

Stefany Fontes Domingues

CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES
PROTÉICAS ENVOLVIDAS NO TRÁFEGO
CELULAR DO TRANSPORTADOR DE
COLINA DE ALTA AFINIDADE - CHT1

Belo Horizonte
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2006

Stefany Fontes Domingues

**CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES
PROTÉICAS ENVOLVIDAS NO TRÁFEGO
CELULAR DO TRANSPORTADOR DE COLINA DE
ALTA AFINIDADE – CHT1**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientador: *Marco Antônio Máximo Prado*
Co-orientadora: *Vânia Ferreira Prado*

Belo Horizonte

Fevereiro

2006

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia e no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Guggenheim Foundation

Agradecimentos

Agradeço a Deus por conduzir os caminhos da minha vida a todo instante, por ser a minha luz e por mais uma vez permitir que eu realizasse outro sonho.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, por confiarem em mim e pelo amor.

À minha querida irmã, pelo carinho, torcida, amizade, companheirismo, enfim, pelo amor fraternal.

Aos meus orientadores pelos ensinamentos e pelo exemplo de competência.

Aos professores Marcus Vinícius e Marco Aurélio pelos ensinamentos.

A todos os amigos e colegas dos laboratórios de Neurofarmacologia e Neurobiologia Molecular.

A Fabíola, pela amizade ouropretana interminável, pelos ensinamentos, conversas, pela paciência e pelo exemplo de profissionalismo.

A Lucimar pelos conselhos, pela ajuda, paciência e amizade.

Às amigas Ana Cristina e Dani, as metades da laranja que são fundamentais durante meu dia-a-dia em BH. Agradeço pela amizade de coração, pela paciência, brincadeiras, pelo respeito, conselhos, enfim por tudo.

Aos amigos Bruno, Gegê e Bráulio pelas brincadeiras, palhaçadas, conselhos, conversas, companheirismo e por fazerem com que o trabalho se torne um assunto sério, porém agradável.

Às inesquecíveis Jáila e Monalisa que sempre farão parte da minha vida e que sempre me alegram com sua presença e com seus conselhos. Amo vocês.

“Tudo que não me mata me fortalece”

Friedrich Nietzsche

Índice

Lista de figuras e tabela	IX
Lista de abreviaturas	X
Símbolos dos aminoácidos	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
1 – Introdução	01
1.1 – A acetilcolina e o sistema colinérgico	02
1.2 – A dinâmica da transmissão colinérgica	04
1.2.1 – A liberação de neurotransmissores	04
1.2.2 – A liberação de ACh	05
1.2.3 – O CHT1 e o sistema colinérgico	08
1.2.4 – A localização celular do CHT1	12
1.2.5 – A regulação da transmissão colinérgica	13
1.2.6 – CHT1 e a doença de Alzheimer	17
1.3 – Tráfego celular	18
1.4 – Duplo híbrido em leveduras	20
2 – Objetivos	22
2.1 – Objetivo geral	23
2.2 – Objetivos específicos	23
3 – Material e métodos	24
3.1 – Vetor pACT2	25
3.2 – Vetor pGBKT7	25

3.3 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	28
3.4 – Duplo híbrido em leveduras	28
3.5 – Vetores eucariotos	29
3.5.1 – pCDNA 3.1 (-)	29
3.5.2 – pCMV-Myc	29
3.6 – Cultura celular	29
3.6.1 – HEK 293	29
3.6.2 – SN56	30
3.7 – Plaqueamento e transfecção	31
3.7.1 – Lipofectamina	31
3.7.2 – Fosfato de cálcio	31
3.8 – Co-imunoprecipitação	32
3.9 – Transporte de colina	33
3.10 – Gel SDS-PAGE e Western blot	34
3.10.1 – CHT1-FLAG	34
3.10.2 – SEC14-Myc	34
3.11 - Imunofluorescência	35
4 – Resultados	36
4.1 – Interações detectadas no duplo híbrido em leveduras	37
4.1.1 – Interação CHT1 x MAP1A	37
4.1.2 – Interação CHT1 x BRI3	40
4.1.3 – Interação CHT1 x Rab14	42
4.1.4 – Interação CHT1 x Niscarina	44
4.1.5 – Interação CHT1 x Flotilina	46
4.1.6 – Interação CHT1 x SEC14 <i>like</i>	48
4.2 – Co-imunoprecipitação CHT1 – SEC14 <i>like</i>	50
4.3 – O CHT1-FLAG co-localiza com SEC14 <i>like</i> – myc em células SN56 diferenciadas	53
4.4 – O transporte de colina de alta afinidade realizado pelo CHT1-FLAG é alterado pela superexpressão de SEC14 <i>like</i> – myc em células	

HEK 293	58
5 – Discussão	61
5.1 – Duplo híbrido em leveduras	62
5.2 – Considerações sobre o duplo híbrido em leveduras	65
5.3 – O CHT1 e o sistema colinérgico	66
5.4 – Análise das interações observadas no duplo híbrido em leveduras	67
5.4.1 – Interação CHT1 x MAP1A	69
5.4.2 – Interação CHT1 x BRI3	70
5.4.3 – Interação CHT1 x Flotilina1	71
5.4.4 – Interação CHT1 x SEC14like	73
5.5 – A distribuição do CHT1 é modificada pela superexpressão de SEC14like em células SN56	77
5.6 – SEC14like quando superexpressa diminui a atividade do CHT1 em 30%	78
6 – Conclusões	80
7 – Referências bibliográficas	82

Lista de Figuras e Tabela

Figura 1:	Desenho esquemático representando a neurotransmissão colinérgica	06
Figura 2:	Estrutura secundária proposta para o CHT1	11
Figura 3:	Mapa esquemático do vetor pACT2	26
Figura 4:	Mapa esquemático do vetor pGBKT7	27
Figura 5:	CHT1 e MAP1A interagem no duplo híbrido em leveduras	39
Figura 6:	CHT1 e BRI3 interagem no duplo híbrido em leveduras	41
Figura 7:	CHT1 e Rab14 não interagem no duplo híbrido em leveduras	43
Figura 8:	CHT1 e Niscarina não interagem no duplo híbrido em leveduras	45
Figura 9:	CHT1 e Flotilina1 interagem no duplo híbrido em levedura	47
Figura 10:	CHT1 e SEC14 <i>like</i> interagem no duplo híbrido em leveduras	49
Figura 11:	Co-imunoprecipitação CHT1-FLAG x SEC14 <i>like</i> -myc	52
Figura 12:	Imagens de imunofluorescência em microscopia confocal em células SN56 diferenciadas, transfectadas isoladamente com CHT1-FLAG e SEC14 <i>like</i> -myc	55
Figura 13:	Imagens de imunofluorescência em microscopia confocal em células SN56 diferenciadas, co-transfectadas com CHT1-FLAG e SEC14 <i>like</i> -myc	56
Figura 14:	Imagens de imunofluorescência em microscopia confocal em células SN56 diferenciadas, co-transfectadas com CHT1-FLAG e SEC14 <i>like</i> -myc	57
Figura 15:	Análise do taxa de transporte de colina de alta afinidade em células HEK 293	60
Figura 16:	Esquema do sistema de duplo híbrido em leveduras criado por Fields e Song em 1989	64
Figura 17:	Análise da estrutura primária de SEC14 <i>like</i>	76
Tabela 1:	Resultado do <i>screening</i> em duplo híbrido em leveduras utilizando como “iscas” VMAT2 ou VACHT, e como “presa” uma biblioteca de cDNA de cérebro humano.	21

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
AD	Doença de Alzheimer
ADE	Adenina
AP	Proteína adaptadora
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
Ca²⁺	Íon cálcio
Cl⁻	Íon cloreto
Ch	Colina
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CCVs	Vesículas recobertas por clatrina
CCT	CTP-fosfocolina-citidil-transferase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA-AD	DNA <i>activation domain</i>
DNA-BD	DNA <i>binding domain</i>
Dpm	Desintegrações por minuto
GEF	Proteínas trocadoras de nucleotídeos de guanina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLUT4	Transportador de glicose
HC-3	Hemicolinio 3
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
kb	Quilobases
kD	Quilodaltons
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_i	Constante de inibição
MCS	Sítio múltiplo de clonagem

μM	Micromolar
mRNA	RNA mensageiro
nM	Nanomolar
Par-4	<i>Prostate apoptosis response-4</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polietilenoglicol
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PP1	Proteína fosfatase 1
PP2A	Proteína fosfatase 2A
SNAP-25	<i>Synaptosome-associated protein of 25000 dalton</i>
t-SNAREs	<i>Target membrane - SNAREs</i>
v-SNAREs	<i>Vesicle associated - SNAREs</i>
SNC	Sistema nervoso central
SV40	Simian virus 40
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TGN	<i>Trans Golgi network</i>
UAS	<i>Upstream activating sequences</i>
VAChT	Transportador vesicular de acetilcolina
VAMP-2	Proteína de membrana associada a vesículas ou sinaptobrevina
VGAT	Transportador vesicular de GABA
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas
YTH	Duplo híbrido em leveduras

Símbolos dos aminoácidos

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

Resumo

O transportador de colina de alta afinidade (CHT1) é responsável por recaptar a colina presente na fenda sináptica, proveniente da degradação da acetilcolina (ACh), em neurônios colinérgicos. Sua atividade é de grande importância uma vez que neurônios colinérgicos têm uma baixa capacidade para síntese *de novo* de colina. Embora seja um transportador de membrana plasmática, o CHT1 encontra-se em reciclagem contínua entre vesículas intracelulares e a membrana plasmática em modelos celulares neuronais. O tráfego celular parece ter um importante papel na regulação da atividade desse transportador. Em nosso trabalho procuramos identificar proteínas que poderiam interagir com o CHT1 através do sistema de duplo híbrido em leveduras. Verificamos a interação do transportador com BRI3, Flotilina, SEC14*like* e MAP1A. Essas proteínas têm em comum a participação em eventos de tráfego celular. No intuito de caracterizar de maneira mais profunda essas interações, escolhemos a proteína SEC14*like* para dar continuidade aos nossos experimentos. SEC14*like* é homóloga à proteína SEC14 de levedura, cuja função é essencial para o transporte de proteínas através do complexo de Golgi de leveduras, além de ter papel importante na síntese e metabolismo de fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. Em humanos, SEC14*like* é uma proteína ainda pouco descrita. Utilizamos co-imunoprecipitação, microscopia confocal e experimentos de transporte de colina para delinear com mais clareza a relevância da interação CHT1-SEC14*like*. Através de ensaios de co-imunoprecipitação, verificamos que essa interação ocorre em células de mamíferos. Observamos também, utilizando microscopia confocal que o padrão de distribuição do transportador foi modificado em células que superexpressam SEC14*like*. A análise da captação de colina, sugere que a superexpressão de SEC14*like*, altera a atividade do transportador, diminuindo em torno de 30% a taxa de transporte de colina. Esses dados sugerem uma nova possibilidade de regulação da atividade colinérgica, envolvendo uma proteína de importância no tráfego celular e o CHT1.

