VAMP (vesicle-associated membrane protein), e duas proteínas de membrana plasmática, syntaxina e SNAP25 (synaptosomal-associated protein) (Chen e cols. 2001). Estas três proteínas interagem formando um complexo altamente estável, conhecido como complexo SNARE. Este complexo parece ser muito importante para a exocitose de vesículas sinápticas, uma vez que a interferência com a integridade deste, através de mutações nas SNAREs neuronais, inibe a exocitose de vesículas sinápticas (Littleton e cols. 1998). Além disso, a clivagem específica de SNAREs neuronais por neurotoxinas clostridiais afeta a montagem do complexo e bloqueia a liberação de neurotransmissores sem afetar a ancoragem de vesículas sinápticas (O'Connor e cols. 1997; Schiavo e cols. 1992). A dissociação do complexo SNARE acontece com a hidrólise de ATP pela ATPase NSF (Rothman 1994).

## **1.4 Endocitose e reciclagem de vesículas sinápticas**

### **1.4.1 – Endocitose de vesículas sinápticas**

Após a exocitose de vesículas sinápticas, a membrana destas é reinternalizada e utilizada para gerar novas vesículas. Este evento precisa acontecer de maneira específica porque as vesículas sinápticas possuem composição protéica e lipídica distintas da membrana plasmática. Após estimulação intensa do terminal nervoso ou após tratamentos que impedem reversivelmente a endocitose, proteínas de vesícula sináptica acumulam-se transitoriamente na membrana plasmática. Contudo, após a reversão dessas condições, elas são rápida e seletivamente reinternalizadas (Cremona e De Camilli 1997).

A membrana das vesículas sinápticas pode ser recuperada através de endocitose mediada por clatrina (Heuser e Reese, 1973). A formação de vesículas revestidas por clatrina na superfície celular parece ter início com a ligação do complexo adaptador de clatrina AP-2 à membrana (Schmid 1997; Kelly 1999; Kirchhausen e cols. 1997). A subunidade  $\alpha$  está envolvida no direcionamento de AP-2 para a membrana plasmática, assim como em interações com AP180 (Mousavi e cols. 2004). A subunidade  $\beta$  promove a interação entre AP-2 e clatrina (Owen e cols. 2000). Quando na membrana plasmática, a subunidade  $\mu$  de AP-2 é fosforilada por AAK1 (adaptor-associated kinase 1) levando a um aumento na afinidade de AP-2 por sinais de internalização presentes em receptores e proteínas (Ricotta e cols. 2002). A interação entre AP-2 e AP180 aumenta a atividade de montagem de vesículas revestidas de clatrina de maneira mais eficiente comparada à atividade de montagem promovida por cada proteína isoladamente, sugerindo efeitos sinérgicos entre AP-2 e AP180 na montagem de vesículas revestidas por clatrina (Hao e cols. 1999).

Nos últimos anos houve grande avanço na identificação de várias proteínas que interagem com clatrina. Estas proteínas são conhecidas como acessórias e são divididas em quatro grupos funcionais, embora algumas delas possam pertencer a mais de um grupo. O primeiro grupo está envolvido com a seleção do chamado “carga” e no início da formação da depressão revestida de clatrina na membrana plasmática; o segundo grupo está envolvido em interações com o citoesqueleto de actina; o terceiro está envolvido na fissão das vesículas revestidas e o último grupo atua na retirada do revestimento das vesículas (Lafer 2002). As proteínas acessórias eps15, epsin e Hrs são candidatas a papéis na seleção do “carga” e nas reações de montagem de clatrina (Lafer 2002). Eps15 se associa transitoriamente com as vesículas revestidas de clatrina, no início de sua formação, além de interagir com AP-2 (Tebar e cols. 1996). Epsin é estruturalmente similar a AP180, apresentando um domínio de interação a lipídios de membrana e múltiplos sítos de ligação à clatrina, AP-2 e eps15 (Kalthoff e cols. 2002). Hrs é uma proteína que interage com eps15 e clatrina e parece estar envolvida com o recrutamento de clatrina para endossomas iniciais (Raiborg e cols. 2001). Proteínas que possuem um domínio de ligação à fosfotirosina (PTB), como Dab2, Numb, ARH e CED-6 parecem exercer papéis importantes na seleção do “carga”. Já foi demonstrado que algumas destas proteínas colocalizam com componentes da maquinaria de revestimento de clatrina e possuem sítos de interação com AP-2, clatrina e (Ptd-Ins[4,5]P2) (revisito por Bonifacino e Traub 2003). As proteínas que se ligam à clatrina, HIPR1, ankyrin, ACK1 e ACK2 podem estar envolvidas na reorganização do citoesqueleto de actina, evento que parece ser necessário para a formação de vesículas revestidas por clatrina (Lafer 2002). As proteínas sinaptojanina e anfifisina estão envolvidas em uma rede de interações com

dinamina, endofilina e sindapina, que parece ser importante para a reação de fissão (Cremona e De Camilli 2001). Anfifisina e endofilina apresentam uma organização similar, com um domínio BAR na porção N-terminal e um domínio SH3 na porção C-terminal. O domínio BAR é o módulo que se liga e deforma a membrana, frequentemente com o auxílio de sequências flanqueadoras que aumentam a associação com a membrana (Lee e cols. 2002; Peter e cols. 2004). O domínio SH3 medeia interações com outras proteínas, primariamente a dinamina e sinaptojanina (McPherson e cols. 1996). Sinaptojanina e endofilina são enzimas que modificam lipídios e podem contribuir para o rearranjo lipídico que promove a reação de fissão (Cremona e De Camilli 2001). Sinaptojanina parece ter também um papel na retirada do revestimento, uma vez que existe um número aumentado de vesículas revestidas por clatrina em camundongos deficientes para sinaptojanina (Kim e cols. 2002).

#### **1.4.1.1 – Seleção de proteínas a serem endocitadas**

A seleção de proteínas “carga” na membrana plasmática é um passo importante durante a formação de vesículas revestidas por clatrina. Estas proteínas possuem, em regiões voltadas para o citoplasma, informações de direcionamento, que muitas vezes estão presentes em domínios peptídicos curtos, tipicamente de 4-6 aminoácidos (Kirchhausen 2002). Estes motivos protéicos determinam qual a via de tráfego vesicular é usada para transportar uma molécula particular e, desta forma, determina o destino final desta. Vários sinais de direcionamento já foram identificados. Existem sinais baseados em tirosina, como o NPXY (N-asparagina, P-prolina, X-qualquer aminoácido e Y-tirosina) presente no receptor de LDL, e o YXXØ (Y-tirosina, X-qualquer aminoácido e Ø-aminoácido hidrofóbico) presente no receptor de transferrina, no receptor de EGF, dentre outros (Kirchhausen 2002). Existem também sinais baseados em leucina, que podem ser divididos em

[DE]XXXL[LI] e DXXLL (Bonifacino e Traub 2003). [DE]XXXL[LI] está presente em várias proteínas, como por exemplo, LIMPII (lysosomal integral membrane protein II), VMAT2, CD3- $\gamma$ , dentre outras (Bonifacino e Traub 2003). DXXLL está presente em CI e CD-MPRs (receptores de manose 6-fosfato independente e dependente de cátion), em proteínas relacionadas com receptor de LDL, LRP3 e LRP10, dentre outras (Bonifacino e Traub 2003). Estes sinais de direcionamento são reconhecidos pelos complexos adaptadores de clatrina (APs), mais especificamente por subunidades determinadas dos complexos APs. No reconhecimento do sinal tipo YXX $\emptyset$ , a subunidade mais comumente envolvida na interação é a  $\mu$ . Existem evidências que o sinal baseado em leucina tipo [DE]XXXL[LI] pode interagir com a subunidade  $\mu$ , mas também existem indícios de interação com a subunidade  $\beta$  dos complexos APs (Bremnes e cols. 1998; Rodionov e Bakke 1998; Hofmann e cols. 1999; Craig e cols. 2000; Kongsvik e cols. 2002; Rapoport e cols. 1998; Greenberg e cols. 1998). Através de técnicas de triplo híbrido em leveduras, Janvier e colaboradores (2003) verificaram que, em algumas proteínas, o sinal [DE]XXXL[LI], parece interagir com combinações das subunidades  $\gamma$  e  $\sigma 1$  de AP-1 e  $\delta$  e  $\sigma 3$  de AP-3. Ao contrário, DXXLL parece não se ligar aos complexos APs (Bonifacino e Traub 2003). Evidências sugerem que proteínas que possuem este sinal, como CI e CD-MPRs, interagem com uma classe de adaptadores recém descoberta, conhecida como GGAs (Golgi-localized,  $\gamma$ -adaptin ear homology domain, ARF-dependent) (Puertollano e cols. 2001). Esta classe de proteínas parece ser formada por três membros: GGA1, GGA2 e GGA3 (Nakayama e Wakatsuki 2003). GGA1 colocaliza com receptores de manose 6-fosfato no Golgi, e GFP-GGA1 e M6PR podem ser observados saindo junto do Golgi em estruturas túbulo-vesiculares em células vivas (Puertollano e cols. 2001). Estas proteínas monoméricas possuem quatro domínios

distintos, conhecidos como: VHS, responsável pela interação com regiões citoplasmáticas de proteínas; GAT, envolvido na interação com ARF; Hinge e GAE responsáveis pela ligação à clatrina e proteínas acessórias, respectivamente (Black e Pelham 2001).

#### **1.4.2 – Reciclagem de vesículas sinápticas**

Após a liberação de neurotransmissores, as vesículas podem seguir três vias de reciclagem diferentes. Duas vias são de reciclagem rápida, onde as vesículas permanecem na zona ativa para serem novamente preenchidas com neurotransmissor (kiss-and-stay), ou são recicladas localmente sem endocitose mediada por clatrina (kiss-and-run). A terceira via é de reciclagem lenta e envolve endocitose mediada por clatrina (Sudhof 2004).

O modelo de reciclagem de vesículas sinápticas mais estudado propõe que a membrana das vesículas seja recuperada através de endocitose mediada por clatrina (Heuser e Reese, 1973). Este modelo é apoiado por evidências morfológicas (Heuser e Heese, 1973; Shupliakov e cols. 1997) e genéticas (Koenig e Ikeda 1989; González-Gaitán e Jackle 1997). Evidências sugerem a participação de intermediários endossomais durante a reciclagem de vesículas sinápticas. Endossomas são observados morfológicamente após estimulação intensa do terminal nervoso, sugerindo que no mínimo um subgrupo de vesículas se funde com endossomas após a endocitose (Heuser e Reese, 1973; Südhof 1995; Richards e cols. 2000). Vesículas sinápticas purificadas de cérebro contém um número limitado de proteínas Rab, que inclui Rab5, proteína residente de endossomas primários (Chavrier e cols. 1990; Sudhof 2004). Vesículas sinápticas contém altas concentrações da proteína Vti1A, cuja função consiste na fusão de membrana

envolvendo endossomas (Antonin e cols. 2000). Além disso, a inibição farmacológica da fusão de endossomas na junção neuromuscular de rã utilizando bloqueadores da fosfatidilinositol-3-quinase afeta a liberação de neurotransmissor e diminui o número de vesículas sinápticas (Rizzoli e Betz 2002).

Reciclagem local e direta de vesículas sinápticas, sem intermediário endossomal, é também apoiada por diversas linhas de evidências. Em experimentos clássicos, Whittaker e colaboradores demonstraram que, após estimulação do terminal nervoso, um pequeno subgrupo de vesículas se torna preferencialmente preenchido com neurotransmissor recém sintetizado (Barker e cols. 1972). Além disso, este subgrupo de vesículas localiza-se próximo à membrana e é o primeiro a sofrer exocitose após estimulação. A partir destas observações foi postulado que vesículas sinápticas seriam divididas em uma subpopulação de vesículas ativas (chamado “pool” de reciclagem) e uma população maior de vesículas de reserva (Südhof 2000). O conceito de reciclagem local reapareceu no trabalho de Murthy e Stevens (1998). Foi demonstrado que vesículas sinápticas de neurônios hipocámpais em cultura marcadas com FM1-43 durante endocitose são sujeitas a nova exocitose sem diluição do corante. Este resultado é consistente com a idéia que vesículas do “pool” de reciclagem não passam por intermediários endocíticos.

Mais recentemente, uma nova via no ciclo de vesículas sinápticas foi sugerida, sendo chamada de “reutilização” (Pyle e cols. 2000; Stevens e Williams, 2000). Nessa via, as vesículas sinápticas prontas para liberação liberam o neurotransmissor através da abertura de poros, os quais se fecham rapidamente. As vesículas são imediatamente preenchidas com neurotransmissor e se tornam novamente prontas para uma nova rodada de exocitose sem sequer deixar a zona ativa (Pyle e cols. 2000; Stevens e Williams 2000). Harata e colaboradores (2006)

observaram que a reutilização não se restringe apenas às vesículas prontas para liberação, se estendendo ao “pool” total de vesículas de reciclagem.

## **I.5 - Tráfego de membrana**

O tráfego de membranas é um processo dinâmico responsável pela biogênese e organização de estruturas ligadas à membrana, além da comunicação entre essas. O tráfego requer a formação controlada de vesículas e estruturas túbulo-vesiculares a partir de uma membrana doadora, o movimento destas vesículas para o seu alvo, e a sua fusão com a membrana acceptora. Além disso, são necessários mecanismos especiais para assegurar o movimento seletivo de proteínas e lipídios da organela doadora para a acceptora. Em geral, este problema de seleção é resolvido pela concentração de moléculas específicas em vesículas que são formadas de uma maneira controlada (Chavrier e Goud 1999).

### **1.5.1 – Tráfego dependente de clatrina**

A via de tráfego dependente de clatrina foi a primeira a ser reconhecida e estudada (Kirchhausen e cols. 1997; Kirchhausen 2002). O principal componente estrutural das vesículas formadas nesta via é a clatrina, proteína com 3 pontas, que se organiza em arranjos em forma de gaiola. A montagem da clatrina no lado citossólico da membrana plasmática ou da membrana do TGN ocorre durante a formação de uma depressão revestida, que por fim é capturada em uma vesícula revestida (Kirchhausen e cols. 1997).

Como já mencionado, diversas proteínas auxiliam na formação do revestimento de clatrina, entre elas os complexos adaptadores de clatrina (APs), heterotetrâmeros que acoplam a montagem da depressão revestida às proteínas de membrana (Kirchhausen e cols., 1997). Existem pelo menos 4 complexos

adaptadores em células de mamífero: AP-1, encontrado em vesículas revestidas associadas com o TGN; AP-2, encontrado na membrana plasmática; AP-3, presente em endossomas e AP-4, associado à endossomas e ao TGN (Kirchhausen, 2000). Os complexos AP são formados por quatro tipos diferentes de subunidades polipeptídicas, chamadas adaptinas (Hirst e Robinson 1998; Pearse e Robinson 1990; Schmid 1997). Cada complexo contém duas subunidades grandes:  $\gamma$  e  $\beta 1$  para AP-1,  $\alpha$  e  $\beta 2$  para AP-2,  $\delta$  e  $\beta 3$  para AP-3 e  $\epsilon$  e  $\beta 4$  para AP-4, além de uma subunidade média  $\mu 1-4$  e uma pequena  $\sigma 1-4$ . As sequências primárias das subunidades  $\beta$ ,  $\mu$  e  $\sigma$  dos quatro adaptadores são altamente conservadas (50-80% de identidade). Ao contrário, as subunidades  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ , embora relacionadas, divergem significativamente uma da outra, com aproximadamente 25% de identidade (Kirchhausen 1999).

### **1.5.2 – Tráfego ao nível do retículo endoplasmático**

O brotamento de vesículas a partir do retículo endoplasmático (ER) requer um grupo distinto de proteínas associadas à membrana desta organela (Barlowe, 1998). As proteínas COPII (coatomer protein) medeiam o brotamento de membranas a partir do ER, enquanto as proteínas COPI são necessárias durante o movimento de membranas dos VTC (vesicular-tubular clusters) para o complexo de Golgi. COPI está também envolvido no movimento retrógrado a partir dos VTC e do complexo de Golgi em direção do ER (Gorelick e Shugrue 2001). O complexo COPII é formado pelos heterodímeros Sec23/24, Sec13/31 e a proteína Sar1. Sar1 é uma proteína G da família das ARF (ADP-ribosylation factor), que é convertida à forma ativa, ligada à GTP, graças à atuação da proteína Sec12. Sec12 é uma proteína transmembrana do ER, que atua como uma GEF (guanine exchange factor), estimulando a troca de GDP por GTP de Sar1. Ao ser ativada, Sar1-GTP recruta para a membrana do ER o

heterodímero Sec23/24. O complexo Sec23/24-Sar1 realiza então a seleção de proteínas que deverão sair do ER. Subsequentemente, o heterodímero Sec13/31 se liga e favorece a polimerização do revestimento da vesícula em formação, levando à deformação da membrana. Com a hidrólise do GTP, uma mudança conformacional em Sar1 leva à liberação de Sar1-GDP, Sec23/24 e Sec13/31 da membrana (Gorelick e Shugrue 2001; Mancias e Goldberg 2005).

Para promover a saída de proteínas do ER, Sec24 reconhece sinais específicos presentes nas proteínas. Estes sinais podem ser formados pelos aminoácidos LXX-L/M-E, D/E-X-D/E ou FF/FY/LL/VV (L-leucina, X-qualquer aminoácido, M- metionina, E-ácido glutâmico, D-ácido aspártico, F-fenilalanina, Y-tirosina, V-valina) (Mancias e Goldberg 2005). Outros sinais de exportação têm sido descritos, tais como o sinal F(X)<sub>3</sub>F(X)<sub>3</sub>F presente no receptor de dopamina D1 (Bermak e cols. 2001), FN(X)<sub>2</sub>LL(X)<sub>3</sub>L presente no receptor de vasopressina V1b (Robert e cols. 2005) e F(X)<sub>6</sub>l/LL presente nos receptores adrenérgicos  $\alpha$ 2B e de angiotensina II tipo 1A (Duvernay e cols. 2004). Para a seleção e manutenção de proteínas residentes do ER existem sinais de retenção. Estes sinais podem ser a sequência H/KDEL (H-histidina; K-lisina) na região carboxi-terminal de proteínas solúveis, ou motivos di-básico, di-lisina ou di-arginina, localizados no final do domínio citoplasmático de proteínas de membrana (Teasdale e cols. 1996; Gorelick e Shugrue 2001; Mancias e Goldberg 2005). Um novo sinal de retenção formado por RXR (R-arginina) e regulado por fosforilação via PKC foi identificado na subunidade NR1 do receptor NMDA (Scott e cols. 2001).

### **1.5.3 – Proteínas envolvidas no tráfego de membrana**

As proteínas da família Rab e ARF, nos últimos anos, têm surgido como elementos reguladores envolvidos nos eventos de direcionamento, ancoragem e

fusão de vesículas. As proteínas da família ARF são proteínas pequenas (~20kDa) ligadoras de GTP, necessárias para manutenção da integridade estrutural de organelas e para o transporte intracelular (Chavrier e Goud 1999). ARF1, o membro melhor caracterizado, é encontrado no complexo de Golgi e é importante para o recrutamento de coatômeros (para vesículas revestidas por COPI), AP-1 e AP-3 (para vesículas revestidas por clatrina) (Ooi e cols. 1998). As proteínas Rab, também ligadoras de GTP, são encontradas na face citoplasmática de todas as organelas envolvidas com o transporte intracelular. Estas proteínas parecem regular eventos de tráfego ao longo das vias endocíticas biossintética/secretória (Shimmoller e cols. 1998; Martinez e Goud 1998; Gonzalez e Scheller 1999). Existem cerca de 60 membros na família das proteínas Rab, identificados no genoma humano (Ali e Seabra 2005). Uma característica marcante destas proteínas é a localização específica dentro da célula, o que tem permitido a utilização das diferentes Rab como marcadores para identificação de organelas celulares e seus subdomínios (Ali e Seabra 2005).

#### **1.5.4 – A participação de lipídeos no tráfego de membrana**

Além dos constituintes protéicos, os lipídios, em particular os fosfoinositídeos, possuem funções regulatórias chave no tráfego de membrana (De Camilli e cols. 1996; Martin 1998; Odorizzi e cols. 2000). O fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (Ptd-Ins[4,5]P<sub>2</sub>) é um sinal importante na membrana plasmática que estabelece sítios para o tráfego vesicular, movimento de membrana e montagem do citoesqueleto de actina. O papel de (Ptd-Ins[4,5]P<sub>2</sub>) na sinalização é mediado através de interações com proteínas que contêm domínios de ligação a (Ptd-Ins[4,5]P<sub>2</sub>). O domínio de homologia à plecstrina é o domínio melhor caracterizado. O (Ptd-Ins[4,5]P<sub>2</sub>) na membrana plasmática, assim como em vesículas, é distribuído

de maneira não uniforme e parece concentrar-se em domínios tipo “raft”. Nestes sítios, o (Ptd-Ins[4,5]P<sub>2</sub>) coordena as reações de fissão e fusão de membrana com a montagem dos filamentos de actina para promover o movimento de membrana (Martin 2001).

#### **I.6 - Estrutura e função do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT)**

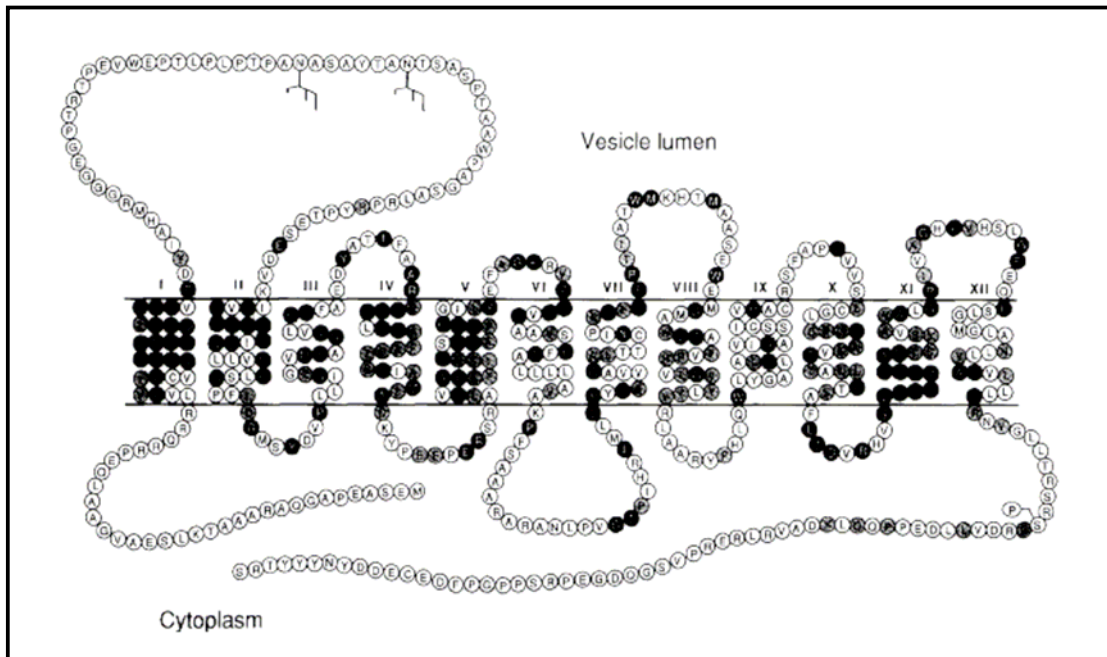
O VACHT é uma glicoproteína de 530 aminoácidos que apresenta 12 domínios transmembrana (Fig.1; Alfonso e cols. 1993; Erickson e cols. 1994; Roghani e cols. 1994; Varoqui e cols. 1994), flanqueados por domínios amino e carboxi-terminal citoplasmáticos. Imunoeletromicroscopia com anticorpos dirigidos contra a cauda C-terminal indica que essa região do VACHT está voltada para o citoplasma (Gilmor e cols. 1996; Weihe e cols. 1996). Além disso, o VACHT possui também uma grande alça entre os segmentos transmembrana 1 e 2 voltada para o lúmen da vesícula (Tan e cols. 1998). Em 1993, Alfonso e colaboradores clonaram e sequenciaram o cDNA correspondente ao gene *unc-17* de *C. elegans*, o qual sabia-se ser necessário para a função neuromuscular. Foi proposto que o produto deste gene era um transportador vesicular de acetilcolina baseado em sua homologia com os VMATs (transportadores de monoaminas). Além disso, sua expressão em terminais nervosos colinérgicos e os defeitos observados na neurotransmissão colinérgica nos mutantes deste gene eram consistentes com a ausência de transporte vesicular colinérgico.

Em 1994, Varoqui e colaboradores identificaram o homólogo de *unc-17* expresso no órgão elétrico de *Torpedo* e mostraram que o transportador se liga com alta afinidade ao vesamicol, um agente bloqueador neuromuscular que impede a neurotransmissão colinérgica por inibir o acúmulo de ACh na vesícula. Ainda em

1994, Erickson e colaboradores e Roghani e colaboradores, identificaram o homólogo do VACHT no rato. Erickson e colaboradores (1994) e Liu e Edwards (1997) confirmaram que esta proteína consiste em um transportador vesicular de acetilcolina, através da reconstituição do transporte *in vitro*.