Abstract

The high affinity choline transporter (CHT1) is responsible for choline uptake, which is derived from acetylcholine degradation, in the synaptic cleft of cholinergic neurons. CHT1 activity is very important since cholinergic neurons have very low ability to synthesize acetylcholine *de novo*. Although CHT1 is mainly a plasma membrane transporter, it is found predominantly recycling between intracellular vesicles and the cell surface. Cellular trafficking seems to play an important role in the transporter activity. In the present experiments, we identified proteins that might interact with CHT1, using yeast two hybrid system. We found that CHT1 interacts with BRI3, Flotillin, SEC14like and MAP1A. These proteins participate in cellular trafficking. To further characterize these interactions we chose SEC14like, a protein that is homologous to yeast SEC14, which is essential in promoting protein transport through the yeast Golgi complex. SEC14like also plays a crucial role in phosphatidylinositol and phosphatidylcholine synthesis and metabolism. SEC14like function in humans is poorly understood. We used co-immunoprecipitation, confocal microscopy and choline uptake to further identify the importance of CHT1-SEC14like interaction. Co-immunoprecipitation assays showed that the two proteins form complexes in mammal cells. Using confocal microscopy, we found that the pattern of distribution of CHT1 was altered in cells that overexpressed SEC14like. Choline uptake analysis suggested that SEC14like overexpression modified transporter activity, decreasing 30% the rate of choline transport. All these data suggest a new possibility of regulation of cholinergic activity by control of the cellular trafficking of CHT1.

1 – Introdução

1.1 – A acetilcolina e o sistema colinérgico

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser descrito, sendo denominado inicialmente como “Vagusstoff” por Otto Loewi, em 1921. Em um experimento clássico e amplamente citado, ele estimulou o nervo vago do coração perfundido de uma rã e permitiu que o líquido de perfusão entrasse em contato com o coração de outra rã. Como resultado a atividade do coração da rã receptora foi diminuída através da ação da “substância do vago”, parassimpática. Em 1926, Loewi e Navratil apresentaram evidências para caracterizá-la como ACh. Essa foi a primeira caracterização química de uma substância que produzia efeitos fisiológicos, um marco histórico para a farmacologia.

A ACh possui um importante papel na neurotransmissão do sistema nervoso central e periférico, é essencial na sinalização de neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, tanto nos ramos simpáticos como parassimpáticos (Birks *et al.*, 1961). É o neurotransmissor de sinapses pós-ganglionares parassimpáticas controlando órgãos como coração, pulmões, glândulas exócrinas e endócrinas, intestino e bexiga (Hoffman & Taylor, 2001). Nas fibras simpáticas pós-ganglionares que suprem as glândulas sudoríparas, a ACh age sob receptores muscarínicos. Ela é o neurotransmissor da junção neuromuscular sendo sintetizada por todos os neurônios motores na medula espinhal e no tronco encefálico, exercendo o controle da contração muscular (Misgeld *et al.*, 2002).

A neurotransmissão colinérgica tem um importante papel modulatório, especialmente sobre funções cognitivas. Manipulações farmacológicas que interferem com a atividade colinérgica podem alterar o resultado de tarefas como aprendizagem, atenção e memória (Gold, 2003).

Os neurônios colinérgicos do sistema nervoso central apresentam uma distribuição bastante difusa. Interneurônios colinérgicos estão presentes no corpo estriado. Além desses neurônios, existem dois sistemas colinérgicos modulatórios importantes, de projeção difusa no encéfalo, o complexo prosencefálico basal e o pontemesencefalotegmental (Bear *et al.*, 2002). O

primeiro complexo é assim denominado em função da dispersão que os neurônios colinérgicos assumem entre diversos núcleos relacionados entre si e localizados no centro do telencéfalo, medial e ventralmente aos núcleos da base. Destacam-se os núcleos do septo medial, responsáveis pela inervação colinérgica do hipocampo e o núcleo basal de Meynert, que provê a inervação colinérgica do neocórtex. O complexo pontemesencefalotegmental inclui as células da ponte e do tegmento mesencefálico que utilizam ACh, responsáveis pela regulação da excitabilidade de núcleos retransmissores sensoriais, principalmente no tálamo dorsal, juntamente com os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (Bear *et al.*, 2002).

Existem disfunções do sistema colinérgico classicamente associadas a desordens que afetam funções cognitivas, das quais se destacam: doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson e demência dos corpos de Lewy (Perry *et al.*, 1995). Acredita-se que a degeneração de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal que se projetam para o córtex pré-frontal esteja associada à demência na doença de Alzheimer (Whitehouse *et al.*, 1982). Os fármacos mais eficazes no tratamento da AD são inibidores da acetilcolinesterase (AChE), tais como donepezil, rivastigmina ou galantamina (Kaduszkiewicz *et al.*, 2005). A esclerose amiotrófica lateral e a doença de Huntington são outras desordens neurodegenerativas nas quais neurônios colinérgicos são afetados (Oda, 1999).

Os mecanismos celulares que contribuem para alterações na neurotransmissão colinérgica ainda não são bem definidos. A elucidação desses mecanismos é importante para o desenvolvimento de hipóteses, acerca da atividade neuronal que se encontra alterada em doenças neurodegenerativas associadas ao sistema colinérgico. A determinação da sinalização ou tráfego de proteínas e transportadores envolvidos nesse sistema pode revelar possíveis vias regulatórias que venham a se constituir em alvos farmacológicos e terapêuticos no futuro.

1.2 – A dinâmica da transmissão colinérgica

1.2.1 – A liberação de neurotransmissores

O compartimento pré-sináptico pode ser caracterizado como uma entidade altamente dinâmica contendo os componentes necessários para acoplamento das vesículas, exocitose, endocitose, reciclagem de membrana e recuperação do neurotransmissor (Fernandez-Chacon & Südhof, 1999; Lin & Scheller, 1997)

As vesículas sinápticas normalmente se agrupam em áreas subjacentes à membrana sináptica, denominadas zonas ativas. Essas regiões possuem um *pool* de vesículas prontamente liberáveis. As vesículas sinápticas possuem proteínas que desempenham papéis diferentes, tais como transporte de neurotransmissores, controle do tráfego intracelular ou ainda da fusão de membranas (Hoffman & Taylor, 2001; Südhof, 2004).

Um estímulo que leva à despolarização da membrana pré-sináptica por um potencial de ação permite que ocorra a abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem. O aumento da concentração de Ca^{2+} livre é de grande importância no processo de exocitose, uma vez que a liberação de neurotransmissores e hormônios acontece em fração de segundos ou milissegundos após o aumento deste íon (Rettig & Neher, 2002).

Existe um grupo de proteínas associadas à membrana que em conjunto são chamadas de SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor*), que formam a maquinaria mínima necessária para a fusão de vesículas com a membrana pré-sináptica (Weber *et al.*, 1998). Essas proteínas são divididas entre as que estão associadas a vesículas, v-SNAREs (que inclui sinaptobrevina, também chamada VAMP-2, ou proteína de membrana associada a vesículas), e as localizadas na membrana plasmática, t-SNAREs (representadas por syntaxina e SNAP-25). A hipótese proposta é que v-SNAREs associam-se com t-SNAREs para formar um complexo molecular responsável pela fusão de membranas (Sollner *et al.*, 1993). Sinaptotagmina I é considerada

um sensor de cálcio, uma proteína integral de vesículas sinápticas, que possui dois sítios de ligação ao cálcio e tem um papel essencial na exocitose dessas vesículas (Littleton *et al.*, 2001; Fernandez-Chacon *et al.*, 2001; Mackler *et al.*, 2002). Em 2004, Tucker e colaboradores demonstraram que, na presença de Ca^{2+} , sinaptotagmina I interage eficientemente com t-SNAREs que estão inseridas na bicamada lipídica da membrana sináptica, permitindo que ocorra a fusão de vesículas sinápticas com a membrana. A perda dessa interação está associada com a diminuição da exocitose de vesículas dependente de Ca^{2+} .

1.2.2 – A liberação de ACh

A neurotransmissão colinérgica depende da atividade de proteínas envolvidas na síntese, transporte e degradação da ACh, como demonstrado na Figura 1.

Com a passagem de um estímulo elétrico, despolarização neuronal e influxo de íons cálcio, ocorre a fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica, liberando ACh na fenda sináptica. Uma vez na fenda a ACh pode, brevemente, ativar receptores nicotínicos ou muscarínicos, antes de ser hidrolisada pela enzima AChE, que libera colina e acetato. A colina é eficientemente recaptada para o neurônio pré-sináptico através do transportador de colina de alta afinidade (CHT1, em neurônios colinérgicos) fornecendo substrato para síntese de novas moléculas de acetilcolina. De fato, estudos farmacológicos revelam que a liberação de ACh não é sustentada sem que ocorra a recaptação mediada pelo transportador (Birks *et al.*, 1961; Van der Kloot *et al.*, 2002).

Neurônios colinérgicos possuem baixa capacidade de sintetizar colina *de novo* e, portanto, grande parte da colina necessária para a síntese de ACh provém de um sistema de recaptação de colina de alta afinidade, que permite que a colina presente na fenda sináptica seja reutilizada na síntese de ACh no interior do neurônio pré-sináptico (Tucek *et al.*, 1984; Birks, 1961; Jope & Jenden, 1979).

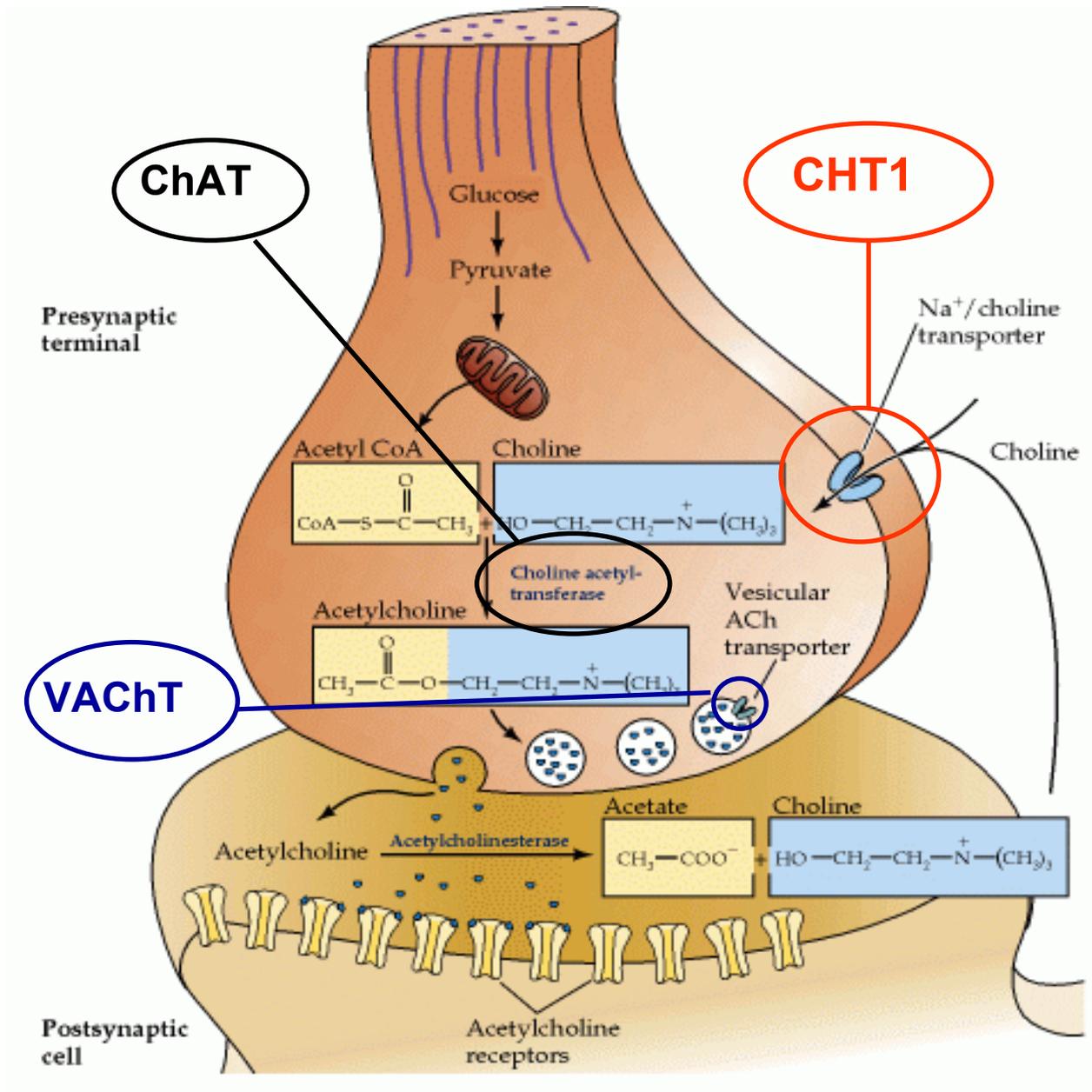


Figura 1: Desenho esquemático representando a neurotransmissão colinérgica (modificado de Purves *et al.*, 2001).

A taxa de síntese de acetilcolina satura-se em paralelo com o transporte de colina em concentrações de colina acima de 5 μ M (Haga, 1971). Vários estudos demonstram que a taxa de síntese de ACh está bem correlacionada com a atividade do CHT1, além disso o transporte de colina realizado pelo CHT1 é rapidamente estimulado pelo aumento da atividade neuronal (Murrin & Kuhar, 1976; Collier & Ilson, 1977; Polak *et al.*, 1977; Sherman *et al.*, 1978). Esses dados indicam que a demanda por colina é alta quando a síntese e liberação de ACh são elevadas.

A ACh é sintetizada por ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), que cataliza a reação entre acetil-CoA e colina. A ChAT é sintetizada no soma e transportada até o terminal axonal. Através de estudos de cinética enzimática, demonstrou-se que ela não se encontra saturada pelos níveis pré-sinápticos de colina (Haga, 1971), indicando que a enzima encontra-se em excesso cinético em relação a seus substratos. No neurônio pré-sináptico os níveis de acetil-CoA, um dos substratos da ChAT, são mantidos através do metabolismo da glicose. A produção de acetil-CoA citoplasmática ocorre a partir do precursor mitocondrial citrato, sob ação da enzima ATP-citrato liase, sendo essa enzima mais expressa em neurônios colinérgicos do que em qualquer outra célula do sistema nervoso central (Tomaszewicz *et al.*, 2003; Beigneux *et al.*, 2004). Inicialmente, acreditava-se que a atividade da ChAT regularia a síntese de ACh, porém, vários estudos indicam que o suprimento de colina é o passo limitante para a síntese de ACh (Blusztajn & Wurtman, 1983; Collier & Katz, 1974; Simon & Kuhar, 1975; Kuhar & Murrin, 1978; Oregan & Collier, 1981; Saltarelli *et al.*, 1987).

Acredita-se que a ChAT se apresente em duas formas nos terminais nervosos colinérgicos, uma forma solúvel (cerca de 80-90%) presente na região citoplasmática e uma forma não iônica ligada à membrana, provavelmente de vesículas sinápticas (10-20%) (Pahud *et al.*, 1998; Carrol, 1994). Vários estudos indicam que o transporte de colina de alta afinidade é essencial para a síntese de ACh, e sugerem que a ChAT poderia estar acoplada a esse transportador (Kuhar & Murrin, 1978; Tucek *et al.*, 1984). Barker e colaboradores (1975) demonstraram que a ChAT acetila colina mais eficientemente quando associada à membrana do que quando se encontra em sua forma solúvel. Entretanto,

outros estudos sugerem que, apesar do transporte de colina de alta afinidade ser o passo limitante para a síntese de ACh, o acoplamento do CHT1 com a ChAT não existe (Jope *et al.*, 1978). Rylett e colaboradores (1993) demonstraram que a ChAT e o sistema de transporte de colina apresentam mecanismos regulatórios diferentes.

A colina, além de ser substrato da ChAT para síntese de ACh, tem papel importante na constituição de fosfolípidos de membrana como a fosfatidilcolina (Ziesel *et al.*, 1981). A principal fonte de colina para síntese de ACh é a dieta (Fernstrom, 1981; Zeisel, 1981). A colina também pode ser obtida através da ação da fosfolipase D sobre a fosfatidilcolina presente na membrana, sendo transportada pelo plasma sanguíneo, ou ainda pela síntese na glia (Tucek, 1984).

A ACh recém formada é então transportada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). O VACHT é uma proteína que apresenta 12 domínios transmembrânicos. Esse transportador, que se encontra presente na membrana de vesículas sinápticas, troca uma molécula de ACh por dois prótons vesiculares, concentrando o neurotransmissor nas vesículas sinápticas (Rebois *et al.*, 1980; Parsons, 2000; Prado & Prado, 2002).

1.2.3 – O CHT1 e o sistema colinérgico

Existem dois tipos de transporte de colina, bem caracterizados e distintos entre si. Em altas concentrações a colina é transportada por um sistema de baixa afinidade, que não depende de sódio e é inibido seletivamente por altas concentrações de hemicolinio-3 (HC-3), com K_m de 100 μM e K_i de aproximadamente 50 μM . Este sistema se encontra distribuído em vários tipos celulares e parece estar envolvido na síntese de fosfatidilcolina. O outro é um sistema de transporte de alta afinidade por colina, $K_m=1-5 \mu\text{M}$, depende de sódio e cloreto, sendo inibido por baixas concentrações de HC-3, K_i 10-100 nM (Okuda *et al.*, 2000). O sistema de alta afinidade está presente principalmente

em neurônios colinérgicos e é responsável por suprir colina para a síntese de ACh (Haga, 1971; Kuhar & Murrin, 1978).

HC-3 é um composto bicíclico, análogo da colina, inicialmente caracterizado como um agente letal, paralítico respiratório (Schueler, 1955; Macintosh *et al.*, 1956). A intoxicação por HC-3, ao contrário da intoxicação por toxinas tetânica e botulínica, é reversível e pode ser aliviada através de respiração artificial até o completo metabolismo da droga. A administração de colina também reverte o quadro de intoxicação por HC-3, sugerindo que ambas competem pelo mesmo sítio ativo (Ferguson & Blakely, 2004).

A importância do íon sódio para o transporte de colina de alta afinidade foi demonstrada em experimentos onde sinaptosomas foram incubados em um meio onde o sódio foi substituído por lítio. A consequência foi uma diminuição no transporte de colina de alta afinidade em 95% (Yamamura & Snyder, 1973). Já o transporte de colina de baixa afinidade foi reduzido em 60% com a substituição de sódio por lítio. Acredita-se que a colina seja co-transportada com o sódio, utilizando para isso a força do gradiente eletroquímico fornecido pela bomba Na^+/K^+ ATPase (Nelson, 1998). O íon Cl^- também tem participação importante na atividade do transportador (Yamamura & Snyder, 1973; Kuhar & Zarbin, 1978). A ligação dos íons sódio e cloreto ao transportador levariam a mudanças conformacionais que permitiriam a ligação do substrato (colina), liberado juntamente com o cloreto e posterior liberação do íon sódio (Nelson, 1998). Estudos recentes (Brandon (2004), Ferguson (2003)) sugerem que existem mecanismos pós-traducionais que controlam a taxa de captação de colina pré-sináptica.

A afirmação de que o transporte de colina de alta afinidade existe especificamente em neurônios colinérgicos foi amparada por experimentos que demonstraram uma diminuição no transporte de colina de alta afinidade no hipocampo, após desnervação da via septo-hipocampal, um conhecido trato colinérgico (Kuhar *et al.*, 1973)

O gene para o CHT1 foi recentemente clonado (Okuda *et al.*, 2000). O CHT1 de humanos codifica uma proteína de 580 aminoácidos, que apresenta alta homologia com os genes de rato (98%) e camundongo (93%). A estrutura secundária proposta para o CHT1 foi de uma proteína transmembrânica

(contendo treze domínios transmembrânicos), com a porção amino-terminal extracelular e a região carboxi-terminal intracelular (Apparsundaram *et al.*, 2000) como mostrado na Figura 2. Dados experimentais indicam que a região amino-terminal do transportador é realmente extracelular, uma vez que essa pôde ser detectada em células intactas através da utilização de anticorpos contra um epítipo FLAG adicionado à região amino-terminal do CHT1 (Ribeiro *et al.*, 2005).

Através de análises de *Northern-blot*, utilizando extratos de várias regiões do cérebro humano, foi identificado um transcrito de aproximadamente 5kb no putamen, coluna espinhal e medula (Apparsundaram *et al.*, 2000). Esse achado está de acordo com a distribuição de neurônios colinérgicos incluindo interneurônios do gânglio basal e neurônios motores do tronco encefálico e coluna espinhal.