### **I.7 - Tráfego, endocitose e localização do VACHT**

VACHT e VMATs apresentam uma estrutura semelhante, apresentando 12 domínios transmembrana, regiões amino e carboxi-terminal citoplasmáticas, e uma grande alça entre os domínios transmembrana 1 e 2 (Usdin e cols. 1995). A sequência do VACHT apresenta uma identidade de 40 e 38% com o VMAT1 e VMAT2, respectivamente (Usdin e cols. 1995). Apesar das similaridades, VACHT e VMATs apresentam uma localização diferente em células PC12, uma linhagem celular de feocromocitoma de rato (Weihe e cols.1996; Liu e Edwards 1997). Estas células possuem dois tipos distintos de organelas secretórias que estocam diferentes neurotransmissores clássicos: LDCV (large dense core vesicles) para as monoaminas e SLMV (synaptic-like microvesicles) para a acetilcolina. Nas células PC12, o VACHT localiza-se predominantemente em SLMV e endossomas, enquanto o VMAT está presente preferencialmente em LDCVs (Weihe e cols. 1996; Liu e Edwards 1997; Varoqui e Erickson 1998).



**Figura 1: Sequência de aminoácidos e topologia propostas para o transportador vesicular de acetilcolina humano (hVAChT).** Os símbolos em cinza indicam resíduos que são idênticos nos VAChTs de *Caenorhabditis elegans*, rato e Torpedo. Os símbolos em preto indicam os resíduos que são conservados também nos VMATs. Sítios para glicosilação e fosforilação por proteína quinase C (P) estão indicados. Adaptado de Usdin e cols.,1995.

Com o objetivo de identificar quais resíduos no VMAT e VACHT são importantes para o tráfego celular, Tan e colaboradores (1998) examinaram os efeitos de deleções e mutações nas regiões amino e carboxi-terminal na endocitose destes transportadores em diversas linhagens celulares. Observou-se que as regiões carboxi-terminal dos transportadores apresentam aminoácidos importantes para a sua internalização. Mais especificamente, que esta sequência contém um motivo baseado em leucina que parece ser importante para a endocitose eficiente dos transportadores vesiculares de ACh e monoaminas. Eles construíram mutantes do VACHT, trocando as leucinas por alaninas e os expressaram em células CHO, observando uma redução de 50% na internalização do transportador. O motivo baseado em leucina foi o primeiro sinal de internalização claramente identificado para proteínas de vesícula sináptica. Santos e colaboradores (2001) investigaram o comportamento do mutante, GFP-VACHT LLAA (ligado à Green Fluorescent Protein), em células SN56. Neste trabalho observou-se um acúmulo do transportador na membrana plasmática do soma, neuritos e varicosidades. A falta de marcação intracelular com GFP-VACHT LLAA sugere que a endocitose mediada por clatrina seja essencial para incorporação do VACHT em vesículas sinápticas.

Motivos baseados em leucina requerem, muitas vezes, resíduos ácidos nas posições -4 e -5 para promoverem a internalização de determinadas proteínas (Pond e cols. 1995; Dietrich e cols. 1997). O transportador VMAT2 possui resíduos de glutamato altamente conservados em ambas posições. Estes resíduos ácidos podem contribuir para o direcionamento mais específico de VMAT2 para LDCV. VACHT possui um resíduo de serina na posição -5 e um de glutamato na posição -4. Essas diferenças de carga entre VMAT2 e VACHT, na posição -5, podem conferir uma localização diferencial para LDCV e SVs, respectivamente (Liu e cols. 1999).

Em 2000, Krantz e colaboradores e Cho e colaboradores observaram que o VACHT sofre fosforilação regulada por PKC na serina na posição -5. Para entender o papel da fosforilação da serina 480 na localização do VACHT, Krantz e colaboradores (2000) utilizaram dois mutantes, um que previne a fosforilação (S480A), e o outro que mimetiza o estado fosforilado (S480E). Combinando imunofluorescência e fracionamento bioquímico, foi verificado que a mutação da Ser-480 regula o tráfego de membrana do VACHT para LDCV em células PC12. O mutante S480A e VACHT selvagem apresentaram alta colocalização com a proteína sinaptofisina (marcador de SLMVs). Ao contrário, a localização do mutante S480E foi semelhante à distribuição do marcador de LDCV, secretogranina II (Krantz e cols. 2000). No entanto, Cho e colaboradores (2000) verificaram que o mutante S480A não co-sedimenta com sinaptofisina e foi encontrado em frações de densidade intermediária entre vesículas sinápticas e vesículas de centro denso.

Varoqui e Erickson (1998) realizaram um trabalho onde proteínas quiméricas do VACHT e VMAT2 foram geradas. Estas proteínas tiveram suas caudas citoplasmáticas trocadas e foram analisadas quanto à distribuição subcelular. A região C-terminal citoplasmática do VACHT foi suficiente para redirecionar VMAT2 para SLMV em células PC12, uma vez que a proteína quimérica contendo N-terminal e os 12 domínios transmembrana do VMAT2 e o C-terminal do VACHT colocalizou com sinaptofisina, marcador de vesículas sinápticas em células PC12. Estes dados sugerem que as informações para o direcionamento destes transportadores para suas respectivas organelas secretórias estão contidas na região C-terminal.

Motivos baseados em leucina, similares ao presente no VACHT, interagem com complexos de proteínas adaptadoras de clatrina 1 e 2 (AP1 e AP2, Dietrich e

cols. 1997). A proteína Nef, do vírus HIV-1, interage fisicamente com complexo adaptador de clatrina-AP1 *in vitro*, sendo esta interação dependente do motivo de leucina (Bresnahan e cols. 1998). O trabalho de Greenberg e cols. (1998) mostrou co-localização entre a proteína Nef-LL-GFP com proteínas adaptadoras de clatrina na membrana plasmática (AP-2), enquanto a proteína de fusão mutante, onde as duas leucinas foram substituídas por alaninas, Nef-AA-GFP, não co-localizou com AP-2 na superfície celular. A cadeia invariante ( $\text{Ii}$ ) do complexo MHC classe II possui 2 motivos baseados em leucina que interagem com os complexos AP1 e AP2 através de suas subunidades  $\mu$  (Rodionov e Bakke 1998).

Recentemente, Kim e Hersh (2004) sugeriram sítios na sequência do VACHT responsáveis pela interação com os complexos adaptadores AP-1 e AP-2. De acordo com os resultados de co-immunoprecipitação e precipitação com GST (Glutathione-S-transferase), a sequência de aminoácidos proposta como responsável pela interação com AP-2 encontra-se nos últimos 11 aminoácidos (resíduos 520-530) da região C-terminal do VACHT. Neste trabalho é sugerido que resíduos de tirosina presentes nesta sequência representariam um motivo de tirosina não clássico, que serviria como um sinal para  $\alpha$ -adaptina (AP-2), enquanto o motivo di-leucina (L485 e L486) serviria como sinal para  $\gamma$ -adaptina (AP-1).

### **I.8 - Linhagem celular SN56 como modelo para o estudo de tráfego em células colinérgicas**

Estudos sobre função e localização de proteínas em neurônios podem ser facilitados pelo uso de células em cultura. Muitas vezes torna-se difícil estudar determinados aspectos da comunicação nervosa utilizando fatias de tecido ou cultura primária, devido à grande heterogeneidade neuroquímica presente nestas

preparações. Nos últimos anos, muitos avanços no entendimento da biogênese e tráfego de vesículas sinápticas foram alcançados graças ao uso de modelos de células em cultura, como as células neuroendócrinas PC12.

A linhagem celular SN56 representa um modelo celular colinérgico que pode auxiliar nos estudos de tráfego do VACHT, assim como de outras proteínas envolvidas com a neurotransmissão colinérgica. Esta linhagem celular foi gerada através da fusão somática de neurônios do septo de camundongo com o neuroblastoma N18TG2 (Hammond e cols. 1990; Lee e cols. 1990a, 1990b), resultando desta forma em uma célula híbrida. As células SN56 apresentam várias características colinérgicas, como a expressão de ChaT (colina acetil-transferase) (Blusztajn e cols. 1992; Berse e Blusztjan 1997; Pedersen e Blusztjan 1997), a presença de mRNA para o VACHT (Berse e Blusztajn 1997), expressam receptor muscarínico de ACh (Rosoff e cols. 1996), além de sintetizarem ACh (Berse e Blusztajn 1997). Quando tratadas com forskolina ou dibutilil cAMP estas células apresentam alterações morfológicas, emitindo uma grande rede de neuritos (Blusztajn e cols. 1992). Dibutilil cAMP eleva os níveis de mRNA de ChaT e VACHT, sendo este evento acompanhado por um aumento proporcional de ACh intracelular (Berse e Blusztajn 1995). Além disso, quando tratadas com dibutilil cAMP, SN56 expressam canais de cálcio neuronais tipo L, N e P/Q (Kushmerick e cols 2001). Esta linhagem celular expressa o VACHT, canais de cálcio e as proteínas de vesícula sináptica, sinaptotagmina, SV2 e sinaptofisina (Barbosa e cols. 1999). Estas células também possuem propriedades de células neuronais por responderem à despolarização com conseqüente aumento intracelular de cálcio (Barbosa e cols. 1999).

## **II. Objetivos**

## **II.1 Objetivo geral**

Determinar mecanismos celulares que participam no tráfego do transportador vesicular de acetilcolina.

## **II.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a relevância de resíduos de aminoácidos presentes na região carboxi-terminal do VAcHT no tráfego e direcionamento do transportador.
- Verificar se o VAcHT interage com o complexo adaptador de clatrina AP-2.
- Determinar o papel da endocitose mediada por clatrina na internalização e tráfego do VAcHT.
- Avaliar o papel de interação proteína-proteína no tráfego do VAcHT.

### **III. Material e Métodos**

### III.1 Construções utilizadas

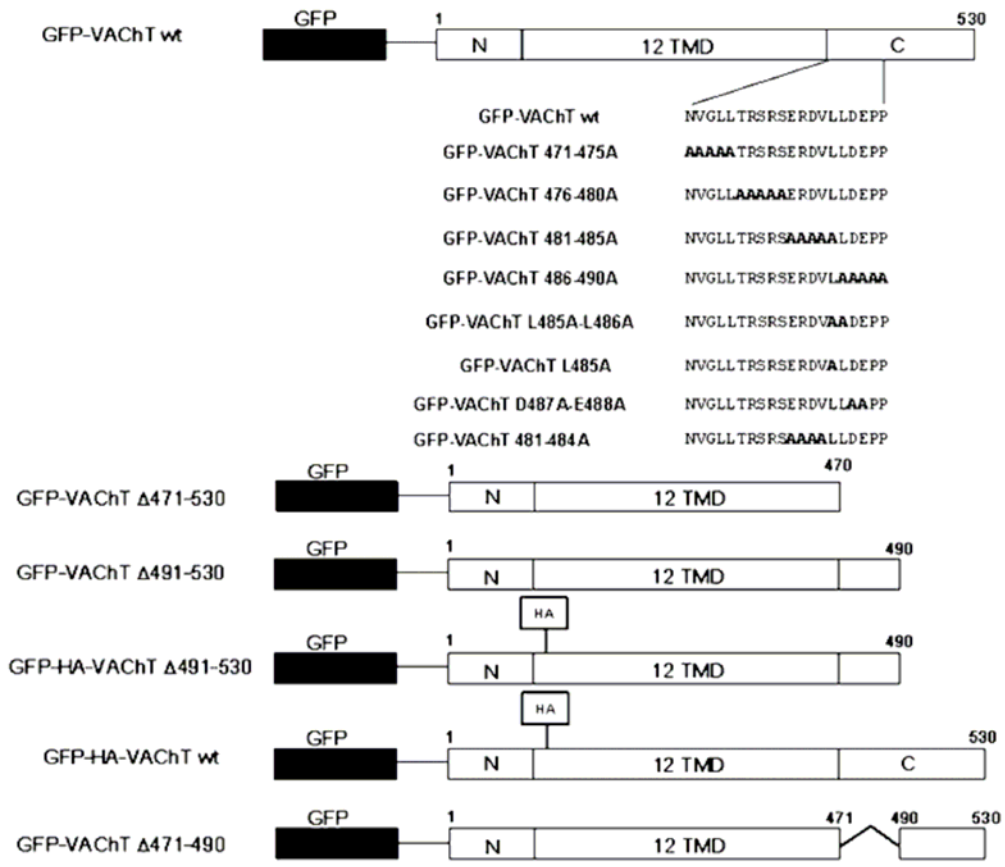
A região codificadora do VACHT de camudongo e dos mutantes de interesse desta proteína foram obtidas por PCR, adicionando sítios para enzimas de restrição para proporcionar as clonagens no vetor de expressão pEGFP-C2 (Clontech). Para a construção do clone GFP-VACHT $\Delta$ 491-530, o clone pEGFP-VACHT foi submetido a uma rodada de PCR utilizando os iniciadores VTGFPECO e 20INIBAM, o produto purificado resultante desta amplificação foi digerido com as enzimas *EcoR* I e *BamH* I, novamente purificado e ligado no vetor pEGFP-C2. As outras construções do VACHT no vetor pEGFP-C2 foram realizadas através de passos sequenciais de PCR como descrito por Ausubel e colaboradores (1991). Primeiramente duas reações foram feitas com 2 pares de iniciadores diferentes, para cada construção, tendo como molde o clone GFP-VACHT. Os produtos obtidos nestas reações iniciais foram purificados e em seguida utilizados como molde em uma nova PCR, utilizando os iniciadores externos (VTGFPECO e VTGFPBAM). O produto final foi purificado e digerido com as enzimas *EcoR* I e *BamH* I e ligado no vetor pEGFP-C2. A sequência dos iniciadores está descrita na tabela 1. Os iniciadores utilizados para cada construção foram:

- |                    |  |
|--------------------|--|
| - VACHT 471-475A   | VT5AF + VTGFPBAM / VT5AR + VTGFPECO<br>VTGFPECO + VTGFPBAM |
| - VACHT 481-485A   | VT5CF + VTGFPBAM / VT5CR + VTGFPECO<br>VTGFPECO + VTGFPBAM |
| - VACHT 486-490A   | VT5DF + VTGFPBAM / VT5DR + VTGFPECO<br>VTGFPECO + VTGFPBAM |
| - VACHT 481-484A   | VT4CF + VTGFPBAM / VT4CR + VTGFPECO<br>VTGFPECO + VTGFPBAM |
| - VACHT D487-E488A | VT2DF + VTGFPBAM / VT2DR + VTGFPECO<br>VTGFPECO + VTGFPBAM |



O cDNA que codifica para um fragmento C-terminal da proteína SEC14 *like* (aminoácidos 596-718), ligado ao vetor pACT2 (Clontech), foi obtido após a varredura de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano usando a região C-terminal do VACHT como “isca”, em experimentos de duplo híbrido em leveduras. O cDNA que codifica a região C-terminal do VACHT (aminoácidos 471-530) foi clonado no sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor pGBKT7 (Clontech) para os experimentos de duplo híbrido em leveduras com SEC14 *like*.

Sec14 *like*-myc foi amplificado com os primers descritos na tabela 1 usando como molde o cDNA de uma biblioteca de células Hela. Posteriormente, o produto da PCR foi digerido, purificado e então ligado no vetor pCMV-myc.



**Figura 2: Ilustração esquemática das construções do GFP-VACHT e mutantes utilizados neste trabalho.** O retângulo em preto representa o cDNA da GFP, conforme indicado, e o em branco o cDNA do VACHT. N corresponde à região N-terminal, 12TMD representa os 12 domínios transmembrana e C a região C-terminal. Deleções no domínio C-terminal do VACHT foram criadas. Parte desta sequência foi indicada para mostrar os resíduos que foram substituídos por alanina. O epítipo HA está presente em duas construções, localizado na alça entre os domínios transmembrana 1 e 2.

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para a amplificação do VChT selvagem e mutantes, e do Sec14.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Construção
VTGFPECO	TTGTGAATTCATGGAACCCACCGCGCCAAC	VChT
VTGFPBAM	TTGTGGATCCGTCTGCTAGCTGCGGGAGTA	
VTGFPECO	TTGTGAATTCATGGAACCCACCGCGCCAAC	VChT
20INIBAM	TTGTGGATCCTACGGCGGTTTCATCAAGCAG	Δ491-530
VT5AF	GCAGCCGCAGCGGCTACACGCTCGCGTTCCGAG	VChT
VT5AR	AGCCGCTGCGGCTGCACGCAAGAGCAATAGGACCG	471-475A
VT5CF	GCAGCCGCAGCGGCTCTTGATGAACCGCCGCAG	VChT
VT5CR	AGCCGCTGCGGCTGCGGAACGCGAGCGTGTAAG	481-485A
VT5DF	GCAGCCGCAAGCGGCTCAGGGTCTGTACGACGCG	VChT
VT5DR	AGCCGCTGCGGCTGCCAGCACATCGCGCTCGGA	486-490A
VT4CF	GCAGCCGCAGCGCTGCTTGATGAACCGCCG	VChT
VT4CR	CAGCGCTGCGGCTGCGGAACGCGAGCGTGTAAG	481-484A
VT2DF	CTGCTTGCTGCACCGCCGCAGGGT	VChT
VT2DR	CGGCGGTGCAGCAAGCAGCACATC	D487A E488A
VTL485AF	GATGTGGCGCTTGATGAACCG	VChT
VTL485AR	ATCAAGCGCCACATCGCGCTC	L485A
LeuAlaF	CGCGATGTGGCGGCTGATGAACCGCCGCAG	VChT
LeuAlaR	AGCCGCCACATCGCGCTCGGAACG	L485/L486A
VTSEM20F	CAGGGTCTGTACGACGCGAT	VChT
VTSEM20R	GTCGTACAGACCCTGACGCAAGAGCAATAGGACCG	Δ471-490
Sec143F	AATTGGCCATGGAGGCCATGGTGCAAAAATACCAAGTC	Sec14 <i>like</i> -
Sec14R	AATTCTCGAGCTACCTGGAGATATGGAGC	myc

### **III.2 Cultura de Células**

#### **SN56**

Células SN56 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Bruce Wainer, Department of Pathology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA. Estas células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Life Technologies), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco Life Technologies) e 2mM de glutamina, em garrafas de cultura de 50 mL em estufa a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram diferenciadas neste mesmo meio, mas sem soro fetal bovino e suplementado com 1mM de dibutil AMPc (Sigma) por 2 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias, exceto durante a diferenciação, quando era trocado a cada 24 horas.

#### **PC12**

Células PC12 expressando estavelmente o VACht, com um epitopo HA na alça entre os domínios transmembrana 1 e 2, foram cedidas pelo Dr. Robert H. Edwards (Departments of Neurology and Physiology, UCSF School of Medicine, USA). Estas células foram mantidas em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, 10% de soro equino, 1% de penicilina/estreptomicina e G418 (500µg/mL), em garrafas de cultura de 50 mL em estufa a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio era trocado a cada 2 dias.

Células PC12 expressando estavelmente GFP-HA-VACht WT e GFP-HA-VACht $\Delta$ 491-530 foram geradas pela Professora Vânia Prado (Departamento de Bioquímica e Imunologia – UFMG). O vetor pEF-His6 (3µg) (Invitrogene), que confere resistência ao antibiótico blasticidina foi utilizado para eletroporar as células, juntamente com GFP-HA-VACht WT (9µg) e GFP-HA-VACht $\Delta$ 491-530(9µg). Uma

seleção com blasticidina (5µg/mL) foi realizada inicialmente, e em seguida o antibiótico G418 foi utilizado (500µg/mL). Estas células foram mantidas nas mesmas condições acima citadas, com a adição de G418 (500µg/mL) a cada dois dias.

As células PC12 foram diferenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino e 50ng/mL de NGF (Fator de Crescimento Neuronal – Sigma) por 5 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias, exceto durante a diferenciação, quando foi trocado a cada 24 horas.

### **III. 3 Transfecção**

#### Lipofectamina

Vinte e quatro horas antes da transfecção as células foram plaqueadas, numa densidade de  $5 \times 10^4$  células (SN56) por lamínula de 22x22 mm, e mantidas em meio com soro. No caso das células PC12,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em lamínula e diferenciadas durante 5 dias conforme descrito acima. Para os experimentos com as células PC12 expressando estavelmente HA-VACHT, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células foram plaqueadas diretamente em placas de 35mm.

A transfecção foi realizada utilizando lipossomas catiônicos, seguindo-se as instruções do fabricante (Lipofectamina 2000, Gibco Life Technologies). Utilizamos o meio DMEM (Gibco Life Technologies) sem soro e sem antibiótico durante a transfecção.

Nos experimentos de co-transfecção em SN56 3-4µg de DNA foram utilizados, seguindo-se as razões de 3:1 de construções do GFP-VACHT e myc-VAMP2, e 1:4 de GFP-VACHT e AP180-C.

As células PC12 expressando estavelmente HA-VACHT foram transfectadas com 2 $\mu$ g de AP180-C e 0,2 $\mu$ g do pEGFP. Nestes experimentos a GFP serviu como um repórter para a transfecção.

#### Eletroporação

Células PC12 foram transfectadas por eletroporação para os experimentos de co-imunoprecipitação. As células foram mantidas em frascos de cultivo de 100mm até atingirem uma confluência em torno de 90%. O meio de cultura era removido, e as células lavadas uma vez com PBS, contendo 1mM de EDTA. Em seguida, 1mL de PBS-EDTA era adicionado a cada frasco e incubava-se por cerca de 1 minuto. Adicionava-se então 2mL de DMEM e soltava-se as células com o auxílio de uma pipeta. As células eram centrifugadas a 1000g, em temperatura ambiente por 5 minutos. Removia-se o sobrenadante com pipeta Pasteur e as células eram ressuspensas em 4mL de citomix (25mM de HEPES pH 7.6, 120mM de KCl, 10mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15mM de CaCl<sub>2</sub>, 5mM de MgCl<sub>2</sub> e 2mM de EGTA). Centrifugava-se novamente nas mesmas condições citadas acima, e ressuspensava-se as células novamente em citomix. O volume de citomix era calculado baseado no número de placas. Utilizava-se 500 $\mu$ L de células para cada cubeta (0,4cm - BioRad). O DNA era então adicionado às células nas cubetas. Antes de dar o choque, as células eram rapidamente ressuspensas. O aparelho utilizado foi o Gene Pulser II High Cap 5000 (Bio-Rad), e os parâmetros utilizados foram: capacitância 1 e 300 volts. A quantidade de DNA utilizada foi de 10-15 $\mu$ g.

### **III.4 Imunofluorescência**

Após 48 de horas de transfecção, as células SN56 foram lavadas 3 vezes com PBS 1x (tampão fosfato salina, pH 7.4) e então fixadas com paraformaldeído 3% (p/v em tampão fosfato salina) durante 20 minutos. As células foram novamente

lavadas 3 vezes e então incubadas na solução de bloqueio/permeabilização (PBS 1x contendo 2.5% de soro de cabra, 0.05% de nonidet P-40 e 1% de albumina bovina) por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo primário (diluído na solução de bloqueio/permeabilização) por uma hora à temperatura ambiente. Utilizou-se anticorpos monoclonais anti-HA (1:600, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e anti-myc (1:500, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS 1x. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com Alexa 568<sup>TM</sup> (1:500, Molecular Probes) durante 40 minutos. Experimentos controles, com omissão do anticorpo primário, foram realizados para verificar a especificidade da marcação.

### **III.5 Marcação com transferrina**

As células foram incubadas com 40µg/mL de transferrina marcada com Alexa 568 (Tfn-568 – Molecular Probes) a 37°C em estufa com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato gelado e fixadas com paraformaldeído (3% p/v em tampão fosfato) por 20 minutos.

### **III.6 Aquisição de imagens**

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (20-25°C). Lamínulas de 22x22 mm eram transferidas para câmara de perfusão onde um banho de 400 µL é formado. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência confocal, Bio-Rad MRC 1024, utilizando o software LASERSHARP 3.0 acoplado a um microscópio Zeiss (Axiovert 100), com objetivas de imersão em água

(40x) e óleo (100x) e Zeiss LSM-510 Meta com uma objetiva de imersão em óleo (63x). Para excitar as preparações foram utilizados laser UV de argônio (488nm) ou laser de argônio/kriptônio (através das linhas de 488nm ou 568nm), e a luz emitida foi selecionada com os filtros 522/35 para GFP, HQ598/40 para Alexa 568. As imagens obtidas foram em seguida processadas e analisadas utilizando os programas Confocal Assistant 4.02, Adobe Photoshop 7.0 e Metamorph 4.0.

### **III.7 Análises de co-localização**

A co-localização entre as diversas construções do GFP-VACHT e myc-VAMP2 foi quantificada com o auxílio do programa METAMORPH. O limiar de fluorescência foi definido e a quantidade de estruturas fluorescentes, verde para as construções do VACHT e vermelho para myc-VAMP2, foi automaticamente e independentemente detectada pelo programa. Finalmente, cada imagem verde e vermelha obtida foi sobreposta, e a quantidade de pixels onde ambas as cores foram detectadas foi calculada.

### **III.8 Extrato protéico bacteriano**

Extrato protéico bacteriano foi obtido de células BL21 transformadas com GST ou GST-Cterminal do VACHT. A expressão protéica foi induzida com a adição de 0.6mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) durante 4 horas. Após a indução, as células foram precipitadas a 800g durante 10 minutos a temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 10mL de PBS 1x. Em seguida, três etapas de congelamento e descongelamento em gelo seco com etanol foram realizadas. As células foram maceradas utilizando-se “potter” e pistilo, incubadas a 37°C por 10 minutos. Adicionou-se 1% Triton X-100 e a mistura foi incubada a 37°C com agitação

lenta. Procedeu-se com uma centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4°C. Esta parte do trabalho foi realizada por Cristina Martins e Silva.

### **III. 9 Extrato protéico de córtex de rato**

Córtex de rato foi macerado em tampão RIPA (100mM de Tris-HCl pH 7.4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0.1% de SDS, 1% de ácido deoxicólico e inibidor de proteases) utilizando “potter” e pistilo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 9.000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração protéica foi determinada através do método de Bradford (1976). Proteínas presentes no sobrenadante foram utilizadas no experimento de “pull down” do complexo adaptador de clatrina AP-2.

### **III.10 Ensaio "Pull Down"**

A região C-terminal do VACHT foi expressa em fusão com GST (glutathione S-transferase) em bactéria. Extrato protéico bacteriano (500µg) foi incubado com esferas de glutathione sepharose durante 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Em seguida os tubos foram centrifugados a 500g durante 5 minutos e o sobrenadante removido. O precipitado foi lavado com PBS 1x, contendo 1mM de PMSF e 1% de triton X-100. Os tubos foram novamente centrifugados a 500g durante 5 minutos e o sobrenadante removido. Repetiu-se o procedimento de lavagem para um total de 3 lavagens. Extrato protéico de córtex (500µg) foi então incubado por 1 hora a 4°C com esferas de glutathione sepharose previamente ligadas a GST ou GST-C-terminal do VACHT. Após a incubação, as esferas foram precipitadas e lavadas 5 vezes utilizando tampão de homogeneização (100mM de Tris-HCl pH 7.4, 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% dodecil

sulfato de sódio (SDS), 1% ácido deoxicólico e uma mistura de inibidores de protease). As proteínas ligadas às esferas foram liberadas quando aquecidas a 100°C por 3 minutos em tampão de amostra para SDS-PAGE 2X (SDS 0,4% (p/v), glicerol 0,4% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v), azul de bromofenol 0,0002% (p/v) e Tris-HCl 25 mM pH 6,8). As proteínas foram posteriormente separadas em gel 8% (SDS-PAGE).

### **III.11 Western Blot**

Após a eletroforese, as proteínas separadas no gel foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose (Towbin e cols.. 1979). As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas foram bloqueadas em tampão fosfato salina contendo 0,3% de tween 20 e 5% de leite desnatado durante 1 hora e então incubadas com o anticorpo monoclonal anti-subunidade  $\alpha$  do complexo adaptador de clatrina AP2 (diluído na solução de bloqueio 1:200, Sigma) durante 1 hora, com agitação. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:1000, Sigma) por 1 hora, com agitação. A detecção das bandas correspondentes às proteínas foi obtida por quimioluminescência utilizando o kit ECL-Plus (Amersham-Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas foram expostas e reveladas em filme de raio-X (Kodak, Brasil).

### **III.12 Duplo híbrido em leveduras**

A técnica de duplo híbrido em leveduras foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Gietz e Schiestl (1995). Resumindo, leveduras *S. cerevisiae* haplóides AH109 foram crescidas por 16 horas à 30°C em 20mL de meio YPDA (peptona 2%, extrato de levedura 1%, glicose 2%, adenina 0,003% pH 7,0)

sob agitação. Preparou-se uma diluição desta cultura (cerca de 4mL da cultura líquida em 40mL de meio YPDA) e colocou-se novamente para crescer à 30°C até atingir a DO<sub>600</sub> de 0,8 (cerca de 8x10<sup>6</sup> células). As leveduras foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000g, em temperatura ambiente, ressuspensas em 25 mL de água estéril e centrifugadas novamente. As células foram lavadas com 1 mL de acetato de lítio 100 mM, transferidas para um tubo de microcentrífuga e centrifugadas por 15 segundos a 10.000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensado novamente em acetato de lítio 100 mM (400 µL). Alíquotas de 50 µL foram distribuídas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, centrifugadas (10.000g – 15 segundos) e tiveram seu sobrenadante descartado. Posteriormente, adicionou-se lentamente os reagentes de transformação, seguindo a ordem: 240 µL PEG (50% W/V, Clontech), 36 µL acetato de lítio 1,0 M (Clontech), 25 µL de DNA de espermatozoides de salmão (3 µg/mL, Invitrogen) previamente desnaturado (fervido por 5 minutos e rapidamente resfriado em gelo) e os pares de vetores (~0,5 – 1 µg de cada vetor) de acordo com as combinações experimentais a serem testadas. Os tubos foram vigorosamente agitados (~1 minuto), incubados em estufa à 30°C por 30 minutos. Em seguida foram incubados em banho-maria à 42°C (*heat shock*) por 25 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 15 segundos a 10.000g, o sobrenadante retirado e o precipitado ressuspensado em 1mL de água estéril. As leveduras co-transformadas foram plaqueadas em meio mínimo SD Agar base (Clontech) contendo o suplemento DO -Leu/-Trp (Yeast Nitrogen Base 0,17%, sulfato de amônio 0,5%, glicose 2%) para avaliar a eficiência de transformação. As interações protéicas foram determinadas através do plaqueamento das leveduras em placas contendo meio mínimo SD Agar base (Clontech) contendo o suplemento DO -Leu/-Trp/-His/-Ade, na presença ou ausência de 3-AT na concentração de 5 e

10mM, para verificar a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*. Nos experimentos com as subunidades de AP2, as leveduras co-transformadas foram plaqueadas em meio mínimo SD Agar base (Clontech) contendo o suplemento DO - Leu/-Trp, para avaliar a eficiência de transformação, e em meio contendo o suplemento DO -Leu/-Trp/-Ade para verificar as interações específicas.

### **III.13 Co-imunoprecipitação**

Os experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados de acordo com as indicações do fabricante das esferas de agarose revestidas com anticorpo anti-HA (Sigma-Aldrich). Foram utilizadas células PC12 expressando estavelmente VACHT-HA e células selvagens. As células foram tranfectadas, por eletroporação, com SEC14-Myc. Após 48 horas de transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e removidas mecanicamente. A suspensão de células foi centrifugada à 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e ao precipitado foi adicionado tampão de lise (50mM Tris-HCl pH7,4, NaCl 150mM, 1mM EDTA, 1% triton X-100), contendo coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). Os lisados foram transferidos para tubos de 1,5 mL e colocados em um aparelho rotatório na câmara fria (4°C) por uma hora. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e a concentração protéica foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Soluções contendo 800 µg de cada amostra foram incubados com 40 µL de esferas de agarose revestidas com anticorpo anti-HA (Sigma-Aldrich), previamente lavadas por 5 vezes com PBS, em aparelho rotatório na câmara fria (4°C) por duas horas. As esferas foram centrifugadas e lavadas 4 vezes com PBS, sendo posteriormente ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 2X. As amostras foram então separadas em gel SDS-PAGE,

transferidas para membrana de nitrocelulose, sendo posteriormente reveladas por imunoblot, onde se utilizou anticorpos anti-Myc (1:3000, para detectar SEC14, Covance Research Products) e anti VACHT (1:1000 Phoenix Pharmaceuticals).

### **III.14 Biotinilação de proteínas de superfície celular**

Os experimentos de biotinilação foram realizados de acordo com Deken e colaboradores (2003). Células SN56 expressando transientemente o GFP-VACHT wt ou os mutantes GFP-VACHT L485A/L486A, GFP-VACHT 481-484A, GFP-VACHT 481-485A, GFP-VACHT L485A foram utilizadas nos experimentos de biotinilação.  $2 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placas de 100mm e transfectadas com  $10 \mu\text{g}$  de DNA em cada uma das condições citadas acima. Quarenta e duas horas após a transfecção, as células foram lavadas e incubadas no gelo com PBS/CM (PBS suplementado com  $\text{MgCl}_2$  1,0mM e  $\text{CaCl}_2$  0,1mM) durante 10 minutos. As proteínas de membrana plasmática foram biotiniladas usando sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, Rockford, IL) por uma hora no gelo. Para remover as moléculas de biotina não ligadas, as células foram lavadas e incubadas por 30 min com 100mM de glicina gelada em PBS/CM, seguido de três lavagens com PBS/CM. Em seguida, as células foram lisadas em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH7,4, NaCl 150mM, 1mM EDTA, 1% triton X-100), contendo coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). As proteínas biotiniladas foram separadas das não biotiniladas utilizando-se esferas ligadas à neutravidina (Pierce, Rockford, IL). 800  $\mu\text{g}$  de lisado total foram incubados com as esferas de neutravidina durante 90 minutos à  $4^\circ\text{C}$ , com agitação. Em seguida, as esferas foram centrifugadas a 2000g por 2 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e lavadas 3 vezes com tampão de lise e uma vez com PBS. Posteriormente, tampão de amostra para SDS-PAGE 2x foi adicionado às esferas, as proteínas ligadas foram liberadas

durante a incubação a 50°C por 15 minutos. As proteínas biotinizadas e o lisado celular total foram separadas em gel SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF, sendo posteriormente reveladas por imunoblot com anticorpo policlonal anti-VACHT (1:1000, Phoenix Pharmaceuticals).



## **IV. Resultados**

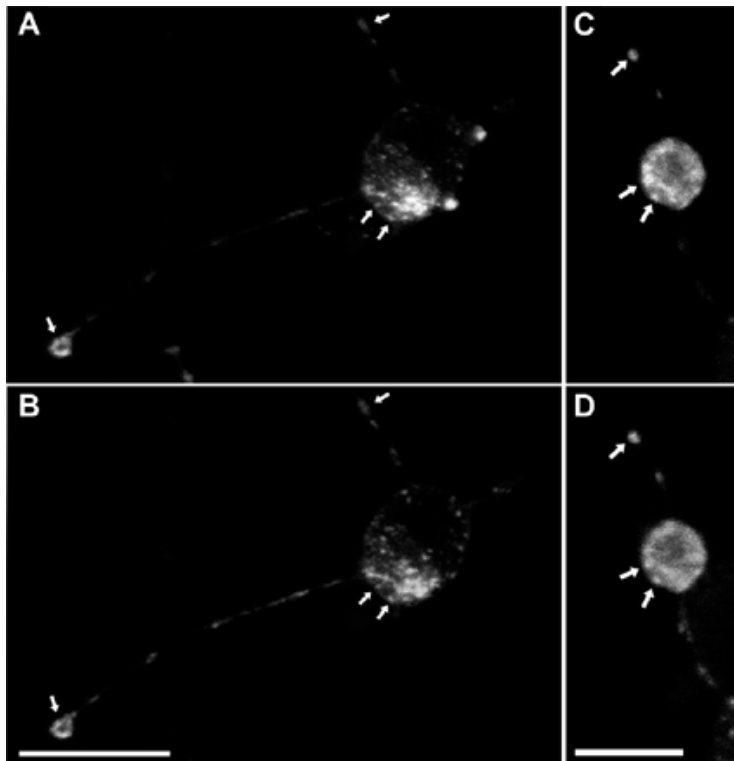
#### **IV.1 GFP-VACHT colocaliza-se com VAMP2 em organelas tipo vesículas sinápticas**

O estudo de tráfego de proteínas tem sido ampliado graças ao surgimento de ferramentas moleculares como a proteína fluorescente verde, a GFP. A visualização por microscopia de proteínas de interesse em fusão com a GFP facilita o estudo da distribuição subcelular destas proteínas. Além disso, a existência de diversas sondas e marcadores para as organelas citoplasmáticas contribui de maneira significativa para este estudo. Por isso, optamos por utilizar construções onde o VACHT é expresso em fusão à GFP. Estudos anteriores do nosso grupo mostram que a GFP não altera a distribuição subcelular do VACHT. A proteína GFP se apresenta completamente solúvel, quando expressa transitoriamente em células SN56 (Santos e cols. 2001), enquanto GFP-VACHT apresenta uma distribuição pontuada no corpo celular e varicosidades, bastante semelhante à distribuição observada para o VACHT selvagem (Santos e cols. 2001).

Realizamos experimentos de co-transfecção com GFP-VACHT e myc-VAMP2 (marcador de vesículas sinápticas) para avaliarmos se o VACHT seria direcionado para organelas tipo vesículas sinápticas, quando expresso em fusão à GFP. Após 48h de transfecção, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal. Para a visualização de myc-VAMP2 utilizamos anticorpo monoclonal anti-myc. A análise das imagens das células SN56 co-expressando GFP-VACHT e myc-VAMP2 mostra um alto grau de colocalização entre estas proteínas. A co-localização se estendeu pelo soma (Fig 3A e B), e varicosidades dos processos (Fig 3C e D), como pode ser visualizado na figura 3. Utilizamos o programa de análises Metamorph para quantificar a co-localização entre estas proteínas. Foram analisadas 28 células, obtidas em 3 experimentos independentes,

e observou-se aproximadamente 80% de colocalização entre GFP-VACHT e myc-VAMP2 (Tabela 1). Como já havia sido demonstrado que VAMP2 está presente em organelas tipo vesículas sinápticas (Volkmandt e cols. 2002; Ribeiro e cols. 2003), a colocalização do VACHT com esta proteína sugere que GFP-VACHT seja direcionado corretamente quando expresso em células SN56. Além disso, estes resultados sugerem que estas duas proteínas podem utilizar as mesmas vias de tráfego. Ahmari e colaboradores (2000) observaram, em neurônios de hipocampo, a presença de estruturas móveis que eles denominaram “transport packets”, contendo diversos componentes sinápticos, tais como VAMP2, sinapsina, anifisina, SV2 e a subunidade  $\alpha_{1a}$  de canal de cálcio. Estes dados sugerem que GFP-VACHT também pode estar presente nestas estruturas móveis.

A função do VACHT, assim como a localização, parece não ser afetada pela presença da GFP. Estudos realizados em colaboração com o Professor Stanley Parsons (Department of Chemistry and Biochemistry and Neuroscience Research Institute, University of California, Santa Barbara, California, USA) demonstraram que GFP-VACHT se liga ao vesamicol com afinidade similar à do VACHT selvagem, e que também transporta acetilcolina (Ferreira e cols. 2005).



**Figura 3: Colocalização entre GFP-VACHT e myc-VAMP2.** Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-VACHT e myc-VAMP2 e examinadas após 48 horas. **(A)** e **(C)**: imagens mostrando a distribuição do GFP-VACHT. **(B)** e **(D)**: imagens mostrando a distribuição de VAMP2. As imagens **(C)** e **(D)** representam uma varicosidade de outra célula, onde pode ser observado grande co-localização entre as duas proteínas. As imagens representam a projeção de todas as fatias ópticas obtidas. Setas indicam colocalização no corpo celular e na varicosidade. A e B, Barra = 20 $\mu$ m, C e D, Barra = 10 $\mu$ m.

**Tabela 2: Porcentagem de co-localização entre as diferentes construções do GFP-VACHT e myc-VAMP2<sup>a</sup>**

Construção	Porcentagem $\pm$ SEM	Número de células
GFP-VACHT wt	80 $\pm$ 3	28
GFP-VACHT 481-485A	31 $\pm$ 3	21
GFP-VACHT 486-490A	55 $\pm$ 5	17
GFP-VACHT 481-484A	73 $\pm$ 3	20
GFP-VACHT D487A-E488A	77 $\pm$ 4	20

<sup>a</sup> células SN56 co-transfectadas

## **IV.2 Os aminoácidos 481-490 da região C-terminal parecem conter os sinais relevantes no tráfego do VACHT**

Estudo anterior sugere que os aminoácidos da região C-terminal são críticos para a distribuição subcelular do VACHT (Varoqui e Erickson 1998). A ausência da sequência C-terminal abole completamente a distribuição pontuada do transportador, e sua fluorescência é observada por toda a célula, sem compartimentalização definida (Santos 2002; Ferreira e cols. 2005). Dentro da sequência C-terminal, os 20 primeiros aminoácidos parecem conter os sinais mais determinantes para o tráfego do transportador (Santos 2002; Ferreira e cols. 2005). A proteína contendo a região N-terminal, os 12 domínios transmembrana e os 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal (GFP-VACHT $\Delta$ 491-530) trafega normalmente, apresentando uma distribuição semelhante à da proteína selvagem e alto grau de co-localização com HA-VACHT (Santos 2002; Ferreira e cols. 2005). Os estudos iniciais, realizados no laboratório de neurofarmacologia, compararam a co-localização de alguns mutantes do VACHT com a proteína selvagem. No entanto, é possível que a proteína selvagem interaja com os mutantes, e os retornem para a via de tráfego correta. Tem sido descrito que alguns transportadores, como por exemplo o transportador de dopamina (DAT), possuem motivos de dimerização que favorecem a oligomerização (Sitte e cols. 2004). No caso do DAT, a oligomerização tem um papel importante no direcionamento do transportador para a membrana plasmática e até mesmo para a sua função (Sitte e cols. 2004). Para evitarmos esse possível problema de oligomerização, realizamos os experimentos de co-localização entre os mutantes do VACHT com a proteína VAMP2, em células SN56. Mutantes com alterações na sequência de 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal foram utilizados (figura

2), na tentativa de elucidar quais os resíduos, dentro desta região, são de fato relevantes para o tráfego do VACHT. A distribuição dos mutantes foi avaliada com relação à localização em vesículas tipo sinápticas.

Um alto grau de co-localização entre o mutante 471-475A (fig 4A, aminoácidos 471-475 substituídos por alanina) e myc-VAMP2 foi observado (fig 4B), sugerindo que estes aminoácidos não são fundamentais para o tráfego do transportador. Este mutante também apresenta alto nível de co-localização com HA-VACHT (Santos 2002; Ferreira e cols. 2005). Como pode ser observado nas figuras 4A e B (setas), há um grande número de vesículas que apresentam marcação para GFP-VACHT 471-475A e myc-VAMP2, tanto no soma quanto nos processos e varicosidades. Nesta sequência de cinco aminoácidos existem dois resíduos de leucina (L474 L475) que aparentemente não exercem papel de sinal de direcionamento e/ou internalização para o VACHT. Motivos baseados em leucina parecem necessitar de uma distância mínima de aproximadamente 6-11 aminoácidos relativo aos domínios transmembrana, para serem reconhecidos por proteínas envolvidas com o tráfego intracelular (Bonifacino e Traub 2003).

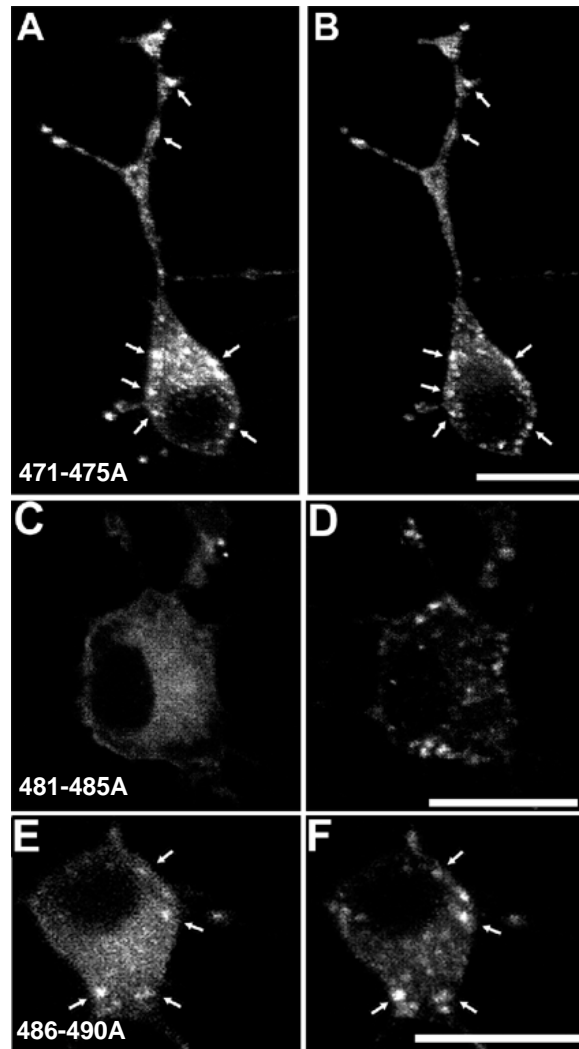
O mutante GFP-VACHT 476-480A (aminoácidos 476-480 substituídos por alanina) parece trafegar normalmente em células SN56, além de apresentar alto grau de co-localização com HA-VACHT ( dados não mostrados, Santos 2002; Ferreira e cols. 2005).

O mutante GFP-VACHT 481-485A (fig 4C, aminoácidos 481-485 substituídos por alanina) apresentou baixa co-localização com myc-VAMP2 (fig 4D, tabela 1), além de exibir uma distribuição bastante diferente da proteína selvagem. Na maioria das células analisadas observamos um ligeiro acúmulo do VACHT na membrana do corpo celular (fig 4C), embora a proteína tenha se

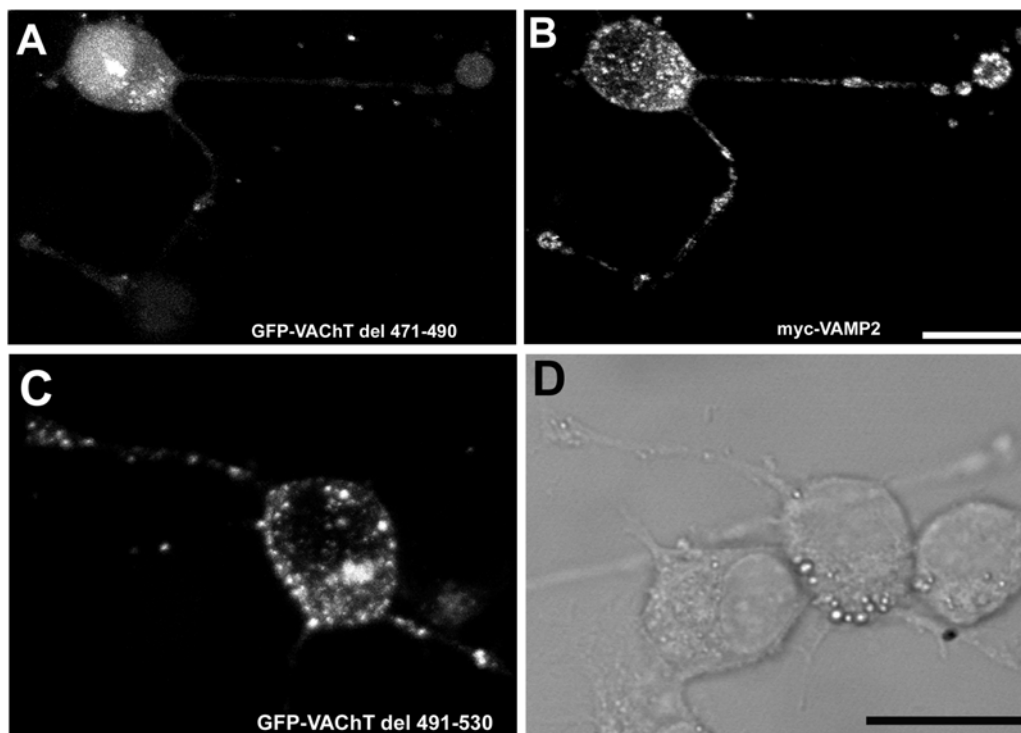
apresentado mais concentrada no citoplasma. Este mutante não apresenta a primeira leucina (L485) do motivo baseado em leucina (L485/L486), previamente caracterizado na região C-terminal do VACHT. Este motivo possui papel relevante na endocitose do VACHT (Tan e cols. 1998; Santos e cols. 2001).

A proteína mutada GFP-VACHT 486-490A (fig 4E, aminoácidos 486-490 substituídos por alanina) possui a segunda leucina do motivo baseado em leucina substituída por alanina. Apesar deste mutante não apresentar o perfil de distribuição bastante pontuado característico da proteína selvagem, verificamos que ele é ainda encontrado em algumas organelas que também apresentam myc-VAMP2 (setas, fig 4E e F). Este mutante também apresenta uma redução na co-localização com myc-VAMP2, embora a redução seja menos drástica do que o mutante GFP-VACHT 481-485A (tabela 2).