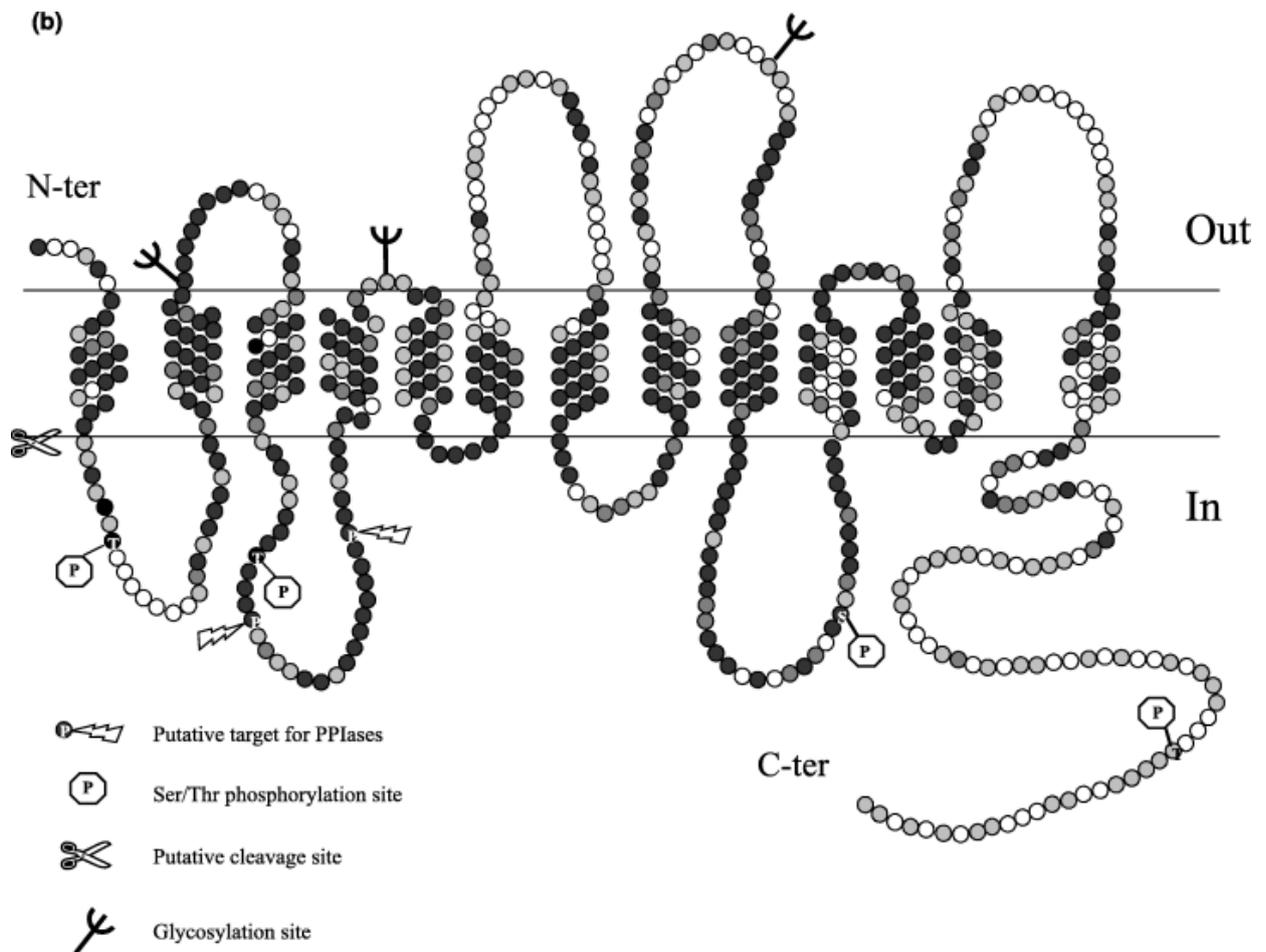


Figura 2: Estrutura secundária proposta para o CHT1 (Apparsundaram *et al.*, 2000).

1.2.4 – A localização celular do CHT1

Apesar do CHT1 atuar na membrana plasmática, estudos de imunofluorescência e microscopia confocal indicaram que ele se encontra predominantemente em endossomos e vesículas sinápticas em modelos celulares neuronais, e que existe uma reciclagem contínua entre a membrana e essas organelas via endocitose mediada por clatrina (Ribeiro *et al.*, 2003). No sistema nervoso central, o CHT1 está distribuído predominantemente em vesículas pré-sinápticas que também apresentam o transportador VACHT. Esses dados dão suporte à observação de que o CHT1 se distribui nas mesmas frações que apresentam outros marcadores de vesículas sinápticas (sinaptofisina, VGAT, VMAT2) (Ferguson *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003).

A distribuição do transportador nos neurônios pré-sinápticos é de certa forma inesperada, uma vez que, baseado na sua função, acreditava-se que o CHT1 estivesse presente principalmente na membrana plasmática, que é o local para transporte de colina nos terminais nervosos. O transportador de GABA também é encontrado em vesículas sinápticas, embora essas vesículas não contenham o neurotransmissor, uma vez que o transportador vesicular de GABA não está presente na membrana dessas vesículas (Deken *et al.*, 2000). Já em relação ao CHT1, foi mostrado que a maioria das vesículas que contêm o transportador de colina também contêm VACHT, e portanto ACh (Ferguson *et al.*, 2003). Isso é indicativo de que, ao contrário do que ocorre para o transportador de GABA, a regulação do tráfego das moléculas de CHT1 presentes em vesículas sinápticas está acoplada à exocitose do neurotransmissor.

A presença do CHT1 na membrana plasmática está acoplada à atividade neuronal. O aumento da liberação de ACh em consequência da exocitose de vesículas sinápticas é capaz de aumentar a expressão do transportador na membrana plasmática, uma vez que ele se encontra presente nessas vesículas. De maneira contrária, a diminuição da exocitose contribui para uma diminuição no transporte de colina em função do menor aporte de CHT1 à membrana (Ferguson *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). A modulação da atividade de

transportadores, pelo aumento ou diminuição de sua concentração na membrana plasmática parece ser um tema recorrente como indicam os estudos do transportador de glicose (GLUT4) regulado por insulina (Sweeney *et al.*, 1999) e do transportador de GABA pré-sináptico (Deken *et al.*, 2000).

1.2.5 – A regulação da transmissão colinérgica

Em um estudo realizado em camundongos heterozigotos para uma mutação no gene *CHAT*, observou-se que os níveis da atividade da enzima estavam diminuídos em 40-50% em comparação com camundongos selvagens, porém, os níveis de ACh cerebrais assim como a liberação de ACh evocada por despolarização em fatias de hipocampo eram normais (Brandon *et al.*, 2004). Os camundongos apresentaram uma capacidade de adaptação a essa nova condição através da regulação da atividade do CHT1. Houve um aumento no aporte de colina, ou seja, o transporte de colina de alta afinidade e os níveis protéicos de CHT1 estavam aumentados em 50-100%, em comparação com os animais selvagens, o que permitiu uma compensação para síntese de ACh. Este dado corrobora estudos anteriores (Murrin & Kuhar, 1976; Collier & Ilson, 1977; Polak *et al.*, 1977; Sherman *et al.*, 1978; Marchbanks, 1982), indicando que uma resposta adaptativa do sistema numa demanda maior por ACh, estimula a atividade do CHT1, ressaltando a relevância da regulação da atividade do transportador para o sistema colinérgico.

A administração de anestésicos como pentobarbital, um inibidor da propagação de impulsos nervosos no trato septo-hipocampal (diminuindo a transmissão colinérgica no SNC), causa uma diminuição tanto no transporte de colina de alta afinidade como na síntese de ACh (Simon & Kuhar, 1975). Ocorre uma alteração na velocidade máxima da reação, sem que haja alteração no K_m , indicando que a diminuição do transporte não reflete diminuição da afinidade pelo CHT1 por colina (Wheeler, 1979; Kuhar & Murrin, 1978).

Em 2004, Ferguson e colaboradores demonstraram *in vivo* a contribuição do CHT1 para a neurotransmissão colinérgica, utilizando camundongos nocaute

para o CHT1. Os camundongos CHT -/- sobreviviam apenas por uma hora após o nascimento. Acredita-se que a morte ocorreu em decorrência de um déficit na transmissão colinérgica na junção neuromuscular do diafragma e músculos intercostais, que controlam a respiração. Os camundongos heterozigotos para a mutação mantinham os níveis de captação de colina semelhantes aos camundongos selvagens, uma compensação para a redução significativa dos níveis protéicos de CHT1. A existência de um *pool* intracelular de CHT1, presente em vesículas sinápticas, foi confirmada através de estudos de ligação de [³H]HC-3 em heterozigotos, dando apoio à idéia de que a atividade e tráfego do CHT1 podem ser regulados por uma demanda maior de ACh em neurônios colinérgicos.

Pode-se inferir que mutações ou polimorfismos no gene que codifica o CHT1 humano, localizado no cromossomo 2 (Apparsundaram *et al.*, 2000), podem trazer prejuízos a neurotransmissão colinérgica. Essas alterações poderiam modificar a atividade, acoplamento iônico ou tráfego do CHT1.

Okuda e colaboradores (2002) fizeram um *screening* em uma população judaica Ashkenazi, em busca de polimorfismos na região codificadora do gene *CHT1* humano. Foi observada uma mutação pontual no códon para o aminoácido 89, a qual ocasiona a troca de uma isoleucina por uma valina (I89V), localizada no terceiro domínio transmembrânico da proteína. A frequência alélica observada de I89V foi de 6% na população estudada. A avaliação funcional do transportador mutado, utilizando células de mamíferos, revelou uma diminuição de 40-50% no $V_{máx}$ para a taxa de captação de colina comparada com o transportador normal. No entanto, não foi observada nenhuma alteração na afinidade do transportador para colina, sódio, cloreto e o seu inibidor específico HC-3, ou seja, não houve uma mudança na capacidade de ligação do transportador. A diminuição no transporte de colina não estava associada a uma diminuição da expressão do transportador na membrana, confirmada por estudos de biotilação de membrana plasmática. Esse polimorfismo pode representar um fator predisponente para disfunções do sistema colinérgico.

Considerando a estrutura primária do CHT1, foi observado que um motivo dileucina bem conservado (₅₂₇DKTILV₅₃₂) presente na região C-terminal do CHT1 de rato, humano e de camundongo, é essencial para internalização

constitutiva do transportador (Ribeiro *et al.*, 2005). Motivos dileucina e tirosina são motivos de interações protéicas bem caracterizados. Eles estão envolvidos no direcionamento de proteínas de membrana plasmática para vesículas recobertas por clatrina. Essas proteínas são internalizadas através de associação com subunidades de complexos protéicos adaptadores (Kirchhausen, 1999). As mutações L531A e V532A alteram significativamente a distribuição do transportador assim como o transporte de colina. Ocorre um bloqueio da internalização do CHT1 e um aumento da expressão do transportador na membrana plasmática em cerca de duas vezes e conseqüentemente um aumento no transporte de colina (Ribeiro *et al.*, 2005).

Através de análise da seqüência primária dos aminoácidos, verificou-se que o CHT1 apresenta sítios potenciais para fosforilação por proteína quinase C (PKC) e A (PKA), o que poderia ser de grande importância para a regulação de sua função (Apparsundaram *et al.*, 2000). O CHT1 é uma fosfoproteína e ativadores de PKC e inibidores de PP1/PP2A têm a capacidade de diminuir a recaptação de colina, assim como diminuir a expressão do transportador na membrana plasmática (Gates *et al.*, 2004). Mecanismos ligados à fosforilação parecem ter papel importante no controle da endocitose de muitos transportadores de membrana plasmática (Gates *et al.*, 2004). A fosforilação pode levar a alterações de expressão na membrana plasmática dos transportadores de dopamina (Huff *et al.*, 1997; Vaughan *et al.*, 1997), serotonina (Qian *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 1998), glutamato (Casado *et al.*, 1991) norepinefrina (Apparsundaram *et al.*, 1998) e GABA (Corey *et al.*, 1994; Beckman *et al.*, 1999). Em alguns casos, não é só a fosforilação do próprio transportador que controla seu tráfego e atividade, mas a fosforilação de proteínas que interagem com ele, alterando sua distribuição e localização celular. Por exemplo, a expressão do transportador de GABA na superfície celular pode ser alterada por PKC, em um mecanismo envolvendo syntaxina, que é uma proteína do complexo SNARE que interage diretamente com o transportador de GABA (Beckman *et al.*, 1998; Beckman & Quick, 1998). Também já foi mostrado que a interação entre o transportador de dopamina e PICK1 leva a um aumento dos níveis do transportador na membrana plasmática (Torres *et al.*, 2001).

A glicosilação de muitos transportadores de membrana plasmática no retículo endoplasmático-Golgi mostrou-se essencial para permitir a expressão desses na membrana plasmática (Asano *et al.*, 1993; Tate & Blakely, 1994; Olivares *et al.*, 1995; Melikian *et al.*, 1996). O CHT1 é uma proteína que pode ser glicosilada (Ferguson *et al.*, 2003). É possível então que o padrão de glicosilação do transportador de colina seja um dos mecanismos a definir o direcionamento do CHT1 para diferentes vesículas intracelulares ou para a membrana plasmática, sendo essa uma maneira de controlar o transporte de colina.

No tocante à regulação direta da atividade do CHT1, Xie e Guo (2004) demonstraram que Par-4 (*prostate apoptosis response-4*), uma proteína que tem um importante papel na disfunção neuronal e morte celular em doenças neurodegenerativas, interage com o CHT1 e regula a atividade do transportador. Os níveis de expressão da proteína Par-4 estão significativamente aumentados no córtex, hipocampo e em neurônios colinérgicos em modelos *in vivo* e *in vitro* da doença de Alzheimer (Guo *et al.*, 1998). Além disso, Par-4 contribui para apoptose e produção excessiva do peptídeo β -amilóide 1-42 em células neuronais que apresentam mutações na proteína presenilina-1 (Guo *et al.*, 2000), cuja atividade é crítica para a produção do peptídeo β -amilóide (Parihar & Hemnani, 2004). A superexpressão de Par-4 inibiu o transporte de colina mediado pelo CHT1 em mais de 50% sem no entanto alterar a afinidade do transportador por colina ou HC-3. A interação física CHT1-Par-4 reduziu a expressão do transportador na membrana plasmática. Esse trabalho demonstra a relevância do estudo de proteínas que apresentam interação com o transportador e que, em um futuro próximo, podem esclarecer melhor os mecanismos de regulação do tráfego do transportador e do transporte de colina.

Dentro deste contexto é de grande relevância elucidar os mecanismos pelos quais o CHT1 é mobilizado para a superfície celular. A compreensão dos mecanismos envolvidos no tráfego intracelular do CHT1 e como o tráfego afeta a sua atividade são essenciais para o desenvolvimento de estratégias que aumentariam a atividade do transportador, especialmente no desenvolvimento de mecanismos farmacológicos que melhorariam os sintomas de doenças nas quais existe uma hipofunção do sistema colinérgico, como na doença de Alzheimer.

1.2.6 – CHT1 e a doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva e irreversível, que ocorre gradualmente cujos resultados são: perda de memória, alterações comportamentais, mudanças na personalidade e um declínio nas atividades intelectuais (Parihar & Hemnani, 2004). Essa doença é acompanhada principalmente por três alterações estruturais no cérebro: perda difusa de neurônios; presença de depósitos protéicos intracelulares chamados de aglomerados neurofibrilares (NFT); além dos depósitos protéicos extracelulares denominados placas amilóides ($A\beta$) ou placas senis, rodeadas por neurônios cuja morfologia está alterada (Leslie, 2002; Torreilles & Touchan, 2002).

Os peptídeos β -amilóides podem inibir a liberação de ACh e o transporte de colina de alta afinidade em certas regiões cerebrais, principalmente no córtex e hipocampo, que são regiões intimamente associadas à patologia da doença (Kar *et al.*, 1998). Inúmeros mecanismos têm sido propostos para explicar a maneira pela qual a presença desses peptídeos poderia levar à morte neuronal, tais como aumento de cálcio intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, diminuição da fluidez da membrana, alterações do núcleo e citoesqueleto, além de processos inflamatórios e auto-ímmunes (Drouet *et al.*, 2000; Vajda, 2002).

Várias evidências sugerem que um dos principais sistemas afetados na doença de Alzheimer é o colinérgico: ocorre maior prejuízo na memória recente em pacientes com Alzheimer quando se administra bloqueador muscarínico como escopolamina; severa redução no número de neurônios do prosencéfalo basal desses pacientes; dramática diminuição na atividade do CHT1, ChAT e disponibilidade de ACh no hipocampo e córtex em pacientes com Alzheimer; menor número de receptores muscarínicos e nicotínicos no SNC desses pacientes. Além disso, observa-se a eficiência parcial do uso de inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento de alguns dos sintomas cognitivos nos estágios iniciais da doença (Cooper, 1994; Oda, 1999).

Uma vez que a disponibilidade de ACh é regulada essencialmente pelo aporte de colina, a caracterização do transporte de colina de alta afinidade

realizado pelo CHT1, assim como as possíveis vias de regulação do transportador é de fundamental importância para que se possa elucidar como as alterações no sistema colinérgico afetam o desenvolvimento da doença de Alzheimer, o que poderia contribuir para um possível controle dessa enfermidade.

1.3 - Tráfego celular

Os componentes protéicos de membranas de vesículas sinápticas são sintetizados no corpo celular dos neurônios. Inicialmente seguem um caminho comum a todos os componentes do caminho secretório, são inseridos na membrana do retículo endoplasmático (ER) e transportados através do complexo de Golgi até a rede trans-Golgi (TGN) (Bennet & Scheller, 1994). Enquanto a maioria das proteínas vesiculares está concentrada em regiões sinápticas, uma quantidade significativa é detectada na região do complexo de Golgi (Baumert *et al.*, 1990), refletindo a abundância dessas proteínas que estão em trânsito através das vias biossintéticas e de degradação. A partir do TGN, os componentes das vesículas sinápticas são seletivamente direcionados para o terminal nervoso e esse processo ocorre via transporte axonal.

As proteínas de vesículas sinápticas são direcionadas para a membrana plasmática durante os vários ciclos de exocitose (Südhof & Jahn, 1991; Südhof, 2004). Posteriormente, as proteínas de vesículas sinápticas incorporadas na membrana plasmática, sofrem endocitose e voltam a constituir a membrana de vesículas sinápticas, num processo de reciclagem. O direcionamento de proteínas que fazem parte da composição dessas vesículas envolve a formação de complexos proteína-proteína específicos (Bennet & Scheller, 1994).

A internalização de proteínas a partir da membrana plasmática acontece em vesículas, que em sua maioria são revestidas. A função das proteínas de revestimento é selecionar as proteínas a serem endocitadas e interagir com proteínas do complexo endocítico, facilitando a estabilização das vesículas (Boehm & Bonifacino, 2001). As principais classes de vesículas são aquelas

revestidas por clatrina (CCVs). Esse tipo de vesícula participa não só da endocitose a partir da membrana, como também do transporte entre Golgi e endossomos, entre outros.

Existem várias proteínas que participam das CCVs, entre elas as proteínas adaptadoras (AP1, AP2, AP3), cada uma regulando o tráfego entre diferentes organelas. O AP2, por exemplo, está presente em vesículas que são endocitadas a partir da membrana plasmática, enquanto o AP1 participa de vesículas que trafegam entre Golgi e endossomos (Robinson, 1987). O AP2 apresenta uma função fundamental na endocitose via clatrina, uma vez que é capaz de se ligar à clatrina, à fosfolípidos de membrana e a outros componentes do complexo endocítico. Além disso, AP2 também tem a função de selecionar proteínas de membrana, tais como receptores e transportadores, para endocitose (Owen, 2004).

Alguns estudos indicam que transportadores de neurotransmissores são freqüentemente regulados por mudanças de expressão na superfície celular. A vantagem desse tipo de regulação é que isso pode ocorrer em um espaço de tempo curto e prevenir um potencial consumo de tempo durante o processo de transcrição e tradução (Robinson, 2002).

Em vários sistemas biológicos, a habilidade em alterar a expressão de transportadores e receptores na membrana plasmática é uma estratégia altamente conservada e dinâmica (Hicke, 1999). Como exemplo pode-se citar a regulação do tráfego celular dos receptores acoplados à proteína G. Freqüentemente, a ligação do agonista leva a um aumento da endocitose do receptor, diminuindo respostas celulares subseqüentes ao agonista (Laporte *et al.*, 2000).

No tocante ao CHT1, uma vez que esse é mobilizado constitutivamente entre a membrana plasmática e compartimentos intracelulares, em ciclos contínuos de endocitose e exocitose (Ribeiro *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2003), o delineamento desse tráfego é essencial para entendermos a regulação e controle do transporte de colina de alta afinidade e conseqüentemente a transmissão colinérgica nas sinapses.

1.4 – Duplo híbrido em leveduras

Com o intuito de identificar as proteínas que poderiam interagir com o VACHT, o nosso grupo de pesquisa iniciou na Duke University (Durham, North Carolina, USA) um *screening* utilizando uma biblioteca de cDNA de cérebro humano como “presa”, e como “isca” utilizou a região C-terminal do transportador VACHT, assim como a região C-terminal do transportador vesicular de monoaminas VMAT2. Essas proteínas são homólogas e possuem funções similares. É importante ressaltar que foram feitos experimentos de imunoblots para garantir que a expressão das proteínas de interesse, cujas seqüências foram inseridas nos devidos plasmídeos, foi detectada em leveduras.

As colônias positivas foram isoladas e as “presas” foram identificadas através de seqüenciamento do inserto contido no plasmídeo pACT2, ou seja, o plasmídeo utilizado para a construção da biblioteca de cDNA de cérebro humano. Ao realizar o seqüenciamento foram identificadas as proteínas listadas na Tabela 1. As interações foram confirmadas refazendo-se o ensaio de duplo híbrido em leveduras com cada proteína.