Estes dados sugerem que os aminoácidos 471-490 constituem sinais importantes para o tráfego e internalização do VACHT. Para avaliar a possibilidade que outra região do VACHT pudesse participar no tráfego do transportador, o mutante GFP-VACHT  $\Delta$ 471-490 foi construído. Este mutante possui os 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal deletados. Este mutante apresentou uma distribuição aparentemente homogênea por toda a célula (fig 5A). Pode-se notar que não há nenhuma co-localização com myc-VAMP2 (fig 5B). A distribuição deste mutante é completamente diferente da distribuição da proteína GFP-VACHT selvagem (fig 3A) e do mutante GFP-VACHT $\Delta$ 491-530, onde apenas os 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal estão presentes (Figura 5C, Ferreira e cols. 2005).



**Figura 4: A sequência de 10 aminoácidos em torno do motivo baseado em leucina contém os sinais relevantes para o tráfego de GFP-VACHT em células SN56.** Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-VACHT 471-475A e myc-VAMP2, GFP-VACHT 481-485A e myc-VAMP2, GFP-VACHT 486-490A e myc-VAMP2. Após 48 horas, as células foram examinadas através de microscopia confocal. Pode-se observar que GFP-VACHT 471-475A está presente em organelas no corpo celular e varicosidades **(A)** que também apresentam marcação para VAMP2 **(B)**. GFP-VACHT 481-485A apresentou uma distribuição mais espalhada pela célula **(C)**, sem colocalização com VAMP2 **(D)**. Notem que GFP-VACHT 481-485A apresenta um ligeiro acúmulo na membrana plasmática. GFP-VACHT 486-490A está presente em organelas no corpo celular **(E)** que colocalizam com VAMP2 **(F)**. As setas nas imagens indicam os pontos de co-localização. Imagens representativas de uma fatia óptica de 0.54  $\mu\text{m}$ . Barras=20 $\mu\text{m}$

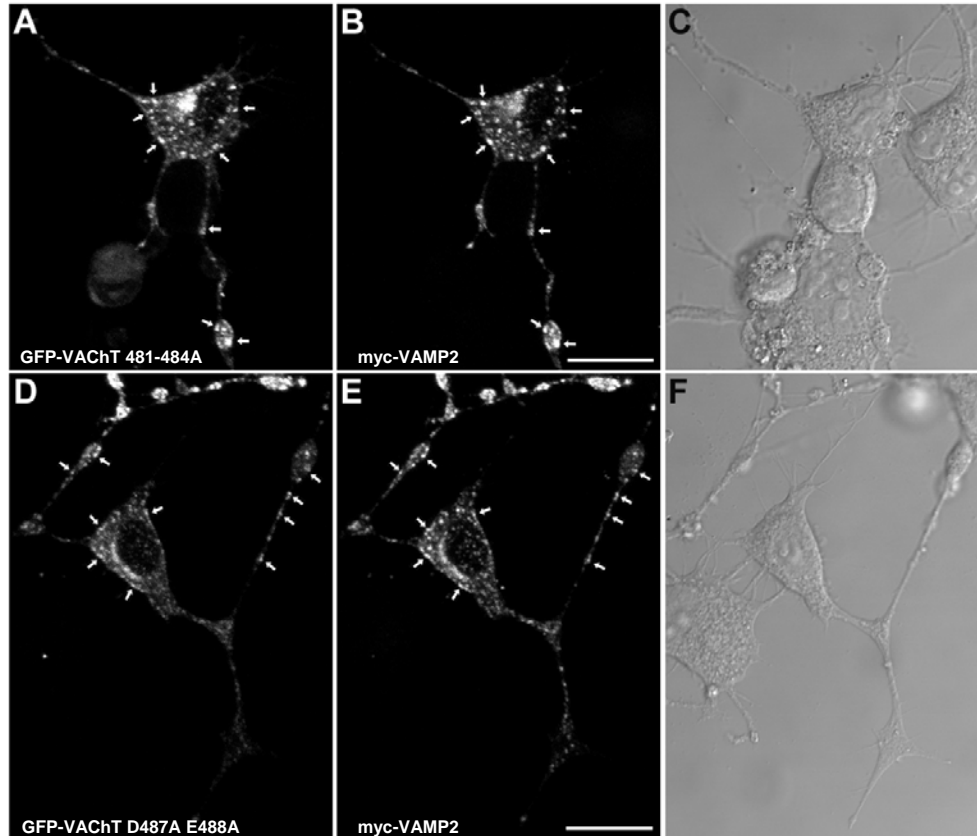


**Figura 5: A deleção dos aminoácidos 471-490 afeta a distribuição e tráfego do VACHT.** Células SN56 foram co-transfectadas com GPF-VACHT $\Delta$ 471-490 e myc-VAMP2. Após 48 horas, as células foram examinadas em microscópio de fluorescência confocal. Pode se observar a distribuição do GPF-VACHT $\Delta$ 471-490 por toda a célula **(A)**. Não foi observada nenhuma colocalização deste mutante com VAMP2 **(B)**. Em **(C)** está representada uma imagem de uma célula expressando o mutante GPF-VACHT $\Delta$ 491-530. **(D)** DIC da mesma célula mostrada em **C**. Barras=20 $\mu$ m.

### **IV.3 Os aminoácidos acídicos próximos ao motivo baseado em leucina parecem não afetar a distribuição e internalização do VACHT**

Motivos baseados em leucina, em alguns casos possuem aminoácidos acídicos nas posições -4 e -5 (Bonifacino e Traub 2003). O VACHT possui um resíduo de ácido glutâmico na posição -4 (481), além de possuir também resíduos de ácido aspártico e glutâmico nas posições 487 e 488, respectivamente.

Com o objetivo de verificar a importância destes aminoácidos acídicos no tráfego do VACHT, mutantes onde estes resíduos foram substituídos por alanina foram utilizados. Células SN56 foram co-transfectadas com estes mutantes e myc-VAMP2, e a distribuição subcelular destes foi avaliada. A análise de co-localização entre os mutantes GFP-VACHT 481-484A (fig 6A, tabela 1) e GFP-VACHT D487A E488A (fig 6D, tabela 1) e VAMP2 (figs 6, B e E) revela um alto grau de co-localização entre estas proteínas, tanto no corpo celular quanto nos processos e varicosidades. Estes dados sugerem que a substituição dos aminoácidos acídicos, próximos ao motivo di-leucina, não afetam a distribuição subcelular do transportador.

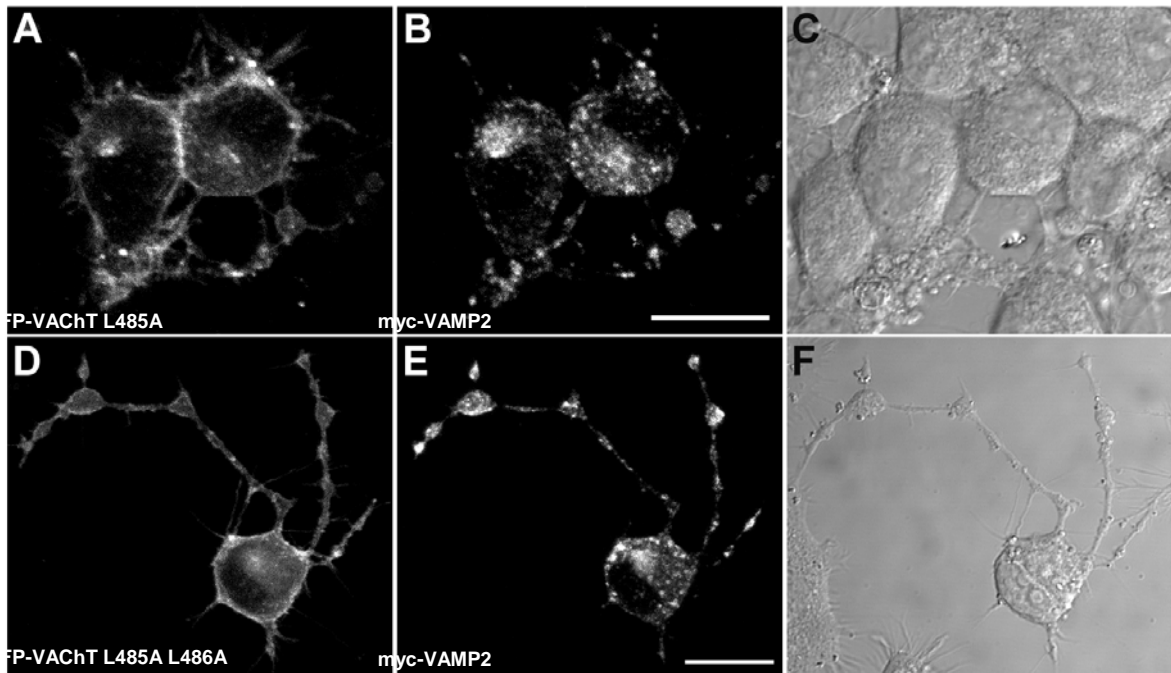


**Figura 6: Os resíduos ácidos próximos ao motivo baseado em leucina não são essenciais para o tráfego do VACht.** Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-VACht 481-484A e myc-VAMP2, e com GFP-VACht D487A E488A e myc-VAMP2. Após 48 horas de transfecção, as células foram examinadas em microscópio de fluorescência confocal. O mutante GFP-VACht 481-484A **(A)** apresenta um alto grau de co-localização com VAMP2 **(B)**. Da mesma forma, o mutante GFP-VACht D487A E488A **(D)** também apresenta um alto nível de co-localização com VAMP2 **(E)**. As setas mostram alguns aglomerados de vesículas onde pode ser observada uma clara colocação entre as proteínas. Em **C** e **F** estão apresentados DICs das células mostradas nos painéis à esquerda. Barra=20 $\mu$ m.

#### **IV.4 A primeira leucina do motivo baseado em leucina parece exercer um papel significativo no tráfego do VACHT**

O mutante GFP-VACHT 481-485A apresentou uma alteração drástica na distribuição subcelular (fig 4C) e baixa co-localização com myc-VAMP2 (tabela 1). O mutante GFP-VACHT 486-490A também apresentou alteração no tráfego (fig 4E), embora menos drástica do que o GFP-VACHT 481-485A. Por outro lado, o mutante com os aminoácidos 481-484 substituídos por alanina apresentou alto grau de co-localização com myc-VAMP2 (figs 6A e 6B, tabela 1), sugerindo que a leucina 485 deve exercer um papel importante no tráfego do VACHT.

Para verificar o papel desempenhado pela leucina 485 no tráfego do VACHT, utilizamos um mutante onde apenas este resíduo foi substituído por alanina. Analisando imagens de células SN56 co-transfectadas com o mutante GFP-VACHT L485A e myc-VAMP2 podemos observar que este mutante não é direcionado para vesículas e endossomas (fig 7A). Além disso, pode-se observar também que este mutante encontra-se predominantemente na membrana plasmática (fig 7A), diferente da distribuição altamente pontuada no soma e processos da proteína VAMP2 (fig 7B) e do GFP-VACHT wt (fig 3A). A distribuição deste mutante é semelhante à distribuição do mutante onde as duas leucinas (L485 L486) foram substituídas por alanina, que também é encontrado principalmente na membrana plasmática (fig 7D) e não apresenta co-localização com VAMP2 (fig 7E). Diferentemente do observado para o VACHT, no VMAT2 as mutações dos resíduos de isoleucina ou leucina individualmente (I483A ou L484A), não atrapalham a endocitose do transportador (Tan e cols. 1998).



**Figura 7: O resíduo de leucina 485 parece exercer um papel significativo no tráfego do VACHT.** Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-VACHT L485A e myc-VAMP2, e GFP-VACHT L485A/L486A e myc-VAMP2. Após 48 horas, as células foram examinadas através de microscopia confocal. Pode ser observado um acúmulo de GFP-VACHT L485A na membrana plasmática **(A)**. Da mesma maneira, a distribuição de GFP-VACHT L485A/L486A também concentra-se na membrana plasmática **(D)**. Em **(B)** e **(E)** estão mostradas as imagens da localização de VAMP2 das células correspondentes à esquerda. Em **C** e **F** estão apresentados DICs das células mostradas nos painéis à esquerda. Barra=20 $\mu$ m.

#### **IV.5 Os aminoácidos 481-485 parecem conter um sinal de exportação para a saída do VChT do retículo endoplasmático**

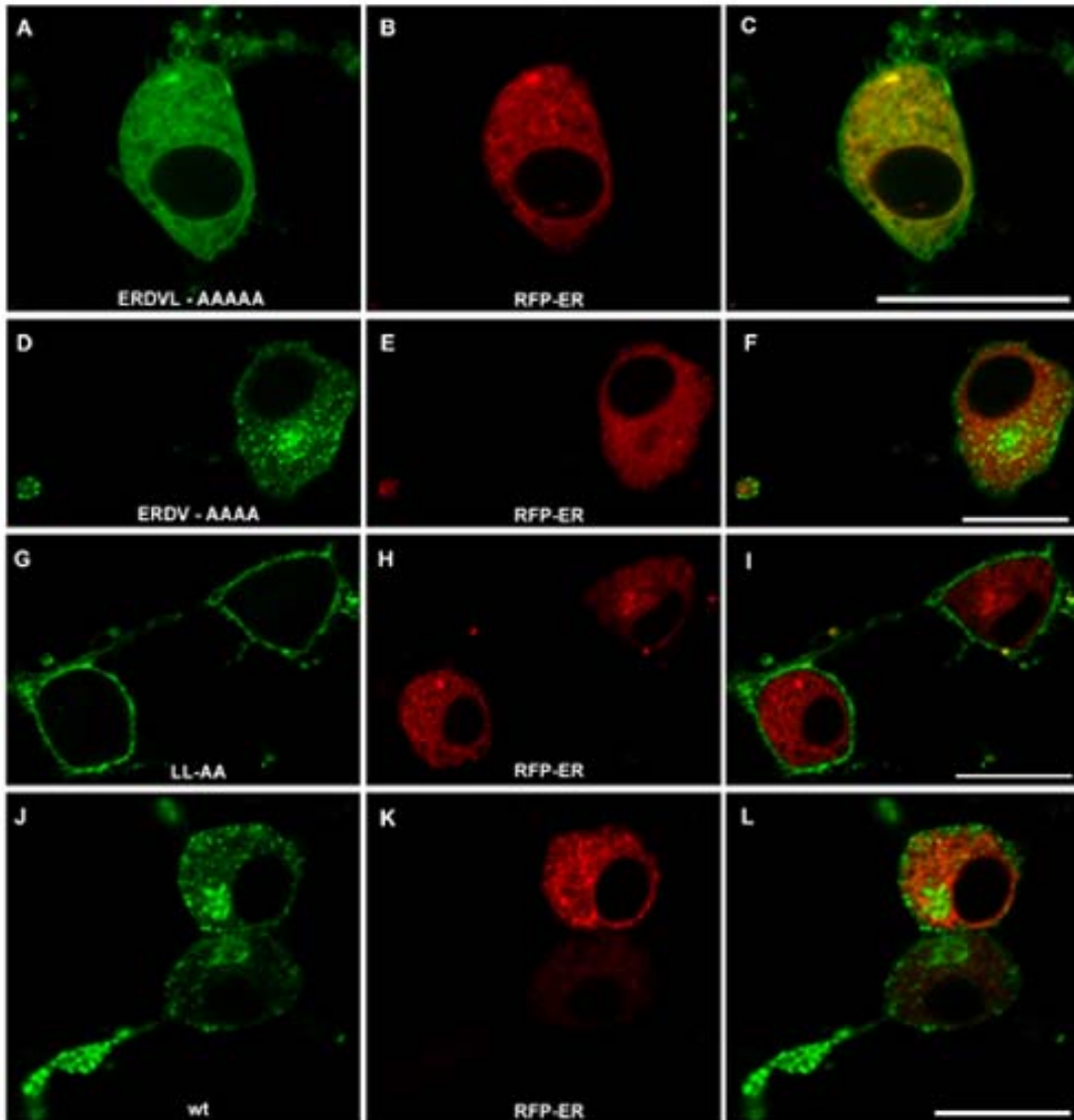
Nossos dados indicam que na sequência compreendida pelos aminoácidos 481-485 existe um sinal de tráfego para o VChT. Quando analisamos o tráfego do mutante que possui os aminoácidos 481-484 substituídos por alanina, verificamos que o seu padrão de distribuição subcelular foi semelhante ao da proteína selvagem. Por outro lado, a mutação apenas da leucina 485 levou à um acúmulo do transportador na membrana plasmática, como acontece quando as duas leucinas (485 e 486) são substituídas por alanina. Finalmente, o mutante que possui os aminoácidos 481-485 substituídos por alanina apresentou um padrão de distribuição completamente diferente dos mutantes acima citados, sugerindo a existência de outros sinais relevantes para o tráfego do VChT, além da leucina 485, dentro desta sequência de aminoácidos. Sequências de aminoácidos di-hidrofóbicos (FF-FY-LL-VV) ou di-acídicos (D/E-X-D/E) têm sido descritas como sinais de exportação do retículo endoplasmático (ER) (Mancias e Goldberg 2005). O VChT possui na sequência compreendida pelos aminoácidos 481-485 (ERDVL) tanto resíduos acídicos quanto hidrofóbicos. Desta forma, resolvemos verificar se a mutação dos resíduos 481-485 estaria retendo o VChT no ER.

Com este objetivo, células SN56 foram co-transfectadas com o mutante GFP-VChT 481-485A e um marcador de retículo endoplasmático. O marcador utilizado foi o vetor pDsRed2-ER (Clontech). Este vetor possui uma sequência de endereçamento da calreticulina que direciona a proteína RFP para o ER durante a síntese protéica, além de possuir uma sequência de retorno (KDEL) para o ER, que efetivamente mantém a proteína no retículo endoplasmático. A proteína

expressa é solúvel e espalhada por toda a rede do retículo endoplasmático. Outros mutantes também foram utilizados em experimentos de co-localização com RFP-ER, conforme mostra a figura 8.

A distribuição subcelular do mutante GFP-VACht 481-485A (fig 8A) assemelha-se à distribuição da proteína RFP-ER (fig 8B), sugerindo que os aminoácidos 481-485 podem ser importantes para a saída do VACht do ER. Foi observada co-localização entre estas proteínas tanto no citossol, quanto no envelope nuclear. Ao contrário, as outras construções testadas, GFP-VACht481-484A (fig 8D), GFP-VACht wt (fig 8J) e L485A L486A (fig 8G), não co-localizaram com RFP-ER. As duas primeiras construções apresentaram uma distribuição pontuada no soma, região perinuclear e varicosidades, como já havia sido observado nos experimentos de co-localização com myc-VAMP2 (figs 3 e 6, Tabela 1), e a última apresentou-se acumulada na membrana plasmática, como também já havia sido observado (fig 7D).

Com base nestas observações, podemos sugerir que os aminoácidos ERDVL (481-485) representam um sinal para a saída do VACht do ER, provavelmente bi-partido. Aparentemente, a presença de um dos sinais (aminoácidos di-hidróxicos ou di-básicos) já é suficiente para a exportação do VACht do ER.



**Figura 8: Os aminoácidos 481-485 parecem conter um sinal de exportação do retículo endoplasmático.** Células SN56 foram transfectadas com GFP-VACHT 481-485A e RFP-ER (A e B), com GFP-VACHT 481-484A e RFP-ER (D e E), com GFP-VACHT L485A L486A e RFP-ER (G e H) e com GFP-VACHT wt e RFP-ER (J e K). Após 48 de transfecção as células foram visualizadas em microscópio confocal. Notem que na célula mostrada em **(A)** existe um alto nível de co-localização com RFP-ER **(C)**, em amarelo). No caso dos outros mutantes **(D, G e J)** não há co-localização com RFP-ER. Em **C, F, I e J** estão as sobreposições dos respectivos painéis. As imagens são fatias ópticas, representativas de 3 a 4 experimentos realizados em dias diferentes. Os aminoácidos alterados nos mutantes foram indicados nos painéis. Barra=20 $\mu$ m.

#### **IV.6 A expressão de mutantes do VACHT na membrana plasmática**

Durante os experimentos de imunofluorescência, observamos que alguns mutantes apresentavam um acúmulo próximo à membrana plasmática, sugerindo a retenção destes mutantes na membrana plasmática. Para avaliarmos de maneira direta esta possibilidade, realizamos experimentos de biotinylation de proteínas de superfície. Células SN56 foram transfectadas com as construções GFP-VACHT, GFP-VACHT L485A L486A, GFP-VACHT L485A, GFP-VACHT 481-485A e GFP-VACHT 481-484A. Os resultados destes experimentos demonstram que todos os mutantes avaliados apresentam um nível de expressão na membrana plasmática superior ao observado para a proteína selvagem (figura 9A). A expressão de cada mutante foi corrigida pelo nível de expressão da proteína selvagem. Em seguida, os resultados obtidos para proteínas biotiniladas foram normalizados pelo nível de expressão de cada mutante avaliado (figura 9B).

Para avaliarmos se realmente apenas as proteínas na superfície celular foram biotiniladas, realizamos um controle onde as membranas foram reveladas com anticorpos anti-actina (figura 9A). Nós observamos que a actina foi visualizada apenas nas canaletas onde os lisados protéicos foram aplicados, demonstrando que não houve internalização da biotina e que o experimento foi realizado corretamente.

A detecção dos mutantes GFP-VACHT L485A L486A, GFP-VACHT L485A, GFP-VACHT 481-485A na membrana plasmática não foi um resultado totalmente inesperado, baseado nos experimentos de imunofluorescência. No entanto, a detecção do mutante GFP-VACHT 481-484A na membrana plasmática não era esperada. Estes dados sugerem que, apesar deste mutante apresentar uma distribuição subcelular semelhante ao VACHT selvagem e um alto nível de co-

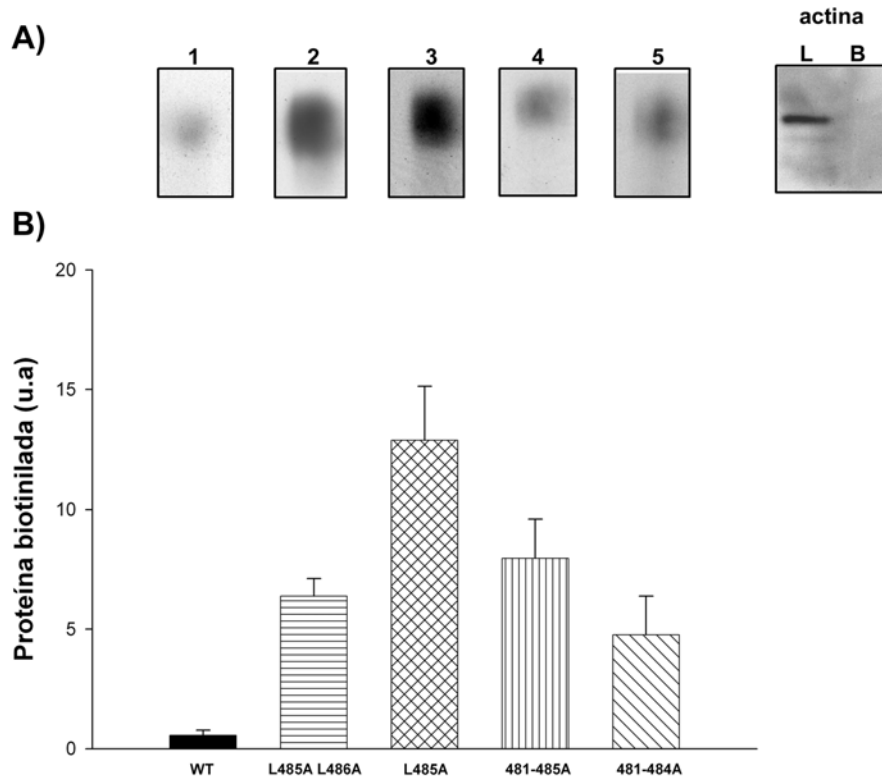
localização com VAMP2, possivelmente seu tráfego está de alguma maneira alterado.

#### **IV.7 Interação entre a região C-terminal do VACHT e o complexo adaptador de clatrina AP-2**

A observação de que uma sequência curta de aminoácidos na região C-terminal do VACHT (SERDVLL) conferia à proteína Tac, residente de membrana plasmática, a capacidade de ser internalizada, levantou a hipótese de que possivelmente esta sequência consistia em um sinal de direcionamento para a maquinaria endocítica (Tan e cols. 1998). Além disso, foi observado que a mutação dos 2 resíduos de leucina, presentes nesta sequência, afetava drasticamente a internalização do transportador (Tan e cols. 1998; Santos e cols. 2001). Nossos resultados de biotilação de proteínas de superfície demonstram que a mutação dos resíduos de leucina levam a um acúmulo do transportador na membrana plasmática. Sinais de direcionamento baseados em leucina são, muitas vezes, reconhecidos por complexos adaptadores de clatrina, os APs (Bonifacino e Traub 2003).

Desta forma, resolvemos verificar se a região C-terminal do VACHT interage com o complexo AP-2, envolvido com a internalização a partir da membrana plasmática (Kirchhausen 2000). Para isto, realizamos experimentos de precipitação utilizando a GST (glutathione-S-transferase).