O estudo da distribuição do VACHT em células SN56 revela que o transportador está localizado em endossomos primários e de reciclagem, bem como em vesículas tipo sinápticas (Santos *et al.*, 2001; Barbosa, Jr. *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2005). No sistema nervoso central, dados de microscopia confocal indicam que o CHT1 está distribuído predominantemente em vesículas pré-sinápticas, que também apresentam o transportador VACHT, exibindo uma extensa co-localização com o mesmo (Ferguson *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). Essa co-localização pode ser observada não só no corpo celular, mas também nos processos e varicosidades das células.

O tráfego do CHT1 é muito similar ao tráfego do VACHT. CHT1 e VACHT exibem motivos de endocitose similares, sendo que um motivo tipo dileucina presente na região C-terminal desses dois transportadores parece ser essencial para a endocitose dos mesmos (Tan *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2001; Barbosa, Jr. *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2005). Portanto, é possível que proteínas importantes para o tráfego do VACHT sejam importantes também para o tráfego do CHT1.

VMAT2 (isca 1)	Clone	Tamanho cDNA	Interação confirmada no duplo híbrido em leveduras?
<i>Proteínas identificadas</i>			
MAP1A	37.1	2,3 kb	Sim
MAP1A	54.4	2,35 kb	Sim
BRI3	43.1	2,1 kb	Não
MAP1A	41.1	2,55 kb	Sim
VACHT (isca 2)	Clone	Tamanho cDNA	Interação confirmada no duplo híbrido em leveduras?
<i>Proteínas identificadas</i>			
Rab14	5.6	0,9 kb	Sim
EIF4A2 (Euc. Transl. Init. Fact)	6.3	0,9 kb	Sim
BRI3	8.7	1 kb	Sim
MAP1B	9.2	2,4 kb	Sim
EIF4A2	10.1	1 kb	Sim
Kchip2	13.3	2,4 kb	Sim
SRC like kinase Fyn kinase	23.1	2,6 kb	Não
SEC14 Like or homologue	23.2	0,8 kb	Sim
Rab 14	34.3	3 kb	Sim
MAP1A	38.3	2,1 kb	Sim
EIF4A2	42.6	0,6 kb	Sim
Flotillin1	43.3	1,2 kb	Sim
Clathrin light chain A	52.1	1,2 kb	Sim
Nischarin	53.6	1 kb	Sim

Tabela 1: Resultado do *screening* em duplo híbrido em leveduras utilizando como “iscas” VMAT2 ou VACHT, e como “presa” uma biblioteca de cDNA de cérebro humano.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Nosso objetivo é estudar se a interação do CHT1 com proteínas citoplasmáticas pode modular a atividade do transportador e elucidar mecanismos envolvidos nesse processo.

2.2 – Objetivos específicos

- Identificar proteínas que interajam com o CHT1.

- Determinar se o tráfego celular do CHT1 é modificado pela interação com essas proteínas.

- Verificar se o CHT1 colocaliza com essas proteínas.

- Avaliar se interações proteína-proteína afetam o transporte de colina de alta afinidade.

3 – Material e métodos

3.1 - Vetor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

Os cDNA's que codificam as regiões das proteínas de interesse, utilizadas nos experimentos, foram clonados no sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor pACT2 (8,1 kb) de modo que a orientação e a janela aberta de leitura (*open reading frame* – ORF) fossem corretas. O MCS está posicionado na região 3' da seqüência do domínio de ativação do DNA (DNA-AD) da proteína GAL4 (aminoácidos 768-881). O promotor *ADH1* promove a expressão da proteína híbrida em altos níveis na levedura hospedeira. Essa proteína é direcionada para o núcleo da levedura através da seqüência de localização nuclear do antígeno SV40, que foi clonado na região 5' da seqüência GAL4 AD. pACT2 replica-se de maneira autônoma em *E. coli* e *S. cerevisiae*. Possui o gene *bla* que confere resistência a ampicilina em *E. coli*, além disso, possui o marcador nutricional *LEU2* que permite que leveduras auxotróficas transformadas com o vetor cresçam em meio de cultura deficiente desse aminoácido. O mapa do vetor pACT2 AD está representado na Figura 3.

3.2 - Vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

O cDNA que codifica a região C-terminal do CHT1 (aminoácidos 498-580) foi clonado no sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor pGBKT7 (7,3 kb) de modo que a orientação e a janela aberta de leitura (*open reading frame* – ORF) fossem corretas. O vetor expressa essa proteína em fusão com os aminoácidos 1-147 do domínio de ligação ao DNA (DNA-BD) da proteína GAL4. O epítipo c-Myc também é expresso em fusão. Em leveduras, o promotor *ADH1* promove a expressão de altos níveis das proteínas híbridas. A transcrição é finalizada pelos sinais de término de transcrição T7 e *ADH1* (T_{T7} & $ADH1$). pGBKT7 replica de maneira autônoma em *E. coli* e *S. cerevisiae* a partir das origens de replicação pUC e 2 μ ori, respectivamente. O vetor possui gene que confere resistência a kanamicina para seleção em *E. coli* e o marcador nutricional *TRP1* para seleção em leveduras. O mapa do vetor pGBKT7 está representado na Figura 4.

pACT2 AD Vector Information

GenBank Accession #: U29899.

PT3022-5

Catalog #K1604-A

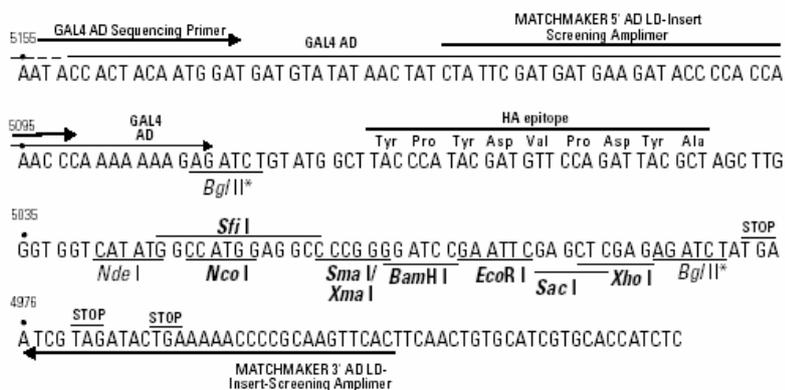
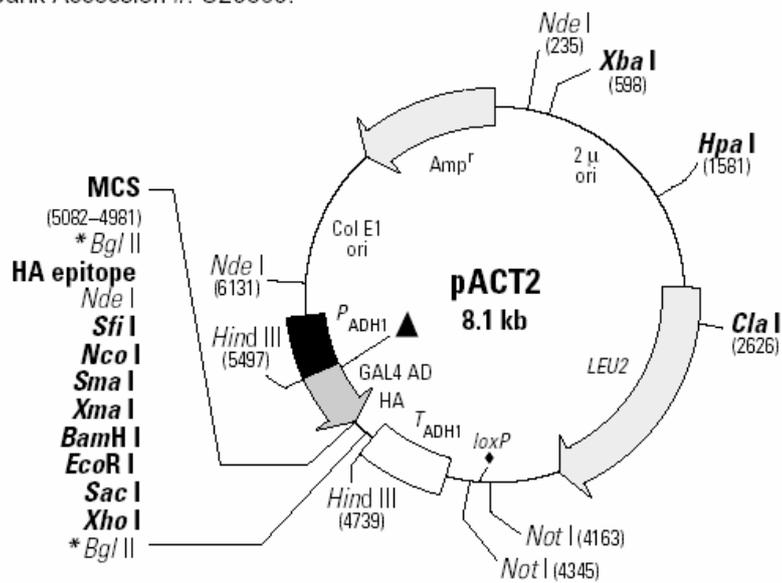


Figura 3: Mapa esquemático do vetor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

pGBKT7 Vector Information

GenBank Accession #: Submission in Progress.

PT3248-5

Catalog # K1612-1

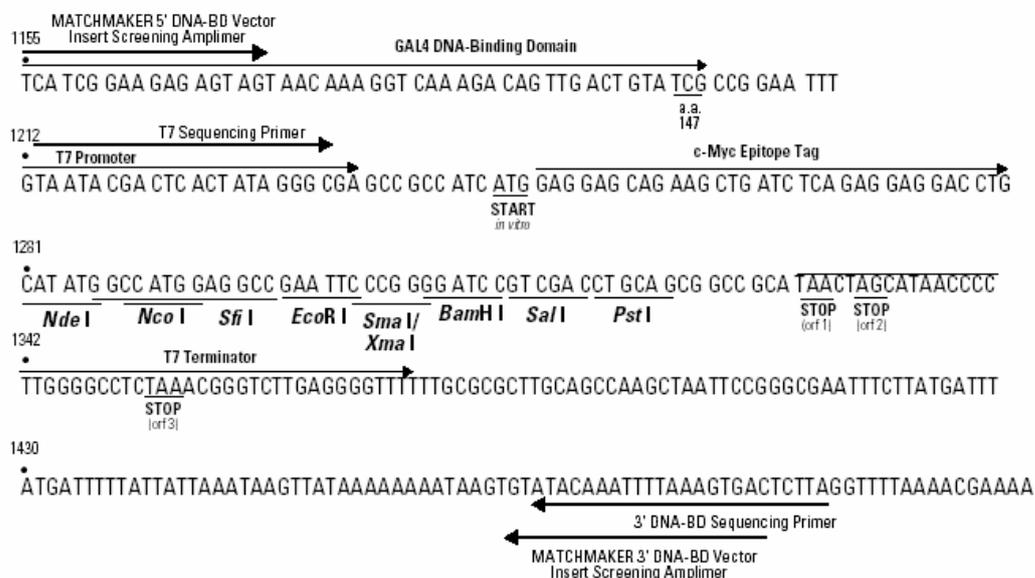
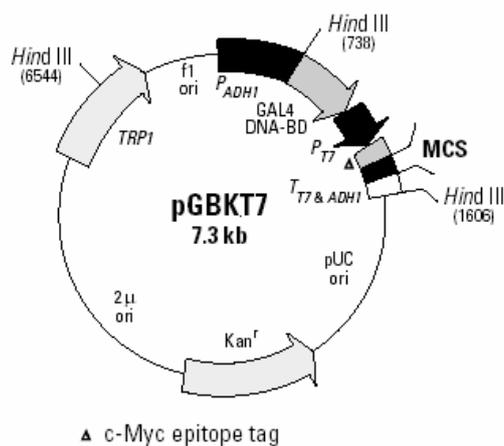


Figura 4: Mapa esquemático do vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

3.3 - *Saccharomyces cerevisiae* AH109

A cepa AH109 foi construída para detectar interações proteína-proteína por *screening* em duplo híbrido. AH109 possui os genes repórteres *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* e *MEL1*, que são expressos somente na presença de interações protéicas baseadas na ativação da transcrição por GAL4.