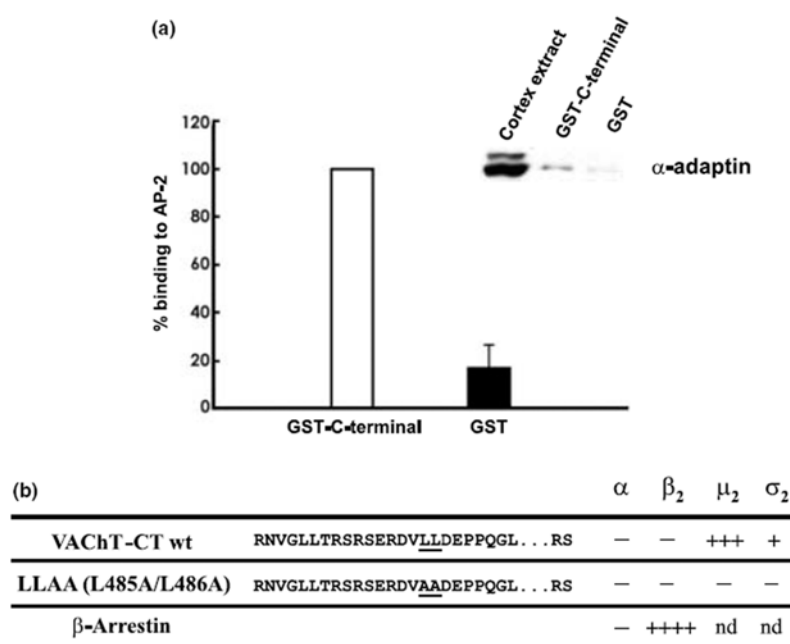
O experimento consistiu em expressar a região C-terminal do VACHT em fusão à GST, precipitar esta proteína de fusão utilizando esferas de sefarose ligadas à glutathione e, após a precipitação, utilizar extrato protéico de córtex de cérebro de rato como fonte do complexo AP-2. Utilizando anticorpos contra a subunidade  $\alpha$  de AP-2, observamos que a região C-terminal do VACHT foi capaz de precipitar o



**Figura 9: Expressão de mutantes do VACHT na membrana plasmática.** Filmes de raio x, com diferentes tempos de exposição foram digitalizados através do densitômetro GS-700 Bio-Rad e analisados com o programa Multi-Analyst. **(A)** Proteínas biotiniladas detectadas através de imunoblot com anticorpos anti-VACHT: **1)** VACHT wt, **2)** VACHT L485A L486A, **3)** VACHT L485A, **4)** VACHT 481-485A, **5)** VACHT 481-484A. Após a regeneração das membranas, anticorpos anti-actina foram utilizados para verificarmos se apenas as proteínas presentes na superfície celular foram biotiniladas (L: lisado, B: biotinilado). **(B)** Quantificação das proteínas biotiniladas, após a normalização pelo nível de expressão (n=4).

complexo (fig 10A). Além disso, a precipitação foi específica para GST-C-terminal, uma vez que no controle, GST sozinha, o nível de AP-2 precipitado foi insignificante (fig 10A). Acredita-se que o complexo AP2 não seja desmontado nas condições experimentais utilizadas (Tebar e cols. 1996), e por isso, este resultado não informa qual das subunidades de AP-2 está envolvida na interação com o VACHT. Na tentativa de desvendar qual das subunidades de AP-2 interage com o C-terminal do VACHT, experimentos de duplo híbrido em levedura foram realizados. A região C-terminal do VACHT foi inserida no vetor pAS2-1, levando desta forma, à expressão do VACHT em fusão ao domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Gal4. As diferentes subunidades do complexo AP-2, no vetor pACT2, foram expressas em fusão ao domínio de ativação transcricional de Gal4. Leveduras foram co-transformadas com os diferentes pares do VACHT e adaptinas e plaqueadas em meio restritivo, deficientes em leucina, triptofano e adenina, para verificar a interação. No controle, onde pAS2-1 C-terminal foi co-transformado com o vetor pACT2 vazio, não houve crescimento de leveduras no meio restritivo. Observamos o crescimento específico de leveduras no meio restritivo, quando estas foram co-transformadas com pAS2-1 C-terminal e pACT2- $\mu_2$  ou com pAS2-1 C-terminal e pACT2- $\sigma_2$ . Quando os experimentos foram realizados utilizando o vetor pAS2-1 C-terminal com mutação nas leucinas 485 e 486 não houve crescimento das leveduras nos meios restritivos. Estes dados indicam que a interação entre AP2 e VACHT acontece através da subunidade  $\mu$  mais significativamente, mas também através da subunidade  $\sigma$  de AP-2, e que esta interação depende dos resíduos de leucina presentes nas posições 485 e 486 do VACHT (fig 10B, Barbosa e cols. 2002). Como controle positivo para este

experimento, utilizamos a interação previamente identificada no duplo híbrido em leveduras, entre  $\beta$ -arrestina e  $\beta$ -adaptina (Laporte e cols. 1999).



**Figura 10: Interação do motivo baseado em leucina do VACHT com AP-2. A)** Esferas de glutaciona previamente ligadas à GST-C-terminal do VACHT ou GST foram utilizadas para precipitar o complexo AP-2 de córtex de rato. Os resultados são apresentados como porcentagem de ligação de GST-C-terminal do VACHT a AP-2. Em detalhe, imunodeteção de  $\alpha$ -adaptina em extrato de córtex e frações precipitadas com GST-C-terminal do VACHT e GST. **B)** Interação do C-terminal do VACHT wt e do mutante L485A L486A com diferentes subunidades de AP-2, em experimentos de duplo híbrido em levedura.  $\beta$ -arrestina foi utilizada como controle.

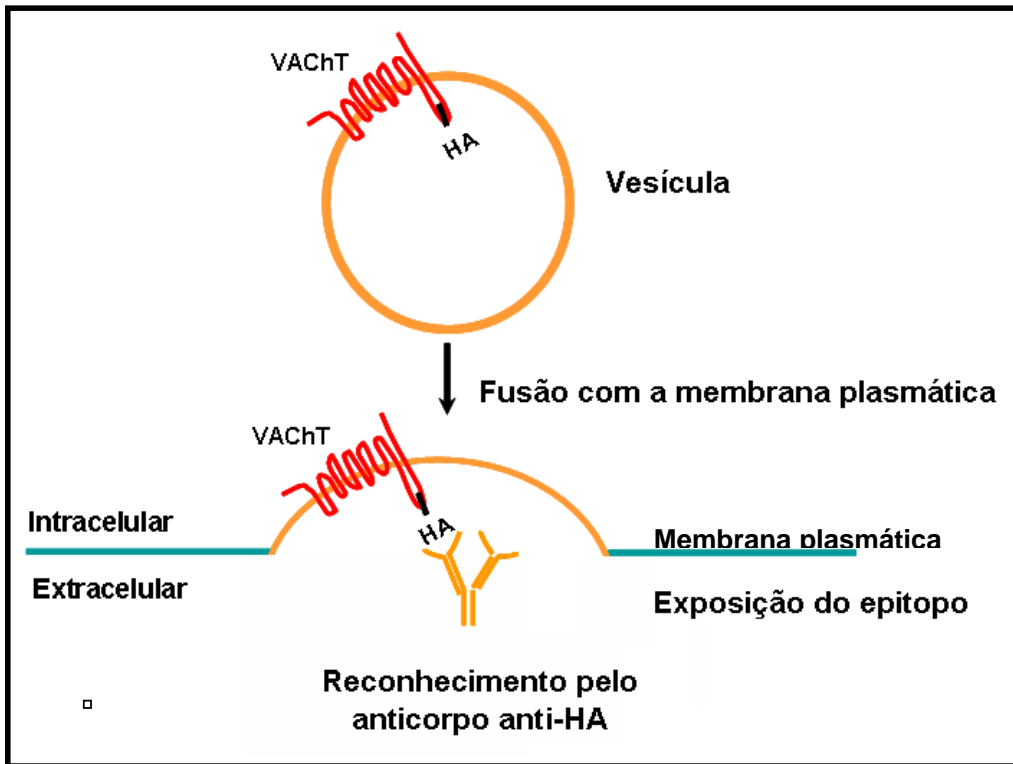
#### **IV.8 O efeito da superexpressão de AP180-C na internalização e o tráfego do VACHT**

Os dados anteriores sugerem fortemente que a internalização do transportador de acetilcolina depende do processo mediado por clatrina. Com o objetivo de testar o papel da clatrina no tráfego e endocitose do VACHT utilizamos a construção AP180-C, fragmento C-terminal de AP180. Os adaptadores AP180 e AP-2 são componentes importantes do revestimento de clatrina, e na presença de ambas proteínas a taxa de endocitose é aumentada (Hao e cols. 1999). AP180 possui em sua região N-terminal sítios para ligação a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> e na região C-terminal, sítios de ligação a AP-2 e clatrina (Ford e cols. 2001). A superexpressão do fragmento C-terminal de AP180 bloqueia a endocitose de proteínas que dependem exclusivamente de clatrina. Este fragmento parece atuar como um competidor na associação com clatrina, e impedir a associação desta nos sítios de endocitose na membrana plasmática (Ford e cols. 2001).

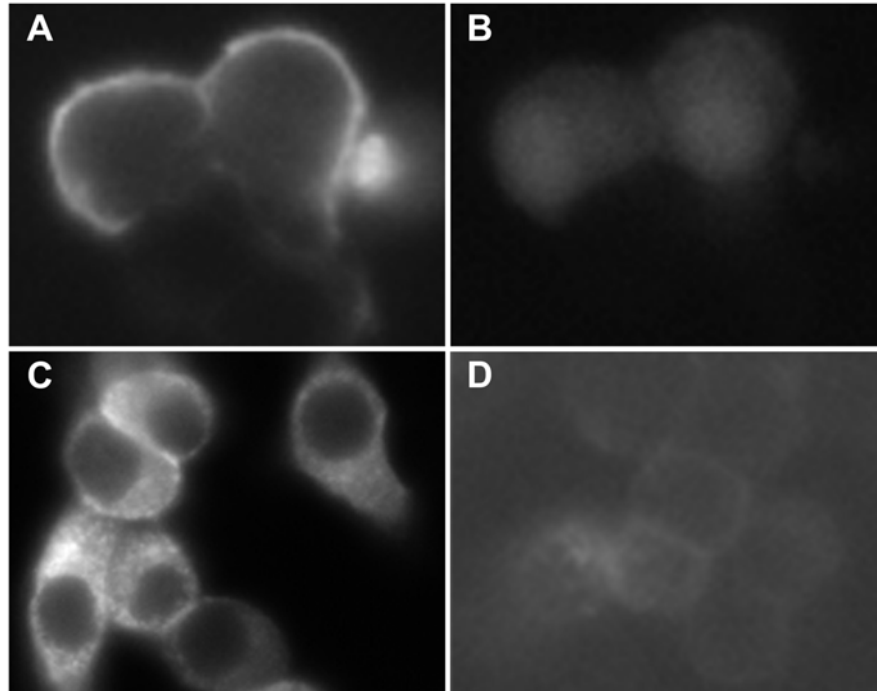
Inicialmente, utilizamos células PC12 expressando estavelmente o VACHT ligado à um epitopo de hemaglutinina (HA). Este epitopo está localizado na alça entre os domínios transmembrana 1 e 2 do VACHT, voltada para o lúmen da vesícula. Quando vesículas contendo HA-VACHT se fundem com a membrana plasmática o epitopo é exposto para o meio extracelular. Para avaliarmos se a superexpressão de AP180-C afeta a endocitose do VACHT, transfectamos células PC12, expressando estavelmente o HA-VACHT com esta construção e realizamos experimentos de imunofluorescência sem permeabilizá-las, a fim de detectarmos apenas a proteína na membrana plasmática. Uma desenho esquemático deste experimento está ilustrado na figura 11.

A superexpressão de AP180-C levou a um acúmulo do transportador na membrana plasmática, como pode ser observado na figura 12A. Em células controle, não transfectadas com AP180-C, não é observado marcação do VACht na membrana plasmática (figura 12D). A identificação das células transfectadas com AP180-C foi feita através da co-expressão da proteína GFP, usada como repórter (figura 12B). Pode ser observado na figura 12C, em células permeabilizadas, a distribuição pontuada característica do VACht, sem marcação evidente na membrana plasmática. Esses experimentos foram visualizados em câmara CCD.

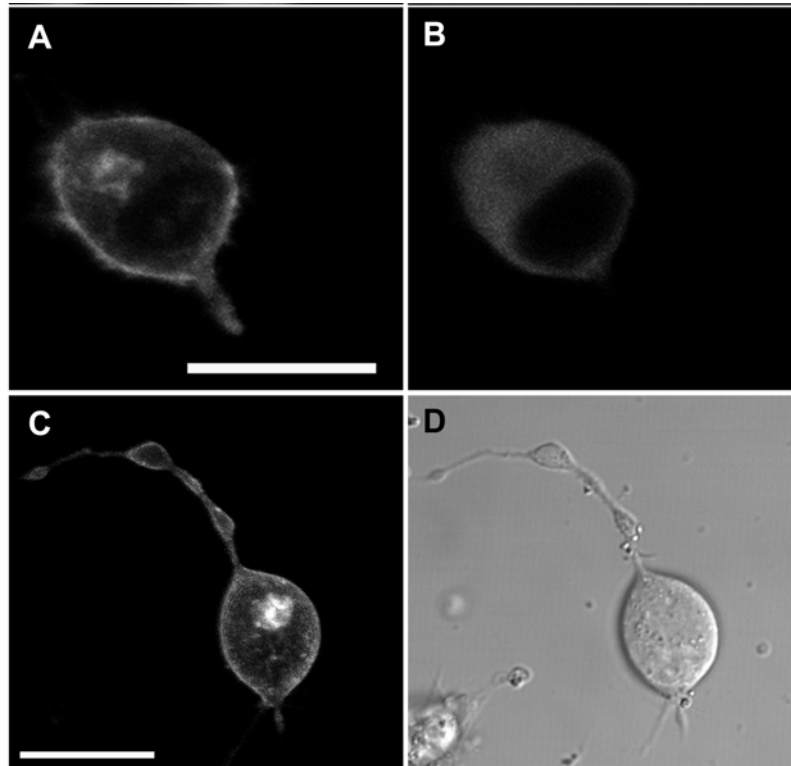
Nosso próximo passo foi verificar se a endocitose mediada por clatrina é importante para o tráfego do VACht para vesículas sinápticas. Para isso, utilizamos células SN56 diferenciadas, co-transfectadas com AP180-C e GFP-VACht. Pode-se observar que, em células co-expressando AP180-C, o transportador apresentou uma distribuição bastante distinta da usual. As figuras 13A e 13C mostram imagens representativas de 4 experimentos (n= 85 células). Na figura 13A está representada a distribuição do GFP-VACht. Esta célula foi fixada e marcada com anticorpo anti-myc para visualizar AP180-C (figura 13B). Na figura 13C está representada uma imagem de célula viva, co-expressando GFP-VACht e AP180-C. O VACht apresentou-se bastante acumulado na membrana do corpo celular, dos processos e varicosidades, semelhante ao observado para os mutantes do motivo di-leucina. Além disso, pode-se notar também o acúmulo do transportador em uma região próxima ao núcleo.



**Figura 11: Ilustração esquemática do experimento de imunofluorescência sem permeabilização.** Em vermelho está representado o VACHT com o epítopo HA na alça intraluminal. A fusão da vesícula contendo HA-VACHT leva à exposição do epítopo para o meio extracelular, possibilitando o reconhecimento de proteínas na membrana com a utilização de anticorpos anti-HA.



**Figura 12: Localização de HA-VACHT durante a superexpressão de AP180-C em células PC12.** (A e B) Células PC12 expressando estavelmente HA-VACHT foram co-transfectadas com AP180-C e GFP. Após 48 horas de transfecção, as células foram examinadas em câmara CCD. Notem o acúmulo de HA-VACHT na membrana plasmática em células transfectadas com AP180-C (A), identificadas pela presença de GFP (B). (C) Células PC12 expressando estavelmente HA-VACHT não transfectadas com AP180-C foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-HA. Observem o padrão pontuado do HA-VACHT (C). (D) Quando não permeabilizadas, células PC12 expressando estavelmente HA-VACHT não mostraram marcação na membrana plasmática, mesmo quando o tempo de exposição na câmara CCD foi aumentado 7 vezes.



**Figura 13: O bloqueio da endocitose mediada por clatrina afeta a endocitose e o tráfego do VACHT em células SN56. (A-D)** Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-VACHT e AP180-C. **(A e B)** Após 48 de transfecção, células foram fixadas, marcadas com anti-myc para detectar AP180-C **(B)**, e examinadas em microscopia de fluorescência confocal. Em células superexpressando AP180-C, GFP-VACHT concentrou-se na membrana plasmática e na região perinuclear **(A e C)**. Notem que GFP-VACHT também foi visualizado na membrana plasmática dos processos e não mostrou concentração nas varicosidades **(C)**. **(D)** DIC da célula mostrada em **C**. Barra=20 $\mu$ m.

#### **IV.9 Os aminoácidos 471-490 parecem conter os sinais de internalização mais relevantes para interação com a maquinaria endocítica dependente de clatrina**

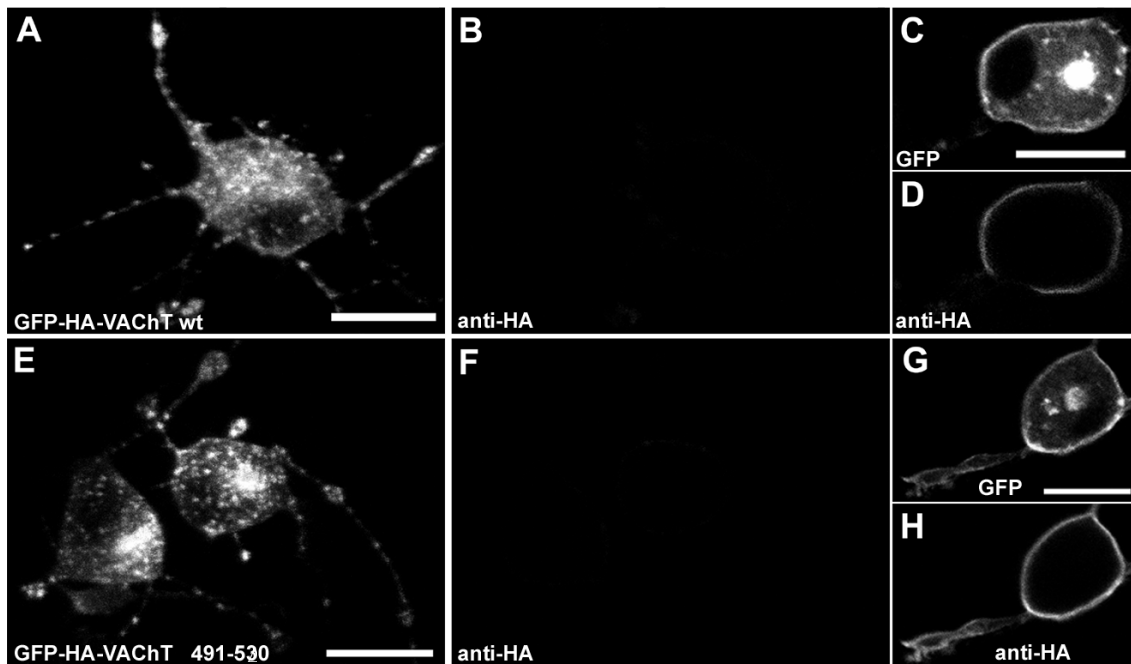
Foi sugerido recentemente que os aminoácidos 520-530 do VACHT (11 últimos aminoácidos da região C-terminal) são os responsáveis pela interação com o complexo AP-2 (Kim e Hersh 2004). No entanto, nossos resultados utilizando a técnica de duplo híbrido em leveduras sugerem que a interação com AP-2 depende do motivo baseado em leucina (L485 L486) (Barbosa e cols. 2002), presente nos 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal do VACHT. Além disso, os dados com o mutante que não possui os últimos 40 aminoácidos da região C-terminal (GFP-VACHT  $\Delta$ 491-530) sugerem que este mutante trafega normalmente (Santos 2002; Ferreira e cols. 2005). Estes resultados indicam que, aparentemente, os sinais que desempenham papel central no tráfego do VACHT estão contidos na sequência inicial de 20 aminoácidos da região C-terminal. No entanto, o fato deste mutante (GFP-VACHT  $\Delta$ 491-530) apresentar o mesmo padrão de distribuição do VACHT selvagem não significa, necessariamente, que ele utilize a mesma maquinaria de tráfego para alcançar as vesículas sinápticas. Desta maneira, resolvemos testar se o tráfego do GFP-VACHT  $\Delta$ 491-530 também dependeria de clatrina.

Para realizar estes experimentos utilizamos a construção GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 para possibilitar a detecção do VACHT na membrana plasmática. O epitopo HA (inserido na alça luminal entre os domínios transmembrana 1 e 2) é exposto para o meio extracelular quando vesículas contendo GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 fundem-se com a membrana plasmática. Isto possibilita a detecção do transportador na superfície celular através da utilização

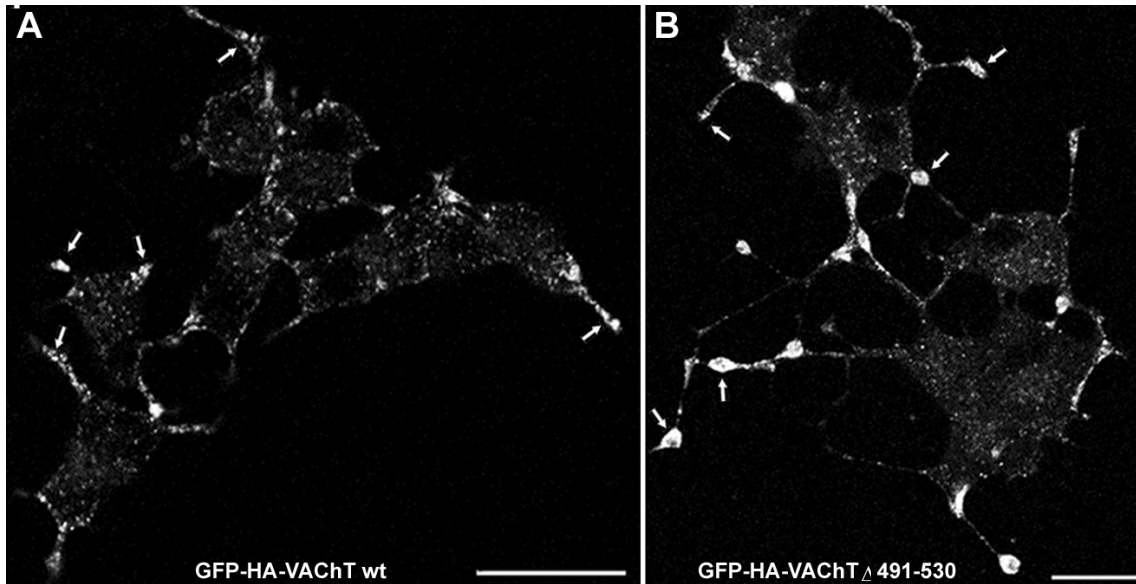
de anticorpos anti-HA (fig 11). Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 e AP180-C. Quando AP180-C é super-expresso, GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 é retido na superfície das células SN56 (figura 14H), assim como acontece com a proteína selvagem (figura 14D). Como estas construções estão associadas a GFP, podemos observar a presença do VACHT na membrana plasmática também através da fluorescência da GFP (figs 14G e 14C). Em células onde AP180-C não está presente, GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 (figura 14E) e GFP-HA-VACHT WT (figura 14A) apresentam o mesmo padrão de distribuição pontuado no corpo celular, processos e varicosidades. Além disso, a imunofluorescência nestas células com anticorpo anti-HA, utilizando as mesmas condições usadas para as células com AP180-C, não detecta a presença destas proteínas na membrana plasmática (figura 14B e 14F). Esses dados sugerem que, a distribuição desse mutante ocorre por mecanismo similar ao do VACHT selvagem e que também depende da endocitose mediada por clatrina, embora ele não possua os últimos 11 aminoácidos que, de acordo com Kim e Hersh, são os responsáveis pela interação entre VACHT e AP2.

As nossas análises de tráfego do mutante GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 refletem o que acontece em células SN56 diferenciadas. Entretanto, o trabalho de Kim e Hersh (2004) foi realizado em células PC12. É possível que o endereçamento deste mutante, em células PC12, seja diferente e envolva sua interação com outros componentes da maquinaria de tráfego. A fim de analisar esta hipótese, nós produzimos células PC12 expressando estavelmente o GFP-HA-VACHT ou GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 e estudamos o padrão de distribuição destas proteínas. Células PC12 expressando estavelmente GFP-HA-VACHT wt (figura 15A) e GFP-HA-VACHT  $\Delta$ 491-530 (figura 15B) mostram que estas duas

proteínas apresentam o mesmo perfil de distribuição. Estes dados sugerem fortemente que os sinais mais importantes para o tráfego, internalização e direcionamento do VChT encontram-se nos aminoácidos iniciais da região C-terminal, embora não descartem que sinais adicionais possam também exercer algum papel acessório nestes processos.



**Figura 14: A localização do GFP-VACHT $\Delta$ 491-530 depende de endocitose mediada por clatrina.** Nas imagens de **A-H**, células SN56 foram marcadas com anti-HA sob condições de não permeabilização. **(A)** Imagem de uma célula expressando GFP-HA-VACHT, obtida através da fluorescência da GFP. **(B)** O mesmo campo mostrado em **A**, obtido através da marcação com anticorpo anti-HA, demonstrando a ausência do GFP-HA-VACHT na membrana plasmática. **(C)** Imagem de uma célula co-expressando GFP-HA-VACHT e AP180-C, obtida através da fluorescência da GFP. **(D)** O mesmo campo mostrado em **C**, marcado com anticorpo anti-HA, demonstrando o acúmulo do GFP-HA-VACHT na membrana plasmática na presença de AP180-C. **(E)** Experimento similar ao mostrado em **A**, onde células foram transfectadas GFP-HA-VACHT $\Delta$ 491-530. **(F)** O mesmo campo mostrado em **E**, obtido através da marcação com anticorpo anti-HA. **(G)** Imagem de uma célula co-expressando GFP-HA-VACHT $\Delta$ 491-530 e AP180-C, obtida através da fluorescência da GFP. **(H)** O mesmo campo mostrado em **G**, marcado com anticorpo anti-HA, demonstrando o acúmulo do GFP-HA-VACHT $\Delta$ 491-530 na membrana plasmática na presença de AP180-C. Imagens representativas de uma fatia óptica. Barra=20 $\mu$ m.



**Figura 15: A distribuição subcelular de GFP-HA-VACht wt e GFP-HA-VACht  $\Delta$  491-530 é similar em células PC12. Células PC12 expressando estavelmente GFP-HA-VACht (A) e GFP-HA-VACht  $\Delta$ 491-530 (B) mostram que estas proteínas possuem distribuição semelhante, acumulando nas varicosidades (setas). Imagens representativas de uma fatia óptica. Barra=20 $\mu$ m.**

#### IV.10 Interação entre VACHT e SEC-14 *like*

Nos últimos anos, através do esforço conjunto de diversos grupos de pesquisa, muitos eventos sobre o tráfego intracelular do transportador vesicular de acetilcolina já foram desvendados, mas ainda existem aspectos que são desconhecidos. Interações proteína-proteína são importantes para vários processos intracelulares, e por isso decidimos utilizar uma técnica que detecta interação protéica, para procurarmos proteínas que possam interagir com o VACHT. Nosso grupo de pesquisa utilizou o sistema de duplo híbrido em leveduras para vasculhar uma biblioteca de cDNA de cérebro humano, usando como isca a região C-terminal do VACHT. Várias interações foram detectadas e uma que nos chamou a atenção foi a interação com uma proteína com homologia à SEC14, que foi denominada SEC14 *like*.

SEC14 é uma proteína conhecida como PITP (phosphatidylinositol transfer protein), que transporta fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilcolina (PC) entre membranas, além de participar no metabolismo de fosfoinosítídeos durante a transdução de sinal e tráfego vesicular. Estudos em *S. cerevisiae* indicam que SEC14 é importante para regulação do metabolismo de PC e para assegurar que diacilglicerol esteja disponível no Golgi para a formação de vesículas (revisado por Allen-Baume e cols. 2002; Cockcroft 1998). Durante a varredura da biblioteca mencionada acima, um fragmento com homologia à SEC14 foi detectado. A figura 16 apresenta a sequência primária de SEC14 *like*, assim como o fragmento “pescado” no experimento e duplo híbrido (sublinhado). SEC14 *like* apresenta três domínios principais: PRELI\_MSF1, CRAL\_TRIO e GOLD. O primeiro domínio parece estar envolvido com a associação de SEC14 às membranas, o domínio CRAL\_TRIO parece ser o local de ligação aos fosfoinosítídeos, e o domínio GOLD parece estar

relacionado com diversas interações proteína-proteína (Anantharaman e Aravind, 2002).

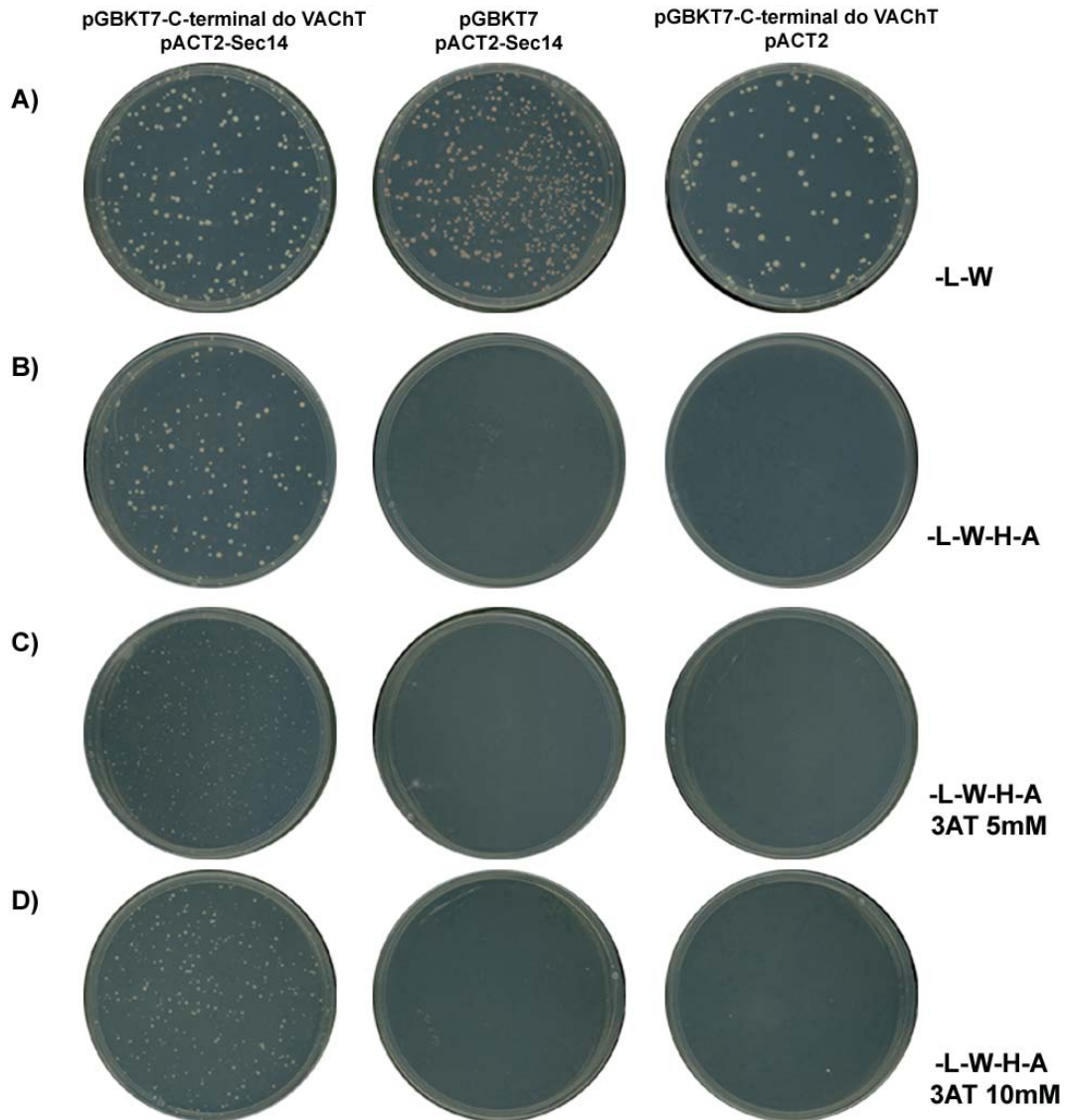
Para confirmarmos a especificidade da interação entre VACHT e SEC14 *like* realizamos novo experimento de duplo híbrido em leveduras, onde meios mais restritivos foram utilizados. As leveduras foram co-transformadas com pGBKT7-C-terminal do VACHT e pACT2-SEC14, e plaqueadas em meio de cultura isento de leucina e triptofano (-L-W - figura 17A), para verificarmos a eficiência de co-transformação, e em meio isento de leucina, triptofano, histidina e adenina (-L-W-H-A - figura 17B), para verificarmos a interação física entre estas proteínas. Podemos observar que a interação se mostrou específica e forte, uma vez que houve crescimento de leveduras tanto no meio -L-W-H-A (figura 17B), quanto nos meios -L-W-H-A contendo 3 AT 5mM e 10mM (figuras 17C e 17D).

Experimentos de duplo híbrido em leveduras necessitam ser confirmados bioquimicamente, uma vez que esta técnica gera muitos resultados falso-positivos. Por isso, realizamos experimentos de co-imunoprecipitação. Nestes experimentos, células PC12 expressando estavelmente HA-VACHT foram utilizadas. Transfectamos estas células com SEC14 C-terminal (fragmento) ou SEC14 *like* (proteína completa). Células PC12 selvagens foram utilizadas como controle. Podemos observar que tanto SEC14 C-terminal (figura 18A, canaleta 1) quanto SEC14 *like* (figura 18B, canaleta 1) foram co-imunoprecitados com HA-VACHT especificamente. Podemos observar que SEC14 não se liga inespecificamente às esferas de HA-agarose, uma vez que não se detectou a imunoprecipitação de SEC14 em células selvagens, que não apresentam HA-VACHT (figuras 18A e 18B, canaletas 2).

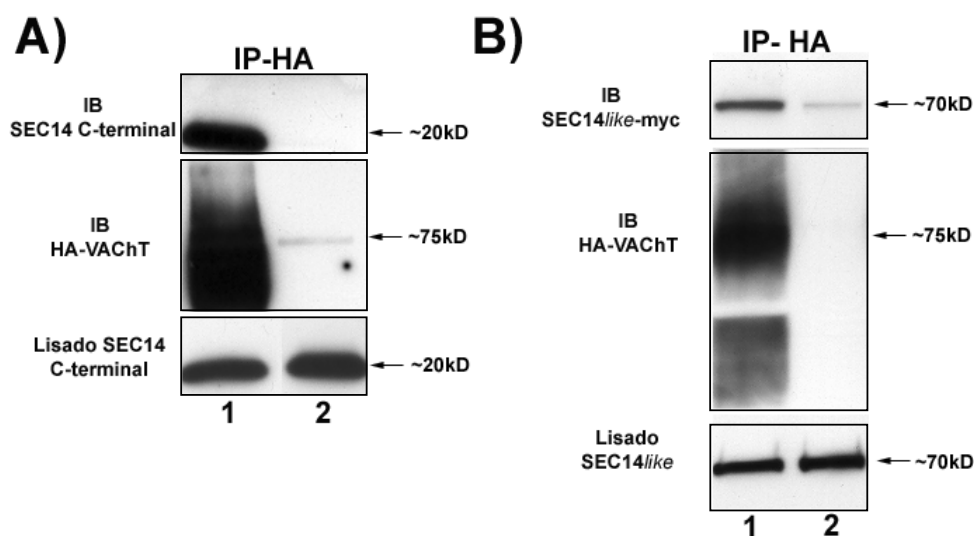


**M V Q K Y Q S P V R V Y K Y P F E L I M A A Y E R R F P T C P L I P M F V G S D**  
**T V N E F K S E D G A I H V I E R R C K L D V D A P R L L K K I A G V D Y V Y F**  
**V Q K N S L N S R E R T L H I E A Y N E T F S N R V I I N E H C C Y T V H P E N**  
**E D W T C F E Q S A S L D I K S F F G F E S T V E K I A M K Q Y T S N I K K G K**  
**E I I E Y Y L R Q L E E E G I T F V P R W S P P S I T P S S E T S S S S S K K Q A**  
**A S M A V V I P E A A L K E G L S G D A L S S P S A P E P V V G T P D D K L D**  
**A D Y I K R Y L G D L T P L Q E S C L I R L R Q W L Q E T H K G K I P K D E H I**  
**L R F L R A R D L N I D K A R E I M C Q S L T W R K Q H Q V D Y I L E T W T P P**  
**Q V L Q D Y Y A G G W H H H D K D G R P L Y V L R L G Q M D T K G L V R A L**  
**G E E A L L R Y V L S I N E E G L R R C E E N T K V F G R P I S S W T R L V D L**  
**E G L N M R H L W R P G V K A L L R I I E V V E A N Y P E T L G R L L I L R A P**  
**R V F P V L W T L V S P F I D D N T R R K F L I Y A G N D Y Q G P G G L L D Y I**  
**D K E I I P D F L S G E C M C E V P E G G L V P K S L Y R T A E E L E N E D L K**  
**L W T E T I H Q S A S V F K G A P H E I L I Q I V D A S S V I T W D F D V C K G D**  
**I V F N I Y H S K R S P Q P P K K D S L G A H S I T S P G G N N V Q L I D K V W**  
**Q L G R D Y S M V E S P L I C K E G E S V Q G S H V T R W P G F Y I L Q W K F**  
**H S M P A C A A S S L P R V D D V L A S L Q V S S H K C K V M Y Y T E V I G S**  
**E D F R G S M T S L E S S H S G F S Q L S A A T T S S S Q S H S S S M I S R**

**Figura 16: Estrutura primária de SEC14 like.** Os domínios protéicos PRELI\_MSF1, CRAL\_TRIO e GOLD estão identificados em azul, verde e vermelho, respectivamente. Os aminoácidos sublinhados representam o fragmento protéico utilizado nos ensaios de duplo híbrido em leveduras.

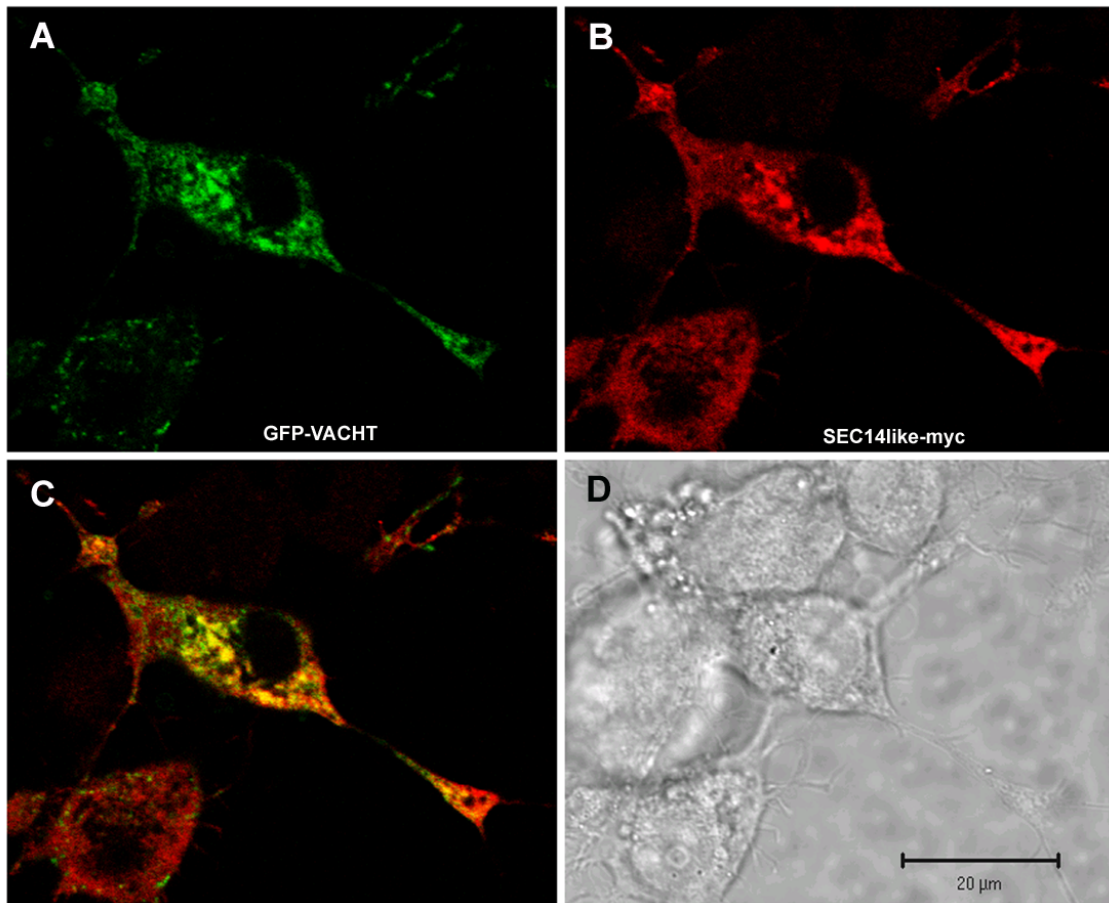


**Figura 17: VACHT C-terminal e SEC14/like interagem no duplo híbrido em leveduras.** (A) Controle de co-transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano (-L-W). (B) Interação positiva entre VACHT e SEC14/like, houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* e crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina (-L-W-H-A). (C) e (D) representam condições mais estridentes na presença de 3-AT, nas concentrações de 5 e 10mM respectivamente (o crescimento nessas condições indica interação forte).

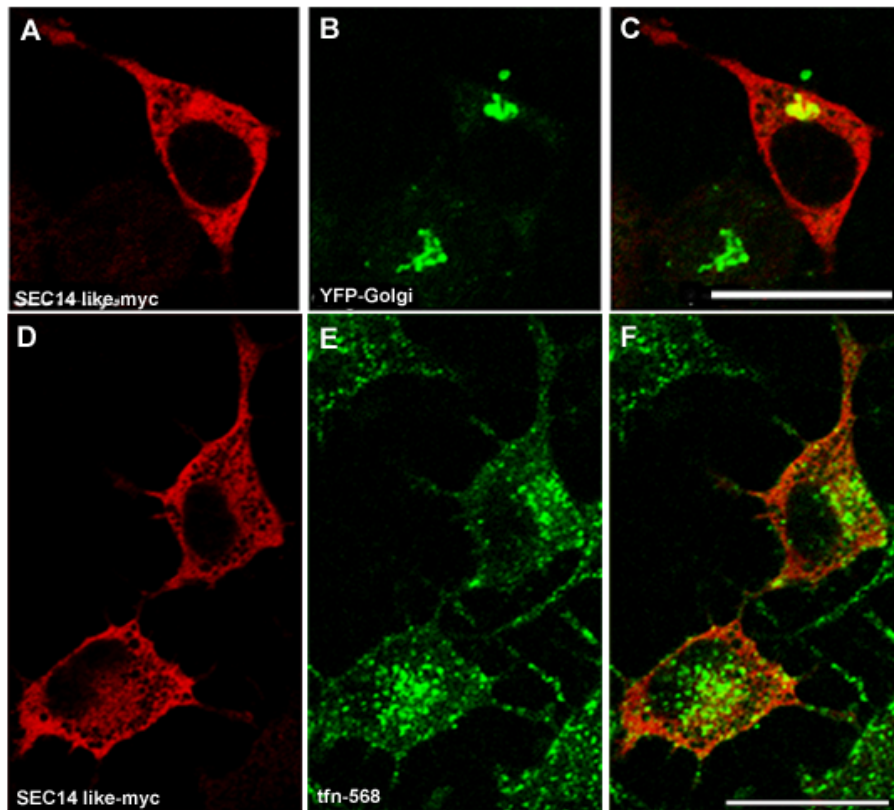


**Figura 18: Co-imunoprecipitação de HA-VACHT e SEC14like-myc em células PC12.** Nesses experimentos foram utilizadas esferas de agarose ligadas ao anticorpo anti-HA para precipitar o VACHT. Amostras dos lisados (retângulos inferiores) foram separadas em SDS-PAGE para verificarmos os níveis de expressão de SEC14 C-terminal e SEC14like. **(A)** Resultado da co-imunoprecipitação em células PC12 expressando estavelmente o HA-VACHT transfectadas com SEC14 C-terminal. Nos retângulos, de baixo para cima, estão indicados: o nível de expressão de SEC14 C-terminal no lisado, a imunoprecipitação de HA-VACHT, e a co-imunoprecipitação de SEC14 C-terminal. Em **1**, está representado o resultado obtido em células expressando estavelmente o HA-VACHT, que foram transfectadas com SEC14 C-terminal. Em **2**, está representado o controle do experimento, onde células PC12 selvagens foram transfectadas com SEC14 C-terminal. **(B)** Experimento similar ao mostrado em A, realizado com SEC14like. Em **1**, está mostrado o resultado da co-imunoprecipitação em células PC12 expressando estavelmente o HA-VACHT transfectadas com SEC14like. Em **2**, está representado o controle do experimento, onde células PC12 selvagens foram transfectadas com SEC14like-myc.

Como duas metodologias diferentes sugerem a existência de interação entre VACHT e SEC14*like*, nosso próximo passo foi verificar se estas proteínas se co-localizam nas células. Para isso, células SN56 foram co-transfectadas com GFP-VACHT e SEC14*like*-myc (proteína completa). Estas duas proteínas apresentaram um alto grau de co-localização (fig 19), e além disso, a distribuição subcelular do VACHT foi aparentemente alterada na presença de SEC14 *like*, sugerindo que esta pode interferir no tráfego do transportador. As estruturas intracelulares positivas para o VACHT apresentaram-se aumentadas, sugerindo uma falha no processo de brotamento ou no processo de fissão de vesículas de transporte. Com o intuito de definir a identidade das organelas citoplasmáticas positivas para SEC14*like* realizamos alguns experimentos onde utilizamos marcadores de Golgi (fig 20B) e de endossomas (fig 20E). O padrão de distribuição observado para o marcador de Golgi (fig 20B) e para o marcador de endossomas (fig 20E) foi diferente do padrão observado para SEC14*like*. Portanto, a partir dos nossos resultados não podemos tirar nenhuma conclusão a respeito da localização de SEC14*like*.



**Figura 19: Co-localização entre *SEC14like-myc* e GFP-VACHT em células SN56.** Células SN56 foram co-tranfectadas com GFP-VACHT e *SEC14like-myc*, e após 48 horas de transfecção foi realizada uma imunofluorescência para visualização de SEC14. Em **(A)** está mostrada uma imagem representativa da distribuição do GFP-VACHT na presença de *SEC14like* **(B)**. Quando as imagens obtidas em **A** e **B** são sobrepostas, observa-se um alto grau de co-localização entre estas proteínas **(C, pontos amarelos)**. Em **D** está representado o DIC desta célula. As imagens são fatias ópticas e representativas de 4 experimentos. Barra=20 µm



**Figura 20: SEC14/like-myc não co-localiza com YFP-Golgi e tfn-568.** Células SN56 foram co-transfectadas com SEC14/like e YFP-Golgi e após 48 horas de transfecção, foram analisadas por microscopia confocal. Em (A) está representada uma célula expressando SEC14/like, que também foi transfectada com YFP-Golgi (B). Em C está representada a sobreposição das imagens em A e B. Células transfectadas com SEC14/like (D) foram marcadas com transferrina-alexa 568 (E), conforme descrito em material e métodos. Em F está representada a sobreposição das imagens obtidas em D e E. As imagens são representativas de 3 experimentos. Todas as imagens são fatias ópticas. Barra=20  $\mu$ m

## **V – Discussão**

As vesículas sinápticas já são bastante caracterizadas quanto à composição protéica e a dinâmica envolvida na liberação de neurotransmissores (Sudhof e cols. 1991; Trimble e cols. 1991). Contudo, ainda é muito discutido como estas organelas são originadas. Diversos estudos sugerem que as proteínas de vesículas sinápticas são direcionadas para a terminação nervosa em diferentes organelas precursoras e que a seleção destas proteínas aconteça no terminal nervoso, levando então a formação das vesículas sinápticas (Régnier-Vigouroux e cols. 1991; Okada e cols. 1995; Nakata e cols. 1998; Hannah e cols. 1999). O estudo do tráfego de proteínas de vesícula sináptica é complexo, uma vez que essas proteínas não compartilham características comuns óbvias que serviriam para identificá-las como proteínas de vesícula sináptica.

O transportador vesicular de acetilcolina é predominantemente encontrado em vesículas sinápticas (Gilmor e cols. 1996; Weihe e cols. 1996; Liu e Edwards 1997; Erickson e Varoqui 2000). Por isso, a caracterização das vias de tráfego percorridas por este transportador podem ser importantes para a ampliação do entendimento do processo de formação das vesículas sinápticas. Com o objetivo de desvendar as rotas intracelulares percorridas pelo VAcHT a caminho das vesículas sinápticas, os sinais importantes para o seu tráfego e o papel da endocitose mediada por clatrina neste processo, realizamos experimentos com diversos mutantes e perturbamos o processo endocítico mediado por clatrina. As diversas construções do VAcHT utilizadas neste trabalho foram expressas como proteínas de fusão à GFP e/ou ao epitopo de hemaglutinina (HA).