3.4 – Duplo híbrido em leveduras

A técnica de duplo híbrido em leveduras foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Gietz & Schiestl (1995). Em resumo, leveduras *S. cerevisiae* haplóides AH109 foram crescidas por 16 horas a 30°C em 20mL de meio YPDA (peptona 2%, extrato de levedura 1%, glicose 2%, adenina 0,003% pH 7,0) sob leve agitação. Após este período foi feita uma diluição das células (10mL da cultura líquida em 40mL de meio YPDA) e o crescimento foi acompanhado até atingirem uma DO_{600} de 0,8 (cerca de 8×10^6 células). As leveduras foram centrifugadas por 5 minutos a 2.500 g, ressuspendidas em 25 mL de água estéril e centrifugadas novamente. As células foram lavadas com 1 mL de acetato de lítio 100 mM e transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Centrifugou-se o tubo por 15 segundos a 9.500 g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspendido novamente com 400 μ L de acetato de lítio 100 mM. Foram feitas alíquotas de 50 μ L em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, que foram centrifugados e descartou-se o sobrenadante. Em seguida adicionou-se lentamente os reagentes de transformação seguindo a ordem: 240 μ L PEG (50% W/V, Clontech), 36 μ L acetato de lítio 1,0 M (Clontech), 25 μ L de DNA de esperma de salmão (3 μ g/mL, Invitrogen) previamente desnaturado (fervido por 5 minutos e rapidamente resfriado em gelo) e os pares de vetores (~0,5 – 1 μ g) de acordo com as combinações experimentais a serem testadas.

Os tubos foram vigorosamente agitados (~1minuto), incubados em estufa a 30°C por 30 minutos. Em seguida foram incubados em banho-maria a 42°C (*heat shock*) por 25 minutos. Posteriormente as células foram centrifugadas por 15 segundos a 9.500 g, o sobrenadante retirado e o *pellet* ressuspendido com 1mL de água estéril. As leveduras co-transformadas foram plaqueadas em meio mínimo SD Agar base (Clontech) adicionado do 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 geradas a partir da co-transformação foram determinadas através do plaqueamento das leveduras em placas contendo meio mínimo SD Agar base (Clontech) adicionado do suplemento DO -Leu/-Trp/-His/-Ade, contendo ou não 3-AT na concentração de 5 e 10mM, para verificar a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*.

3.5 – Vetores eucariotos

Trabalhamos com os seguintes vetores eucariotos:

3.5.1 - pCDNA 3.1 (-) (Invitrogen): nesse vetor está subclonado o cDNA que codifica CHT1-FLAG.

3.5.2 - pCMV-Myc (Clontech): nesse vetor está subclonado o cDNA que codifica SEC14 *like* – myc.

3.6 – Cultura celular

3.6.1- HEK 293

Nos experimentos de transporte de colina e co-imunoprecipitação foram utilizadas células embrionárias renais humanas (HEK 293), adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro – Cell bank. HEK 293 são células epiteliais

imortalizadas com adenovírus E1A – Adenovírus humano tipo 5 (Graham, 1977). As células foram crescidas em garrafas de cultura (35mmx60mmx100mm) com 5mL de meio DMEM (*Dulbeco's modified Eagle's medium* – Sigma), acrescidos de 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco) além de 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) em estufa a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 horas, e as células removidas mecanicamente para outras garrafas quando atingiam aproximadamente 90% de confluência.

3.6.2- SN56

As células SN56 foram cedidas pelo Professor Bruce Wainer (Department of Pathology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA). As células SN56 são derivadas de neurônios septais (Hammond *et al.* 1990) e apresentam várias características colinérgicas (Blusztajn *et al.*, 1983; Barbosa, Jr. *et al.*, 2002; Kushmerick *et al.*, 2001). Essas células apresentam vesículas tipo sinápticas em suas varicosidades (Hammond *et al.*, 1990) e expressam várias proteínas de vesículas sinápticas, incluindo sinaptotagmina I (Barbosa, Jr. *et al.*, 2002). Tais características são mais pronunciadas quando as células são diferenciadas (Blusztajn *et al.*, 1983; Kushmerick *et al.*, 2001).

As células SN56 foram mantidas em meio DMEM (Sigma), adicionado de 10% de soro fetal bovino (Gibco); 2 mM de L-glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) em garrafas de cultura de 50 mL em estufa de CO₂ à 5% e 37°C. As células foram diferenciadas neste mesmo meio, mas sem soro fetal, suplementado com 1mM de dibutilil – AMPc (Sigma) por 2 dias. O meio foi trocado a cada dois dias, exceto durante a diferenciação, quando era trocado a cada 24 horas.

3.7 - Plaqueamento e transfecção

Para utilização das células para transfecção, essas eram removidas mecanicamente para placas de 35 ou 100mm, ou ainda para lamínulas para experimentos de microscopia confocal. Para isso, as células eram contadas em câmara de Neubauer – Improved Neubauer, 1x10 mm de profundidade (Boeco). Essas células eram então incubadas por 12 a 18 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ para então serem utilizadas para transfecção.

Para transfecção foram utilizados dois métodos:

3.7.1 - Lipofectamina:

Esse é um método de transfecção mediado por lipossomo. Os procedimentos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante (Lipofectamina 2000, Life Technologies). As transfecções foram realizadas utilizando o meio Optimen (Gibco) para se diluir o DNA e a lipofectamina. Foram usados 1 a 2 µg de DNA para transfecção de células em placas de 35 mm. Para transfecção de células SN56 utilizou-se 2,5 µl de lipofectamina para cada µg de DNA. As células foram incubadas com o meio de transfecção por 4 horas a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂, sendo que o meio de transfecção foi substituído por meio de cultura. 24 a 48 horas após a transfecção as células foram utilizadas para experimentos.

3.7.2 - Fosfato de cálcio:

O método de transfecção utilizado é uma modificação do método de transfecção por cálcio (Ferguson & Caron, 2004). Células HEK 293 foram plaqueadas em um número de $1,2 \times 10^6$ células por placas de 100 mm, o que gera uma confluência celular próxima a 60%, sendo essa a ideal para a eficiência do método aqui descrito. A transfecção foi realizada um dia após

plaqueamento. Para a transfecção, adicionou-se em tubo de 1,5 mL em torno de 4 a 6 µg de DNA + água suficiente para o volume de 450 µl. Juntou-se então 50 µl de CaCl₂ 2,5 M e depois gotejou-se cuidadosamente 500 µl HBS 2x. *Solução de 2x HEPES-buffered saline (HBS):* NaCl 0,28 M, HEPES 0,05 M, Na₂HPO₄ 1,5 mM. O pH foi acertado para 7,05 – 7,12 utilizando-se NaOH 5 M. Um pH exato é de extrema importância para garantir a eficiência de transfecção, sendo que essa eficiência deve ser testada cada vez que se preparar novo HBS. É importante que o HBS 2x seja adicionado vagarosamente para que o complexo Ca²⁺/DNA se forme e se mantenha estável, assegurando alto nível de transfecção. Após adição do HBS 2x pipetou-se novamente o volume total (agora de 1 mL) por duas vezes para promover a homogeneidade da mistura. Nessa etapa também é importante que a pipetagem seja realizada vagarosamente, gotejando-se a mistura. Em seguida, a mistura de transfecção foi adicionada à cultura de células presentes nas placas de 100 mm. A mistura de transfecção e as células foram mantidas por 18 a 20 horas a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Após esse período as células foram lavadas por três vezes com o próprio meio de cultura. Quando necessário, as células foram replaqueadas, 4 horas após a troca do meio, para a realização de experimentos. Os experimentos foram realizados no segundo dia após a transfecção.

3.8 – Co-imunoprecipitação

Os experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados de acordo com as indicações do fabricante das esferas de agarose revestidas com anticorpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich). Foram utilizadas células HEK 293 co-expressando CHT1-FLAG e SEC14-Myc. Em banho de gelo, as células foram lavadas duas vezes com TBS pH 7,6 (*Tris buffered saline*, 20mM tris base, 137mM NaCl). Em seguida lisadas com um tampão de lise (1% CHAPS, 0,1M tampão fosfato de sódio, pH 7,2, Glicerol 10%, 150mM NaCl) contendo inibidores de proteases (AEBSF 0,1 mM e 10 µg/mL de leupeptin e aprotinin). Os lisados foram transferidos para tubos de 1,5mL e colocados em um aparelho

rotatório na câmara fria (4°C) por uma hora. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.500 g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos, sendo então dosados pelo método de Bradford (Bradford, 1976) para se determinar o conteúdo protéico. 800 µg de cada amostra foram incubados com 40 µL de esferas de agarose revestidas com anticorpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich), previamente lavadas por três vezes com TBS, em aparelho rotatório na câmara fria (4°C) por duas horas. As esferas foram centrifugadas e lavadas três vezes com tampão de lise e três vezes com TBS, sendo posteriormente ressuspendidas em 20 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 3X. As amostras foram então resolvidas em gel SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose, sendo posteriormente reveladas por imunoblot, onde se utilizou anticorpos anti-CHT1 policlonal (1:1000, cedido por Dr. Jane R. Rylett, University of Western Ontario, Canada) ou anti-Myc (1:3000, para detectar SEC14, Covance Research Products).

3.9 - Transporte de Colina

Os experimentos de transporte de colina foram realizados de acordo com procedimentos descritos por Ribeiro e colaboradores (2003). As células a serem testadas foram lavadas duas vezes com meio Krebs e pré-incubadas a 37°C por 10 min no mesmo meio. Para as células que foram tratadas com HC-3, esse foi adicionado nessa etapa e mantido também na etapa de incubação com colina. Depois da pré-incubação esse meio foi trocado por meio KREBS + colina 1 µM (colina não radioativa + 0,012 nM de colina radioativa: [Methyl-³H] Choline Chloride Ethanol Solution, atividade específica 83,0 Ci/mMol (Amersham – Life Science)), apresentando cerca de 1 µCi por placa. Incubou-se as células a 37°C pelo tempo de 10 min. Depois da incubação, as células foram colocadas sobre o gelo e lavadas 3 vezes com meio KREBS gelado para se retirar a colina presente no sobrenadante. Retirou-se o meio e adicionou-se 1 mL de NaOH 0,1 M para promover a lise celular. As células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente para que a lise fosse completa. Depois desse tempo,

homogeneizou-se as células por pipetagem. 300 µL desse lisado foram adicionados a frascos contendo 3 mL de solução de Bray (líquido de cintilação), utilizados para medida da radioatividade por cintilação líquida no *Liquid Scintillation Analyzer* (Packard). Os resultados foram expressos em dpm (número de desintegrações por minuto).

3.10 - Gel SDS-PAGE e Western blot

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris (Invitrogen), sendo posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose, de acordo com procedimentos descritos por Towbin e colaboradores (1979).