Quando o VAcHT é expresso em fusão à GFP ele se distribui de maneira pontuada no soma, concentrando-se na região perinuclear, e nas varicosidades dos neuritos de células SN56 (Santos e cols. 2001), compatível com a distribuição

subcelular da proteína endógena expressa nesta mesma linhagem celular (Barbosa e cols. 1999) e em células PC12 (Liu e Edwards 1997). Além disso, a co-localização de GFP-VACHT com marcadores endocíticos, tanto no corpo celular quanto nas varicosidades de células SN56, sugere que o transportador esteja presente em endossomas e possivelmente em vesículas sinápticas (Santos e cols. 2001). Vale ressaltar que além de ser endereçado corretamente, GFP-VACHT também é funcional, sendo capaz de se ligar ao vesamicol e transportar acetilcolina (Ferreira e cols. 2005).

Para avaliarmos se GFP-VACHT é realmente direcionado para vesículas sinápticas, realizamos experimentos de co-localização com myc-VAMP2. Sinaptobrevina, ou VAMP2, é uma proteína de membrana de vesícula sináptica, envolvida na formação do complexo SNARE, importante durante os eventos de fusão da membrana da vesícula com a membrana plasmática. A proteína recombinante myc-VAMP2 foi utilizada como marcador de vesículas sinápticas, uma vez que já foi caracterizada sua presença em organelas tipo vesículas sinápticas (Volkandt e cols. 2002; Ribeiro e cols. 2003). Células co-expressando GFP-VACHT e myc-VAMP2 apresentam um alto grau de co-localização (Figura 3, Ferreira e cols. 2005). Ambas apresentaram uma distribuição pontuada no soma, processos e varicosidades, sugerindo que GFP-VACHT é corretamente endereçado para a membrana de vesículas sinápticas, em células SN56. Estruturas móveis heterogêneas, observadas em neurônios de hipocampo em cultura, foram visualizadas carreando VAMP2, além de diversas outras proteínas pré-sinápticas características, como por exemplo a subunidade  $\alpha 1a$  de canal de cálcio, SV2, sinapsina I e anfifisina (Ahmari e cols. 2000). Tomando em conjunto os nossos dados de co-localização e os dados de Ahmari e colaboradores (2000), podemos

sugerir que, não apenas GFP-VACHT e myc-VAMP2 estão presentes nas mesmas estruturas intracelulares, como também podem utilizar as mesmas rotas de tráfego para alcançarem a membrana das vesículas sinápticas.

Uma vez que vesículas sinápticas concentram-se no terminal nervoso, distante do local de síntese proteica no corpo celular, os neurônios precisam de um controle de qualidade rigoroso que regule o tráfego de proteínas para as vesículas sinápticas. Acredita-se que as proteínas de vesícula sináptica precisem tomar inúmeras decisões ao viajar do TGN para o terminal nervoso. Entretanto, os sinais que dirigem estes eventos de transporte e as vias que levam as proteínas às vesículas sinápticas nos neurônios ainda não estão inteiramente definidos (West e cols. 1997). Sequências curtas de aminoácidos nos domínios citoplasmáticos de proteínas transmembrana têm sido identificadas como sinais de direcionamento para organelas em muitos outros tipos celulares (Trowbridge e cols. 1993; Hunziker e Geuze 1996). Existem evidências de que VAMP2 possui motivos distintos para o direcionamento axonal e para incorporação em vesículas sinápticas (Grote e cols. 1995; Grote e Kelly 1996; West e cols. 1997). Além disso, foi demonstrado que a co-expressão de sinaptofisina e VAMP2 é importante para o direcionamento correto de VAMP2 para vesículas sinápticas em neurônios hipocámpais em cultura (Pennuto e cols. 2003). Outra proteína de vesícula sináptica que possui um sinal de tráfego identificado é a sinaptotagmina. Na porção C-terminal, a sinaptotagmina possui uma sequência di-hidrofóbica Met-Leu que direciona a quimera CD4-sinaptotagmina para SLMV em células PC12 (Blagoveshchenskaya e cols. 1999).

Considerando o fato da região carboxi-terminal do VACHT ser necessária para o direcionamento do transportador para vesículas tipo sinápticas em células PC12 (Varoqui e Erickson 1998; Krantz e cols. 2000), faz-se necessário um estudo

rigoroso da sequência de aminoácidos presentes nesta região, em busca de sinais que possam comandar o tráfego do VACHT.

Estudos anteriores sugerem que a deleção dos 20 ou 40 aminoácidos finais da região C-terminal do VACHT não afetam o tráfego intracelular do transportador (Santos 2002). Estes resultados levantaram a hipótese de que, possivelmente, os aminoácidos que desempenham função central no tráfego do VACHT estejam concentrados na sequência inicial de 20 aminoácidos da região C-terminal. Para testar esta hipótese, estudos de co-localização entre o mutante GFP-VACHT  $\Delta$ 471-490 (onde os 20 aminoácidos iniciais estão ausentes) e myc-VAMP2 foram feitos e revelaram que este mutante não apresenta a distribuição pontuada característica observada para a proteína selvagem e não co-localiza com VAMP2 (Figura 5, Ferreira e cols. 2005).

Para tentarmos identificar os motivos protéicos dentro da sequência de 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal, que são importantes para o endereçamento do VACHT para vesículas tipo sinápticas, realizamos experimentos de co-localização entre construções com mutações nesta região e myc-VAMP2. Nestas construções, os aminoácidos 471-490 foram substituídos por alanina, em grupos de 5. A substituição dos aminoácidos 471-475 ou 476-480 parece não impedir o direcionamento do VACHT para vesículas sinápticas. Ao contrário, a substituição dos aminoácidos 481-485 ou 486-490 afetou a distribuição subcelular do VACHT, indicando que, aparentemente, os sinais mais críticos para o tráfego do transportador, em células SN56, estejam nos resíduos 481-490 (Figura 4, Ferreira e cols. 2005). A substituição que perturbou o tráfego do VACHT de maneira mais expressiva foi a dos aminoácidos 481-485. Embora a presença deste mutante na membrana plasmática tenha sido observada, grande parte da proteína ficou

distribuída no citossol, sem acúmulo evidente em endossomas e vesículas sinápticas. Vale ressaltar que já foi demonstrado o envolvimento de alguns resíduos de aminoácidos, localizados dentro da sequência 471-490, no tráfego do VACHT. Na posição 480 existe um resíduo de serina, que dependendo do seu estado de fosforilação, regula o endereçamento do VACHT em células PC12 (Krantz e cols. 2000; Cho e cols. 2000). Resíduos de leucina nas posições 485 e 486 compõem um motivo di-leucina, já identificado como importante para internalização do transportador a partir da membrana plasmática, em células CHO e SN56 (Tan e cols. 1998; Santos e cols. 2001; Barbosa e cols. 2002).

GFP-VACHT com os resíduos de leucina mutados (L485A L486A) acumula-se na membrana plasmática, sugerindo que estes resíduos são importantes para a endocitose do transportador (Santos e cols. 2001). O bloqueio da endocitose, através do uso de um mutante dominante negativo da dinamina I, afeta a internalização do VACHT na membrana plasmática em células SN56 (Barbosa e cols. 2002). Nestas condições, o VACHT concentra-se em grande aglomerados vesiculares próximos à membrana plasmática. No entanto, o mutante GFP-VACHT L485A L486A é difusamente localizado na membrana do soma (Barbosa e cols. 2002), sugerindo a necessidade do motivo di-leucina para o recrutamento do transportador para as vesículas intermediárias geradas pela inibição da dinamina I. Estes dados indicam que o VACHT cicla pela membrana plasmática do corpo celular, antes de ser direcionado para vesículas sinápticas. Já foi demonstrado que a sinaptofisina, uma proteína de vesícula sináptica, cicla através da membrana plasmática e compartimentos endocíticos, antes de ser encaminhada para as SLMVs em células PC12 (Régner-Vigouroux e cols. 1991).

Sinais baseados em leucina e tirosina são importantes para o tráfego intracelular. Estes sinais são reconhecidos por proteínas adaptadoras, possibilitando o movimento seletivo de proteínas através dos compartimentos intracelulares. O complexo tetramérico AP2 está envolvido com a internalização de proteínas a partir da membrana plasmática (Kirchhausen 2002). A distribuição do mutante GFP-VACHT L485A/L486A na membrana plasmática sugere que o sinal di-leucina pode interagir e ser reconhecido por proteínas adaptadoras. Para avaliarmos esta hipótese, realizamos experimentos de precipitação utilizando GST, e duplo híbrido em leveduras. Nossos resultados indicam que a região C-terminal do VACHT interage mais fortemente com a subunidade  $\mu$  de AP2, mas também interage com a subunidade  $\sigma$  de AP2. Além disso, verificamos que as interações foram específicas e dependentes do motivo di-leucina (Figura 10, Barbosa e cols. 2002).

Existem evidências de que sinais do tipo di-leucina interagem com as subunidades  $\beta$  dos complexos AP1 e AP2 (Rapoport e cols. 1998; Greenberg e cols. 1998; Bresnahan e cols. 1998). A proteína Nef, do vírus HIV, colocaliza com adaptadores de clatrina na membrana plasmática e no TGN. A mutação do seu sinal di-leucina abole a co-localização com adaptadores na membrana plasmática (Greenberg e cols. 1998). Por outro lado, tem sido demonstrado que sinais de di-leucina também interagem com as subunidades  $\mu$  de AP1 e AP2 (Bremnes e cols. 1998; Rodionov e Bakke 1998; Hofmann e cols. 1999; Craig e cols. 2000; Kongsvik e cols. 2002). A cadeia invariante (Ii) do complexo MHC classe II possui dois sinais di-leucina que são reconhecidos pelas subunidades  $\mu$  de AP1 e AP2. A mutação destes sinais para alanina bloqueia a interação, sugerindo a especificidade destes sinais pelas subunidades  $\mu$  de AP1 e AP2 (Rodionov e Bakke 1998; Hofmann e cols. 1999). Portanto, estes dados corroboram os nossos resultados obtidos com o

VACHT, mostrando que o transportador interage com AP2 através da subunidade  $\mu$ , de uma maneira dependente do motivo di-leucina (Figura 10, Barbosa e cols. 2002).

Têm sido demonstrado que, em algumas proteínas, resíduos acídicos localizados nas posições -4 e -5 acima do par Leu/Leu(Ile) são necessários para a internalização e endereçamento eficientes, como é o caso da cadeia invariante do complexo MHCII e quimeras de CD4/CD3 $\gamma$  (Pond e cols. 1995; Dietrich e cols. 1997). Entretanto, os aminoácidos acídicos anteriores ao motivo do tipo di-leucina presentes no VMAT2 parecem não ser importantes para a endocitose do transportador. A mutação isolada de um dos resíduos acídicos ou dos dois não afeta a endocitose do VMAT2 (Tan e cols. 1998). Recentemente foi verificado que os resíduos acídicos anteriores ao motivo tipo di-leucina são importantes para outros eventos do tráfego do VMAT2, tal como o direcionamento do transportador para a via secretória regulada (Li e cols. 2005). Estes resíduos podem, juntamente com o motivo tipo di-leucina, favorecer o endereçamento do VMAT2 direto para os LDCVs (Li e cols. 2005). Em 2001, Waites e colaboradores verificaram que um motivo acídico localizado nos 8 resíduos finais da sequência C-terminal do VMAT2 seria importante para a retenção do transportador em LDCVs, em células PC12.

Para avaliarmos o envolvimento dos resíduos acídicos próximos do motivo di-leucina na internalização e direcionamento do VACHT, preparamos mutantes em que os resíduos anteriores e posteriores ao motivo di-leucina foram substituídos por alanina e analisamos a distribuição desses mutantes em relação à localização de myc-VAMP2. A distribuição destes mutantes, denominados GFP-VACHT 481-484A e GFP-VACHT D487A-E488A, foi semelhante à da proteína selvagem, mostrando um alto grau de co-localização com myc-VAMP2 (Figura 6, Ferreira e cols. 2005). Portanto, os resíduos acídicos próximos ao motivo di-leucina do VACHT não se

mostraram críticos para o direcionamento do transportador para as vesículas sinápticas. Em algumas proteínas, resíduos acídicos na posição -4 relativa à primeira leucina do sinal di-leucina parecem ser importantes para o direcionamento para endossomas tardios ou lisossomos, e não para internalização, como é o caso da proteína LIMPII (Sandoval e cols. 2000). Através dos experimentos de biotilação de proteínas de superfície nós observamos que o mutante GFP-VACHT 481-484A é detectado na membrana plasmática de maneira mais expressiva do que a proteína selvagem. Como este mutante apresenta um alto grau de co-localização com VAMP2, semelhante ao que acontece com o VACHT wt, esta detecção aumentada na membrana plasmática pode ser devido a um aumento no direcionamento deste mutante para a membrana plasmática ou à uma diminuição na taxa de endocitose. Foi demonstrado recentemente que o VMAT2 com os resíduos acídicos anteriores ao motivo tipo di-leucina mutados (E478 E479) apresenta uma expressão aumentada na membrana plasmática (Li e cols. 2005), sem no entanto apresentar alteração na taxa de endocitose (Li e cols. 2005; Tan e cols. 1998). Esse efeito parece acontecer devido o endereçamento incorreto do VMAT2 para a membrana plasmática (Li e cols. 2005). Existem evidências que o VACHT cicla pela membrana plasmática antes de ser encaminhado para vesículas sinápticas. Portanto, a presença do mutante GFP-VACHT 481-484A na membrana plasmática pode ser devido a um reconhecimento menos eficiente do transportador pelo complexo AP2, o que não impede o direcionamento do transportador para vesículas sinápticas.

A interação do VACHT com o complexo AP2 sugere uma participação do processo endocítico mediado por clatrina no tráfego do transportador. Para avaliarmos de maneira direta o envolvimento de clatrina no tráfego do VACHT

utilizamos o fragmento C-terminal de AP180 (AP180-C), que interage com clatrina e a sequestra quando superexpresso (Zhao e cols. 2001). Desta forma, AP180-C é capaz de bloquear a endocitose de proteínas que dependam de clatrina, como por exemplo, os receptores de EGF e de transferrina (Ford e cols. 2001). Nós observamos que a expressão de AP180-C afeta não apenas a endocitose do GFP-VACHT, como também o seu direcionamento para endossomos e vesículas sinápticas. Este efeito foi observado tanto em células SN56 quanto em PC12. Além disso, verificamos que o tráfego do mutante sem os 40 aminoácidos finais da região C-terminal, GFP-VACHT  $\Delta$ 491-530 (que é semelhante ao da proteína selvagem), é afetado da mesma maneira que o tráfego da proteína selvagem quando AP180-C é superexpresso. Isto sugere que os sinais determinantes para a interação com a maquinaria endocítica de clatrina estão presentes nos 20 aminoácidos iniciais da região C-terminal (471-490) (Figura 14, Ferreira e cols. 2005). Estes dados indicam que o processo de endocitose dependente de clatrina é crítico para a internalização e direcionamento do VACHT para as vesículas sinápticas.

Nossos resultados contradizem os recentemente publicados por Kim e Hersh (2004), onde foi avaliada a interação do VACHT com os adaptadores de clatrina AP1 e AP2. Os resultados deste trabalho sugerem que os 11 últimos aminoácidos da região C-terminal do VACHT formam um sinal de tirosina não clássico, que seria reconhecido por AP2 e que o provável sítio de interação com AP1 seria o motivo di-leucina (L485/L486). Seria plausível pensar que as diferenças observadas no trabalho de Kim e Hersh (2004) e nos dados aqui apresentados fossem devido à utilização de modelos celulares distintos. Entretanto, ao analisarmos a expressão do GFP-VACHT  $\Delta$ 491-530 (sem os 40 aminoácidos finais da região C-terminal) em células PC12 (a mesma linhagem por eles utilizada),

verificamos que este mutante apresenta o mesmo padrão de distribuição subcelular observado para a proteína selvagem, sugerindo que o tráfego do VACHT, em células PC12, também é regulado pelos 20 aminoácidos iniciais da sequência C-terminal. Nossos resultados não descartam, no entanto, a possibilidade da participação secundária de outros sinais presentes na região C-terminal no tráfego do VACHT. Estes sinais podem ter papel importante em outras etapas do tráfego do VACHT, como por exemplo na saída do TGN, um evento ainda não elucidado.

Entre os mutantes que possuem parte dos 20 aminoácidos iniciais alterados, o GFP-VACHT 481-485A foi o que apresentou maior alteração no tráfego. No entanto, o mutante GFP-VACHT 481-484A apresentou o mesmo padrão de distribuição observado para a proteína selvagem (Figura 6, Ferreira e cols. 2005). Estes dados sugerem que, possivelmente, a primeira leucina do motivo di-leucina (L485) exerça um papel significativo no tráfego do VACHT. Para avaliarmos esta possibilidade, realizamos experimentos de co-localização entre o mutante que possui apenas a leucina 485 substituída por alanina, GFP-VACHT L485A, e myc-VAMP2. Este mutante apresentou-se concentrado na membrana plasmática, semelhante ao padrão de distribuição do mutante que contém as duas leucinas alteradas, GFP-VACHT L485A/L486A (Figura 7, Ferreira e cols. 2005), sugerindo que a leucina 485 exerce um papel central na endocitose do VACHT. O transportador de colina de alta afinidade (CHT1) também possui um motivo tipo di-leucina que parece ser determinante para a endocitose do transportador (Ribeiro e cols. 2005). Semelhante ao que acontece com o VACHT, a mutação isolada da leucina 530 do motivo tipo di-leucina (LV) presente no CHT1 bloqueia a endocitose do transportador, levando a um aumento no transporte de colina de alta afinidade (Ribeiro e cols. 2005). Por outro lado, a mutação isolada da isoleucina ou da leucina,

do motivo tipo di-leucina presente no VMAT2, não afeta a endocitose do transportador (Tan e cols. 1998). Portanto, esses dados indicam que o VACHT e o CHT1, marcadores colinérgicos, possuem motivos protéicos similares com função em eventos específicos do tráfego.

Faz-se necessária uma retrospectiva aos dados até agora mostrados para o melhor entendimento dos objetivos traçados a seguir. Já foi demonstrado que a mutação dos aminoácidos 481-485 perturba o tráfego do VACHT, resultando em um acúmulo do transportador em estruturas intracelulares não definidas e na membrana plasmática. O mutante 481-484 apresenta grande co-localização com VAMP2. E finalmente, o mutante que apresenta a leucina 485, ou as leucinas 485 e 486 mutadas fica retido na membrana plasmática.

Levando em consideração estes dados, observa-se que os aminoácidos 481-484 mais as leucinas representam um sinal de tráfego para o VACHT, possivelmente bi-partido. Na tentativa de avaliarmos o papel deste sinal, resolvemos investigar a localização intracelular do mutante GFP-VACHT 481-485A. Uma possibilidade seria o fato deste mutante ficar retido no retículo endoplasmático (ER). Os aminoácidos presentes nesta sequência são ERDVL. Tem sido descrito que sequências de aminoácidos di-acídicos (D/E-X-D/E) ou di-hidrofóbicos (FF-FY-LL-VV) funcionam como sinais de exportação do ER (Mancias e Goldberg 2005; Bonifacino e Glick 2004). As proteínas VSV-G (vesicular stomatitis virus glicoprotein) e LAP (Lysosomal acid phosphatase) possuem sinais DXE que atuam como sinais de exportação do retículo endoplasmático (Nishimura e Balch 1997). ERGIC-53, uma proteína marcadora de ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment), possui, no seu domínio citoplasmático, dois resíduos de fenilalanina que promovem a sua saída do ER (Kappeler e cols. 1997). Recentemente, a sequência de aminoácidos

FN(X)<sub>2</sub>LL(X)<sub>3</sub>L foi descrita no receptor de vasopressina V1b/V3 como sendo importante para exportação do receptor do ER (Robert e cols. 2005).

Desta forma, realizamos experimentos de co-localização entre o mutante GFP-VACHT 481-485A e um marcador de retículo endoplasmático, a proteína RFP-ER. A distribuição subcelular do mutante GFP-VACHT 481-485A assemelha-se à distribuição da proteína RFP-ER, sugerindo que os aminoácidos 481-485 podem conter informações importantes para a saída do VACHT do ER. Foi observada co-localização entre estas proteínas tanto no citossol, quanto no envelope nuclear. Ao contrário, nenhuma das outras construções testadas, GFP-VACHT481-484A, GFP-VACHT wt e L485A L486A co-localizou com RFP-ER. É possível que para sair do ER, o VACHT possa utilizar tanto o sinal di-acídico (ERDV) quanto o sinal di-hidrofóbico (L485 L486) presente em sua região C-terminal. Esta hipótese explicaria o fato do mutante contendo os aminoácidos ERDV (481-484) substituídos por alanina co-localizar com VAMP2, e o mutante com as leucinas mutadas (L485 L486) concentrar-se na membrana plasmática. Ambos são capazes de deixar o ER, mas o mutante di-leucina fica retido na membrana pois este sinal é também importante para a endocitose do transportador (Ferreira e cols. 2005). A importância deste sinal de exportação, identificado no VACHT, ainda precisa ser avaliada em outros ensaios. Através de fracionamento subcelular e isolamento de retículo endoplasmático, poderá ser verificada diretamente a importância deste sinal para a saída do VACHT deste compartimento. Além disso, mutações pontuais nos aminoácidos ácidos e hidrofóbicos presentes na região compreendida pelos resíduos 481-485 certamente serão importantes para a identificação, com precisão, do sinal de exportação do ER no VACHT.

Nossos estudos e de outros grupos têm permitido a identificação das vias de tráfego percorridas pelo VACHT a caminho das vesículas sinápticas. Entretanto, ainda existem muitos aspectos para serem avaliados. A fim de identificar interações proteína-proteína que fossem importantes para o tráfego do VACHT, nós vasculhamos uma biblioteca de cDNA de cérebro de humano utilizando a técnica de duplo híbrido em leveduras.

Uma interação, obtida no duplo híbrido em leveduras, que nos chamou a atenção foi entre SEC14/like e VACHT, e por isso, resolvemos avaliar a veracidade e relevância desta interação para o tráfego do transportador. SEC14 é uma proteína aparentemente citossólica, envolvida em *Saccharomyces cerevisiae*, com a exportação de proteínas secretórias do complexo de Golgi (Bankaitis e cols. 1989). SEC14 possui propriedades bioquímicas semelhantes às PITP (phosphatidylinositol transfer proteins), embora não apresentem homologia de sequência (Cockcroft 1998). As PITPs estão envolvidas na transferência de moléculas de fosfatidilinositol (PI) ou fosfatidilcolina (PC) entre compartimentos membranosos (Cockcroft 1998). Várias funções diferentes foram atribuídas à PITPs em células de mamífero. PITPs estão envolvidas na hidrólise de fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP<sub>2</sub>) mediada por fosfolipase C (Thomas e cols. 1993), na fosforilação de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub> (Kular e cols. 1997), na exocitose regulada (Hay e Martin 1993) e brotamento de vesículas secretórias (Ohashi e cols. 1995). SEC14/like, o homólogo de SEC14 em humanos, é ainda uma proteína pouco descrita. Através da análise da sua sequência primária de aminoácidos, observa-se que a proteína apresenta três domínios: PRELI\_MSF1, CRAL\_TRIO e GOLD. Acredita-se que o domínio PRELI\_MSF1 tenha uma função associada a ligação à membrana plasmática (Anantharaman & Aravind, 2002). CRAL\_TRIO é um domínio que constitui uma região hidrofóbica capaz de fazer

ligações com lipídeos. É encontrado em proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), em proteínas trocadoras de nucleotídeos de guanina (GEF) e em uma família de proteínas ligadoras de regiões hidrofóbicas, incluindo SEC14. Embora a função deste domínio não esteja completamente determinada, acredite-se que ele esteja envolvido no direcionamento e tráfego de proteínas mitocondriais, assim como estruturação e remodelamento de actina, necessários para a migração e crescimento celular (Sha e cols. 1998; Zimmer e cols. 2000). O domínio GOLD (*Golgi dynamics*) é encontrado em várias proteínas do complexo de Golgi de eucariotos e proteínas envolvidas no tráfego de lípidos. Acredita-se, que através do domínio GOLD diversas interações proteína-proteína aconteçam (Anantharaman e cols. 2002). A presença destes domínios sugere fortemente que SEC14/like pode desempenhar papéis importantes no tráfego intracelular.

Para verificarmos se a interação entre VACHT e SEC14/like observada com a técnica de duplo híbrido em leveduras era específica realizamos experimentos de co-imunoprecipitação. Células PC12 expressando HA-VACHT de maneira estável e células PC12 selvagens foram transfectadas com SEC14/like-myc. Observamos que tanto o fragmento de SEC14/like “pescado” no duplo híbrido em leveduras quanto a proteína completa, co-imunoprecipitam com HA-VACHT de maneira específica. Em seguida, decidimos avaliar se estas proteínas seriam encontradas nos mesmos compartimentos intracelulares. Células SN56 foram co-transfectadas com SEC14/like e GFP-VACHT. Observamos que na presença de SEC14/like, a distribuição subcelular de GFP-VACHT é alterada. Ao invés da distribuição pontuada no soma e varicosidades dos neuritos, características da proteína selvagem, observa-se uma distribuição concentrada em estruturas de tamanho aumentado no soma, embora também haja marcação nas varicosidades. SEC14/like é uma proteína que,

possivelmente, possui atividade de transferência de fosfolípidos e portanto, sua super-expressão pode estar perturbando o processo de brotamento e fusão de vesículas secretórias. Como a região de SEC14*like* que foi detectada no duplo híbrido foi o fragmento C-terminal que corresponde ao domínio GOLD, provavelmente a interação entre VACHT e SEC14 acontece através deste domínio. Proteínas que possuem o domínio GOLD e domínios de ligação à lipídeos e membranas parecem estar envolvidas na montagem de complexos protéicos associados à membrana do Golgi ou à membrana de vesículas de transporte (Anantharaman e Aravind 2002). Portanto, é possível que SEC14*like* atue nos eventos iniciais do tráfego do transportador.

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo revelam a existência de sinais importantes para o tráfego do transportador vesicular de acetilcolina na porção C-terminal da proteína, e fortalecem observações prévias de que o VACHT utiliza a maquinaria de tráfego no corpo celular, antes de ser direcionado para as varicosidades. Aparentemente, conseguimos identificar no VACHT um sinal de exportação do retículo endoplasmático. O papel deste sinal ainda precisa ser reavaliado, mas se confirmada sua importância para a saída do VACHT do retículo endoplasmático, será o primeiro sinal com função de tráfego identificado nesse compartimento para uma proteína de vesícula sináptica. Após sua saída do retículo endoplasmático, o VACHT é direcionado para o TGN, onde é glicosilado e então encaminhado para a membrana plasmática. Kim e Hersh (2004) sugerem que para sair do TGN o VACHT conta com a interação entre o seu motivo di-leucina e o complexo AP1. Entretanto, os resultados apresentados por Kim e Hersh são controversos, uma vez que a mutação do motivo di-leucina não levou a um acúmulo do transportador no TGN. Nossos dados indicam que ao alcançar a membrana

plasmática, o VACHT conta com a presença de um motivo di-leucina, que promove a internalização do transportador, através da interação com o complexo adaptador de clatrina AP2. O uso de AP180-C confirma a importância do processo de endocitose dependente de clatrina não só na internalização do VACHT como também no direcionamento para SLMVs. Além disso, nossos resultados indicam que os sinais críticos para o tráfego do VACHT concentram-se nos 20 aminoácidos iniciais (471-490) da região C-terminal. Ainda existem muitos aspectos no tráfego do VACHT para serem investigados. Estudos adicionais sobre a interação do VACHT com SEC14*like* podem fornecer novas informações a respeito do tráfego do transportador. Estes estudos podem esclarecer os mecanismos através dos quais uma proteína, provavelmente envolvida com transferência de fosfolípidos entre membranas influencia o tráfego de proteínas de vesículas sinápticas.

## **VI- Conclusões**

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite tirar as seguintes conclusões:

- 1 - EGFP-VACHT é direcionado para organelas tipo vesículas sinápticas em células SN56;
- 2 - Os aminoácidos 481-490 são fundamentais para o tráfego e estabilidade do VACHT;
- 3 - Os aminoácidos 481-485 do VACHT parecem conter um sinal bi-partido de exportação do ER;
- 4 - A região carboxi-terminal do VACHT interage *in vitro* com o complexo adaptador de clatrina AP2;
- 5 - O bloqueio da endocitose mediada por clatrina afeta a internalização e o tráfego de EGFP-VACHT;
- 6 - O aminoácidos 471-490 do VACHT interagem com a maquinaria endocítica dependente de clatrina;
- 7 - SEC14like interage com VACHT.

## **VII – Referências Bibliográficas**

- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000). Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci.*; **3(5)**:445-51.
- Akert K, Moor H, Pfenninger K (1971). Synaptic fine structure. *Adv. Cytopharmacol.***1**: 273-90.
- Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, Han He-Ping, Rand, JB (1993) The *Caenorhabditis elegans* unc-17 Gene: A Putative Vesicular Acetylcholine Transporter. *Science*, **261**, 617-619.
- Ali BR, Seabra MC (2005). Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem Soc Trans.* **33(Pt 4)**:652-6.
- Allen-Baume V, Ségui B and Cockcroft (2002). Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. *FEBS Letters*, **531**:74-80.
- Anantharaman V, Aravind L (2002). The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.***3(5)**:research0023.1-0023.7.
- Antonin W, Riedel D, von Mollard GF (2000). The SNARE Vti1a-beta is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J Neurosci.*, **20(15)**:5724-32.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Mutagenesis of cloned DNA, in *Current Protocols in Molecular Biology*, Section 8.5:5-9. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience New York 1991.
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD and Greene R (1989). The *Saccharomyces Cerevisiae* Sec14 Gene Encodes A Cytosolic Factor That Is Required for Transport of Secretory Proteins from the Yeast Golgi-Complex. *Journal of Cell Biology* **108**, 1271-1281.
- Bankaitis VA, Phillips S, Yanagisawa L, Li X, Routt S, Xie Z (2005). Phosphatidylinositol transfer protein function in the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae.

*Adv Enzyme Regul.* **45**:155-70.

Barbosa J Jr, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF (2002). Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J Neurochem.* **82(5)**:1221-8.

Barbosa JJr, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF and Prado AM (1999). Expression of The Vesicular Acetylcholine Transporter, Proteins Involved in Exocytosis, and Functional Calcium Signaling in Varicosities and Soma of a Murine Septal Cell Line. *Journal of Neurochemistry*, **73**, 1881-1893.

Barker LA, Dowdall MJ, Whittaker VP (1972). Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. Stable-bound acetylcholine. *Biochem J.*, **130(4)**:1063-75.

Barlowe C (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.*, **1404(1-2)**:67-76.

Benfenati F, Greengard P, Brunner J, Bahler M (1989). Electrostatic and hydrophobic interactions of synapsin I and synapsin I fragments with phospholipid bilayers. *J Cell Biol*, **108(5)**:1851-62.

Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol.* **3(5)**:492-8.

Berse B, Blusztajn JK (1995). Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem.* **270(38)**:22101-4.

Berse B, Blusztajn JK (1997). Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid is cell-type specific. *FEBS Lett.* **410(2-3)**:175-9.

Black MW and Pelham HRB (2001). Membrane traffic: How do GGAs fit in with the adaptors. *Current Biology*, 11: R460-R462.

Blagoveshchenskaya AD, Hewitt EW, Cutler DF (1999). Di-leucine signals mediate targeting of tyrosinase and synaptotagmin to synaptic-like microvesicles within PC12 cells. *Mol Biol Cell* **10(11)**:3979-90.

Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, Wainer BH (1992). Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. *J Neurosci.* **12(3)**:793-9.

Bonifacino JS, Glick BS (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* **116(2)**:153-66.

Bonifacino JS, Traub LM (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.*, **72**:395-447.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bremnes T, Lauvrak V, Lindqvist B, Bakke O (1998). A region from the medium chain adaptor subunit ( $\mu$ ) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem.* **273(15)**:8638-45.

Bresnahan, PA., Yonemoto, W, Ferrell, S, Williams-Herman, D, Geleziunas, R e Greene, WC (1998). A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Current Biology*, **8**, 1235-1238.

Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell*

*DevBiol*,**17**:517-68.

Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *Cell Biol.*, **57(2)**:499-524.

Chavrier P, Goud B (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.*, **11(4)**:466-75.

Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K, Zerial M (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**:317-329.

Chen YA, Scales SJ, Scheller RH (2001). Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron*, **30(1)**:161-70.

Cho GW, Kim MH, Chai YG, Gilmor ML, Levey AI, Hersch LB (2000). Phosphorylation of the rat vesicular acetylcholine transporter. *J Biol Chem.* **275(26)**:19942-8.

Cockcroft, S (1998). Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *BioEssays*, **20**:423-432.

Craig HM, Reddy TR, Riggs NL, Dao PP, Guatelli JC (2000). Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology*, **271(1)**:9-17.

Cremona O and De Camilli P (2001). Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci.*, **114(Pt 6)**:1041-52.

Cremona O, De Camilli P (1997). Synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol.*, **7(3)**:323-30.

De Camilli and Jahn R (1990). Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu Rev Physiol.*, **52**:625-45.

De Camilli P, Takei K (1996). Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron*, **16(3)**:481-6.

Deken SL, Beckman ML, Boos L, Quick MW (2000). Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nat Neurosci*. **3(10)**:998-1003.

Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C (1997). Regulation and Function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J. Cell Biol.* **138**, 271-281.

Duvernay MT, Zhou F, Wu G (2004). A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem.* **279(29)**:30741-50.

Erickson JD, Varoqui H (2000). Molecular analysis of vesicular amine transporter function and targeting to secretory organelles. *FASEB J* **14(15)**:2450-8.

Erickson JD, Varoqui H, Schäfer MKH, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI and Usdin TB (1994). Functional Identification of a Vesicular Acetylcholine Transporter and Its Expression from a "Cholinergic" Gene Locus. *The Journal of Biological Chemistry*, **269 (35)**, 21929-21932.

Fernández-Chacón R and Südhof T (1999). GENETICS OF SYNAPTIC VESICLE FUNCTION: Toward the Complete Functional Anatomy of an Organelle. *Ann Review of Physiology*, **61**: 753-776 .

Ferreira LT, Santos MS, Kolmakova NG, Koenen J, Barbosa J Jr, Gomez MV, Guatimosim C, Zhang X, Parsons SM, Prado VF, Prado MA (2005). Structural requirements for steady-state localization of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem.* **94(4)**:957-69.

Fischer von Mollard G, Südhof TC, Jahn R (1991). A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis. *Nature*, 349(6304):79-81.

- Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR, McMahon HT (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* **291(5506)**:1051-5.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11(4)**:355-60.
- Gilmor ML, Nash NR, Roghani A, Edwards RH, Yi H, Hersch SM, Levey AI (1996). Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci.* **16(7)**:2179-90.
- Gonzalez L Jr and Scheller RH (1999). Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell.*, **96(6)**:755-8.
- González-Gaitán M, Jackle H (1997). Role of Drosophila alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell*, **88**:767-776.
- Gorelick FS and Shugrue C (2001). Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol.*, **177(1-2)**:13-8.
- Greenberg M, DeTulleo L, Rapoport I, Skwronski J and Kirchhausen T (1998). A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol.* 8(22):1239-42 *Current Biology*, **8**, 1239-1242.
- Grote E, Hao JC, Bennett MK, Kelly RB (1995). A targeting signal in VAMP regulating transport to synaptic vesicles. *Cell.* **81(4)**:581-9.
- Grote E, Kelly RB (1996). Endocytosis of VAMP is facilitated by a synaptic vesicle targeting signal. *J Cell Biol.* **132(4)**:537-47.
- Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH (1990). Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* **512(2)**:190-200.

Hannah MJ, Schmidt AA, Huttner WB (1999). Synaptic vesicle biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**:733-98.

Hao W, Luo Z, Zheng L, Prasad K, Lafer EM (1999). AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J Biol Chem.*, **274(32)**:22785-94.

Harata NC, Choi S, Pyle JL, Aravanis AM, Tsien RW (2006). Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron*, **49(2)**:243-56.

Hay JC, Martin TF (1993). Phosphatidylinositol transfer protein required for ATP-dependent priming of Ca(2+)-activated secretion. *Nature*, **366(6455)**:572-5.

Heuser JE and Reese TS (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **57**, 315-344.

Hirst J, Robinson MS (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta.*; **1404(1-2)**:173-93.

Hofmann MW, Honing S, Rodionov D, Dobberstein B, von Figura K, Bakke O (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* **274(51)**:36153-8.

Hosaka M, Hammer RE, Sudhof TC (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron*, **24(2)**:377-87.

Hunziker W, Geuze HJ (1996). Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays.* **18(5)**:379-89.

Huttner WB, Ohashi M, Kehlenbach RH, Barr FA, Bauerfeind R, Braunling O, Corbeil D, Hannah M, Pasolli HA, Schmidt A et al (1995). Biogenesis of neurosecretory vesicles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; **60**: 315-327.

Jahn, R and Südhof, TC (1994). Synaptic Vesicles and Exocytosis. *Annu. Rev. Neurosc.*, **17**, 219-46.

Janvier K, Kato Y, Boehm M, Rose JR, Martina JA, Kim BY, Venkatesan S, Bonifacino JS (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma 3 hemicomplexes. *J Cell Biol.* **163(6)**:1281-90.

Janz R, Südhof TC (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* **94(4)**:1279-90.

Kalthoff C, Alves J, Urbanke C, Knorr R, Ungewickell EJ (2002). Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *Biol Chem.*, **277(10)**:8209-16.

Kappeler F, Klopfenstein DR, Foguet M, Paccaud JP, Hauri HP (1997). The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J Biol Chem.* **272(50)**:31801-8.

Kelly R. (1991). Secretory granule and synaptic vesicle formation. *Curr Opin Cell Biol.* **3 (4)**: 654-60.

Kelly RB (1999). Deconstructing membrane traffic. *Trends Cell Biol.*, **9(12)**:M29-33.

Kelly, R. (1993) Loading synaptic vesicle with neurotransmitters. *Curr Biol.*, **3 (1)**: 59-61.

- Kim MH, Hersh LB (2004). The vesicular acetylcholine transporter interacts with clathrin-associated adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J Biol Chem.* **279(13)**:12580-7.
- Kim WT, Chang S, Daniell L, Cremona O, Di Paolo G, De Camilli P (2002). Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptojanin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99(26)**:17143-8.
- Kirchhausen T (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **15**:705-32.
- Kirchhausen T (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem.*, **69**:699-727.
- Kirchhausen T (2002). Clathrin adaptors really adapt. *Cell*, **109(4)**:413-6.
- Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol.*, **9(4)**:488-95.
- Klenchin VA, Martin TF (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie.* **82(5)**:399-407.
- Koenig JH, Ikeda K (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J. Neurosci.*, **9**:3844-3860.
- Kongsvik TL, Honing S, Bakke O, Rodionov DG (2002). Mechanism of interaction between leucine-based sorting signals from the invariant chain and clathrin-associated adaptor protein complexes AP1 and AP2. *J Biol Chem.* **277(19)**:16484-8.
- Krantz DE, Waites C, Oorschot V, Liu Y, Wilson RI, Tan PK, Klumperman J, Edwards RH (2000). A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. *J Cell Biol.* **149(2)**:379-96.
- Kular G, Loubtchenkov M, Swigart P, Whatmore J, Ball A, Cockcroft S, Wetzker R. (1997) Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide

- 3-kinase gamma in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem J.* **325 ( Pt 2)**:299-301.
- Kushmerick C, Romano-Silva MA, Gomez MV, Prado MA (2001). Changes in Ca<sup>(2+)</sup> channel expression upon differentiation of SN56 cholinergic cells. *Brain Res.*, **916(1-2)**:199-210.
- Lafer EM (2002). Clathrin-protein interactions. *Traffic*, **3(8)**:513-20.
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci* **96(7)**:3712-7
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*, **297(5584)**:1193-6.
- Lee HJ, Hammond DN, Large TH, Roback JD, Sim JA, Brown DA, Otten UH, Wainer BH (1990b). Neuronal properties and trophic activities of immortalized hippocampal cells from embryonic and young adult mice. *J. Neurosci.* **10**, 1779-1787.
- Lee HJ, Hammond DN, Large TH, Wainer BH (1990a). Immortalized young adult neurons from the septal region: generation and characterization. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **52**, 219-228.
- Li H, Waites CL, Staal RG, Dobryy Y, Park J, Sulzer DL and Edwards, RH (2005). Sorting of Vesicular Monoamine Transporter 2 to the Regulated Secretory Pathway Confers the Somatodendritic Exocytosis of Monoamines. *Neuron*, **48**: 619-633.
- Li, L and Chin, LS (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *CMLS Cellular and Molecular Life Science*, **60**: 942-960.

- Littleton JT, Chapman ER, Kreber R, Garment MB, Carlson SD, Ganetzky B (1998). Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. *Neuron*, **21(2)**:401-13.
- Liu Y and Edwards RH (1997). Differential Localization of Vesicular Acetylcholine and Monoamine Transporters in PC12 Cells but Not CHO Cells. *The Journal of Cell Biology*, **139(4)**, 907-916.
- Liu Y, Krantz DE, Waites C and Edwards RH (1999). Membrane trafficking of Neurotransmitter transporters in the regulation of synaptic transmission. *Trends in CELL BIOLOGY*, **9**, 356-363.
- Mancias, JD and Goldberg J (2005). Exiting the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*, **6**:278-285.
- Martin TF (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **14**:231-64.
- Martin TF (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol.* **13(4)**:493-9.
- Martinez O and Goud B (1998). Rab proteins. *Biochim Biophys Acta.*, **1404(1-2)**:101-12.
- Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R (1988). Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem*, **263(30)**:15423-8.
- McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, **379(6563)**:353-7.

Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.*, **377(Pt 1)**:1-16.

Murthy VN, Stevens CF (1998). Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature*, **392(6675)**:497-501.

Nakata T, Terada S and Hirokawa N (1998). Visualization of the Dynamics of Synaptic Vesicle and Plasma Membrane Proteins in Living Axons. *J. Cell Biology*, **140(3)**, 59-674.

Nakayama K, Wakatsuki S (2003). The structure and function of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. *Cell Struct Funct.* **28(5)**:431-42.

Nguyen ML, Cox GD and Parsons SM (1998). Kinetic Parameters for the Vesicular Acetylcholine Transporter: Two protons are Exchange for one Acetylcholine. *Biochemistry*, **37 (38)**, 13400-13410.

Nishimura N, Balch WE (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277(5325)**:556-8.

O'Connor V, Heuss C, De Bello WM, Dresbach T, Charlton MP, Hunt JH, Pellegrini LL, Hodel A, Burger MM, Betz H, Augustine GJ, Schafer T (1997). Disruption of syntaxin-mediated protein interactions blocks neurotransmitter secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94(22)**:12186-91.

Odorizzi G, Babst M, Emr SD (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci.*, **25(5)**:229-35.

Ohashi M, Jan de Vries K, Frank R, Snoek G, Bankaitis V, Wirtz K, Huttner WB (1995). A role for phosphatidylinositol transfer protein in secretory vesicle formation. *Nature*. **377(6549)**:544-7.

Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81(5)**:769-80.

- Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS (1998). ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol.*, **142(2)**:391-402.
- Owen DJ, Vallis Y, Pearse BM, McMahon HT, Evans PR (2000). The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.*, **19(16)**:4216-27.
- Parsons, S.M (2000). Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *The FASEB Journal*, **14**, 2423-2434.
- Pearse BM, Robinson MS (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol.*, **6**:151-71.
- Pedersen WA, Blusztajn JK (1997). Characterization of the acetylcholine-reducing effect of the amyloid-beta peptide in mouse SN56 cells. *Neurosci Lett.* **239(2-3)**:77-80.
- Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F (2003). Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevinII to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* **14(12)**:4909-19.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303(5657)**:495-9.
- Pieribone VA, Shupliakov O, Brodin L, Hilfiker-Rothenfluh S, Czernik AJ, Greengard P (1995). Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature*, **375(6531)**:493-7.
- Pond L, Kuhn LA, Teyton L, Schutze MP, Tainer JA, Jackson MR, Peterson PA (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem.* **270(34)**:19989-97.
- Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, Bonifacino JS (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science*, **292(5522)**:1712-6.

- Pyle JL, Kavalali ET, Piedras-Renteria ES, Tsien RW (2000). Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **28(1)**:221-31.
- Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J.*, **20(17)**:5008-21.
- Rapoport I, Chen YC, Cupers P, Shoelson SE, Kirchhausen T (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* **17(8)**:2148-55.
- Regnier-Vigouroux A, Tooze SA, Huttner WB (1991). Newly synthesized synaptophysin is transported to synaptic-like microvesicles via constitutive secretory vesicles and the plasma membrane. *EMBO Journal*, **10(12)**: 3589-601.
- Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, Wilhelm A, Gomez MV, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2003). The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *J Neurochem.* **87(1)**:136-46.
- Ribeiro FM, Black SA, Cregan SP, Prado VF, Prado MA, Rylett RJ, Ferguson SS (2005). Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J Neurochem.* **94(1)**:86-96.
- Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ (2000). Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron*, **27(3)**:551-9.
- Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von Figura K, Honing S (2002). Phosphorylation of the AP2  $\mu$  subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol.*, **156(5)**:791-5.
- Rizzoli SO and Betz WJ (2002). Effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one on synaptic vesicle cycling at the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.* **22**: 10680-89.

Robert J, Clauser E, Petit PX, Ventura MA (2005). A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J Biol Chem.* **280(3)**:2300-8.

Rodionov DG, Bakke O (1998). Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J. Biol Chem.* **273(11)**:6005-8.

Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi, A., Gundersen, C. B., Brecha, N. e Edwards, R. H. (1994). Molecular Cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 10620-10624.

Rosoff ML, Wei J, Nathanson NM (1996). Isolation and characterization of the chicken m2 acetylcholine receptor promoter region: induction of gene transcription by leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci* **93(25)**:14889-94.

Rothman JE (1994). Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **29**:81-96.

Sandoval IV, Martinez-Arca S, Valdueza J, Palacios S, Holman GD (2000). Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMPII and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* **275(51)**:39874-85.

Santos MS, Barbosa J Jr, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2001). Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem.*, **78(5)**:1104-13.

Santos, MS (2002), Tráfego do Transportador Vesicular de Acetilcolina. Tese de D.Sc., ICB/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Poverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block

- neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. **359(6398)**:832-5.
- Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem.*, **273(35)**:22161-4.
- Schmid SL (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem.*, **66**:511-48.
- Scott DB, Blanpied TP, Swanson GT, Zhang C e Ehlers MD (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neuroscience*, **21(9)**: 3063-3072.
- Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camillil P, Brodin L (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*, **276**:259-263.
- Sitte HH, Farhan H, Javitch JA (2004). Sodium-Dependent Neurotransmitter TRANSPORTERS: OLIGOMERIZATION as a Determinant of Transporter Function and Trafficking. *Mol Interv.* **4(1)**:38-47.
- Stevens CF and Williams JH (2000). "Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97(23)**:12828-33.
- Sudhof TC (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*,**375(6533)**:645-53.
- Sudhof TC (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron*, **28(2)**:317-20.
- Sudhof TC (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* , **27**:509-47.
- Sudhof TC and Jahn R (1991). Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, **6(5)**:665-77.
- Tan PK, Waites C, Liu Y, Krantz DE and Edwards RH (1998). A Leucine-based Motif Mediates the Endocytosis of Vesicular Monoamine and Acetylcholine Transporters. *J Biol Chem*, **273 (28)**, 17351-17360.

- Teasdale RD and Jackson MR (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **12**:27-54.
- Tebar F, Sorkina T, Sorkin A, Ericsson M, Kirchhausen T (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem.*, **271(46)**:28727-30.
- Thomas GM, Cunningham E, Fensome A, Ball A, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Cockcroft S (1993). An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell.* **74(5)**:919-28.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon, J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76(9)**:4350-4.
- Trimble WS, Linial M, Scheller RH (1991). Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal *Annu Rev Neurosci.* **14**:93-122.
- Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol.* **9**:129-61.
- Tsukita S and Ishikawa H (1980). The movement of membranous organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. *J. Cell Biol.* **84**: 513-530.
- Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI and Erickson JD (1995). Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neuroscience*, **18**: 218-224.
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, **26(4)**: 445-53.
- Varoqui H, Diebler MF, Meunier FM, Rand JB, Usdin TB, Bonner TI, Eiden LE, Erickson JD (1994). Cloning and expression of the vesamicol binding protein from the marine ray Torpedo. Homology with the putative vesicular acetylcholine transporter UNC-17 from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **342**, 97-102.

Varoqui H. and Erickson JD (1998). The Cytoplasmic Tail of the Vesicular Acetylcholine Transporter Contains a Synaptic Vesicle Targeting Signal. *The Journal of Biological Chemistry*, **273(15)**, 9094-9098.

Volkandt W, Kuster F, Wilhelm A, Obermüller E, Steinmann A, Zhang L, Zimmermann H (2002). Expression and allocation of proteins of the exo-endocytotic machinery in U373 glioma cells: similarities to long-term cultured astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* **22(2)**:153-69.

Waites CL, Mehta A, Tan PK, Thomas G, Edwards RH, Krantz DE (2001). An acidic motif retains vesicular monoamine transporter 2 on large dense core vesicles. *J Cell Biol.* **152(6)**:1159-68.

Weihe E, Tao-Cheng JH, Schafer MK, Erickson JD, Eiden LE (1996). Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci* **93(8)**:3547-52.

West AE, Neve RL, Buckley KM (1997). Targeting of the synaptic vesicle protein synaptobrevin in the axon of cultured hippocampal neurons: evidence for two distinct sorting steps. *J Cell Biol.* **139(4)**:917-27.

Zhao X, Greener T, Al-Hasani H, Cushman SW, Eisenberg E, Greene LE (2001). Expression of auxilin or AP180 inhibits endocytosis by mislocalizing clathrin: evidence for formation of nascent pits containing AP1 or AP2 but not clathrin. *J Cell Sci.* **114(Pt 2)**:353-65.