3.10.1 - CHT1-FLAG: as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (PBS pH 7,4, contendo 0,15% de Triton e 8% de leite) por 30 min. Em seguida, incubou-se as membranas por 1,5 h com anticorpo primário anti-CHT1 (1:1000, cedido por Dr. Jane R. Rylett, University of Western Ontario, Canada) em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário (horsedish peroxidase-conjugated donkey, KPL, 1:2500) IgG anti-coelho em solução de bloqueio por uma hora. Após serem lavadas três vezes novamente, as membranas foram submetidas à detecção quimioluminescente, utilizando kit ECL (Amersham). Bandas imunorreativas não saturadas foram submetidas a scanner.

3.10.2 - SEC14-Myc: o procedimento foi o mesmo para a detecção de CHT1-FLAG, porém a solução de bloqueio utilizada foi TBS pH 7,6, contendo Tween 20 0,05% e 8% de leite. O anticorpo primário utilizado foi anti-Myc (1:3000, Covance Research Products) em solução de bloqueio e o anticorpo secundário (horsedish peroxidase-conjugated donkey, KPL, 1:2500) anti-camundongo IgG em solução de bloqueio.

3.11 - Imunofluorescência

Os experimentos de imunofluorescência foram realizados de acordo com procedimentos descritos por Canfield & Levenson (1993) . As células foram lavadas três vezes em PBS 1x (tampão fosfato salina, pH 7.4) e então fixadas com paraformaldeído 3% durante 20 minutos. As células foram novamente lavadas três 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 a temperatura ambiente. O anticorpo monoclonal anti-Myc (1:3000, Covance Research Products) foi utilizado como anticorpo primário, bem como o anticorpo policlonal anti-FLAG (1:500, Sigma-Aldrich). Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS 1x. Anticorpos secundários conjugados com Alexa Fluor 568 ou Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) foram utilizados. Experimentos controles, com omissão do anticorpo primário foram realizados para verificar a especificidade da marcação, bem como marcação de células não transfectadas com anticorpos primários e secundários.

A maioria das imagens de células fixadas foi coletada utilizando um sistema de confocal Bio-Rad (modelo MRC 1024, acoplado a um microscópio Zeiss –Axiovert 100), utilizando o software lasersharp (versão 3.1, Bio-Rad) com objetiva de 100x de imersão em óleo. Outro microscópio confocal também foi utilizado, o Zeiss LSM510 META Confocal Microscope, do CEMEL da UFMG, Belo Horizonte-MG. Para excitar as preparações foi utilizado laser UV de argônio (488 nm) ou laser de argônio-kriptônio (através das linhas 488 nm ou 568 nm).

4 – Resultados

4.1 - Interações detectadas no duplo híbrido em leveduras

Nosso objetivo inicial foi verificar se as interações positivas entre o VACHT e as várias proteínas “pescadas” na biblioteca de cDNA de cérebro humano, que parecem ter papel no tráfego de proteínas, também seriam verdadeiras para o CHT1. Para isso escolhemos as seguintes proteínas para iniciar os experimentos de duplo híbrido, utilizando como “isca” a região C-terminal do CHT1:

- 1 – MAP1A
- 2 – BRI3
- 3 – Rab14
- 4 – Nischarin
- 5 – Flotilina1
- 6 – SEC14*like*

4.1.1 – Interação CHT1 x MAP1A

Nos experimentos que realizamos, o gene que codifica a região C-terminal do CHT1 foi clonado no vetor pGBKT7 e o gene que codifica a cadeia leve de MAP1A foi clonado no vetor pACT2. Ao avaliar a ativação dos genes repórteres, utilizamos dois controles negativos, ou seja, transformamos leveduras AH109 com pGBKT7-CHT1 e pACT2 sem o inserto, ou pGBKT7 sem o inserto e pACT2-MAP1A.

Na Figura 5, podemos observar o resultado do experimento. Em A, estão representadas as placas onde as leveduras transformadas foram plaqueadas em meio de cultura deficiente dos aminoácidos leucina e triptofano. Podemos observar que houve crescimento homogêneo nas três condições avaliadas. Esse crescimento indica que houve transformação, ou seja, a levedura

Saccharomyces cerevisiae AH109 foi capaz de assimilar eficientemente os dois plasmídeos. Como os plasmídeos pACT2 e pGBKT7 possuem genes que levam à produção de enzimas envolvidas na biossíntese de leucina e triptofano respectivamente, as leveduras que assimilaram os dois plasmídeos cresceram nas placas contendo meio de cultura deficiente nesses aminoácidos.

Na Figura 5 B, estão apresentados os resultados do plaqueamento das leveduras em meio de cultura deficiente em leucina (L), triptofano (W), histidina (H) e adenina (A). O intuito dessa etapa do experimento foi verificar se existe interação física entre as proteínas em estudo. Caso exista essa interação, os domínios de ligação ao DNA e de ativação da transcrição de GAL4 serão aproximados, permitindo a ativação da transcrição dos genes repórteres (*HIS3* e *ADE2*) e conseqüentemente, o crescimento da levedura. Como podemos observar existe interação física entre CHT1 e MAP1A (Figura 5 B). Onde foram plaqueadas leveduras transformadas com um dos plasmídeos sem o inserto de cDNA, não houve ativação dos genes repórteres e portanto, não houve o crescimento das leveduras. Isso sugere que a interação entre a região C-terminal do CHT1 e a cadeia leve de MAP1A no duplo híbrido em leveduras é específica.

Em C e D, plaqueamos as leveduras em meios de cultura deficientes em leucina, triptofano, histidina e adenina, porém na presença de 3-AT, o inibidor competitivo do gene *HIS3*, nas concentrações de 5 e 10mM. O crescimento das leveduras nesse meio indica que a interação observada é uma interação forte, pois a expressão do gene *HIS3* é fortemente inibida, dificultando qualquer crescimento referente a uma ativação constitutiva do gene em questão.

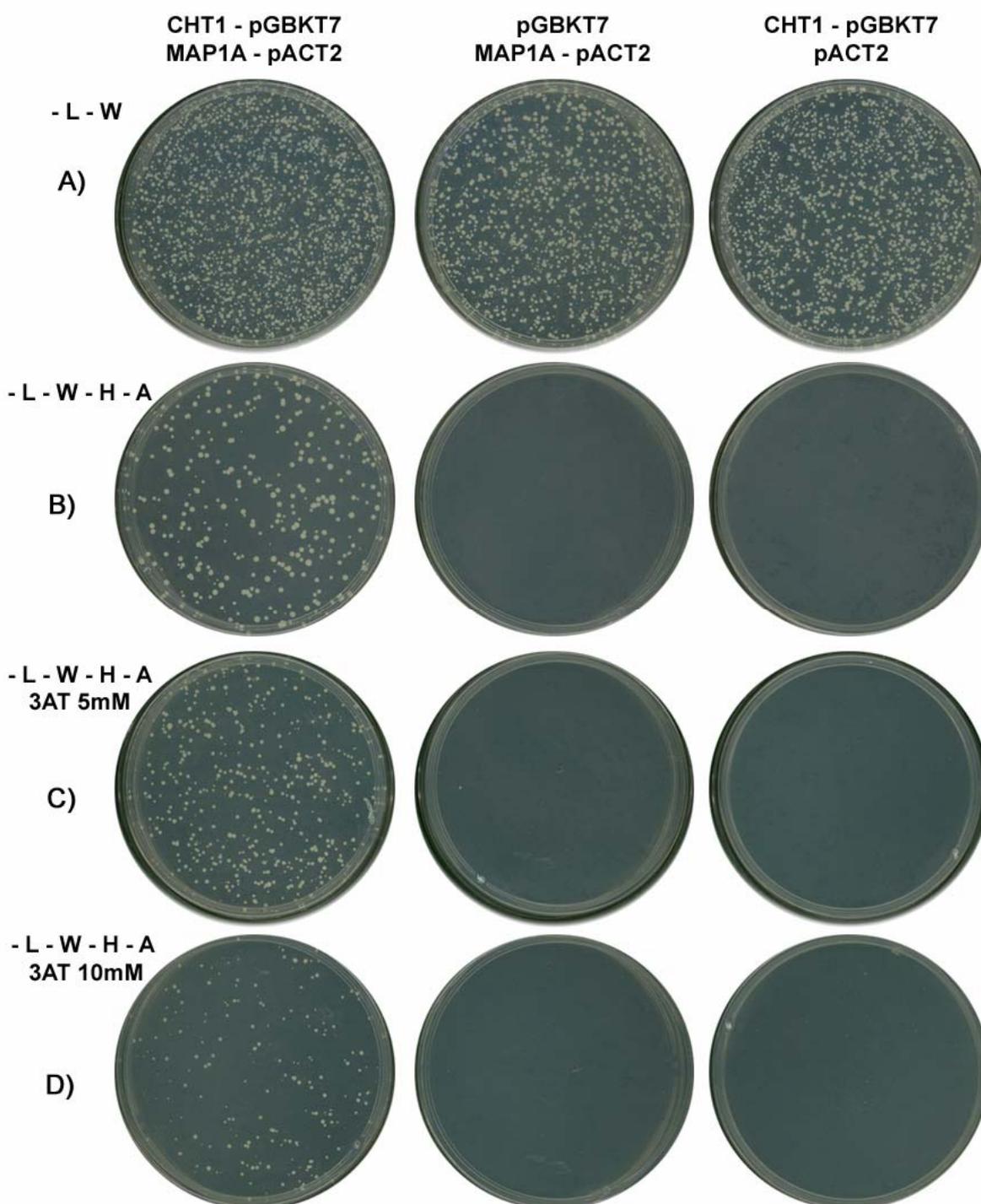


Figura 5: CHT1 e MAP1A interagem no duplo híbrido em leveduras. (A) Controle de transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano. (B) Interação positiva entre CHT1 e MAP1A, houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* e crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina. (C) e (D) representam condições mais estritas na presença de 3-AT, nas concentrações de 5 e 10mM respectivamente (o crescimento nessas condições indica interação forte). Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

4.1.2 – Interação CHT1 x BRI3

BRI3 pertence à família de proteínas integrais de membrana contendo pelo menos três membros, BRI1, BRI2 e BRI3 (Vidal *et al.*, 2001). A expressão de BRI1 está associada à osteogênese e condrogênese assim como a maturação de células T (Vidal *et al.*, 2001). Uma mutação pontual no códon de parada da proteína BRI2 resulta na formação de um peptídeo amiloidogênico, responsável por um tipo de demência no Reino Unido (Vidal *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2000). Até o momento, muito pouco se sabe sobre a função fisiológica de BRI3, uma proteína de 267 aminoácidos ancorada à membrana, exceto que ela é altamente expressa no cérebro humano, especialmente no córtex e hipocampo (Vidal *et al.*, 2001).

Como podemos observar na Figura 6, existe interação específica entre CHT1 e BRI3. Em A podemos observar que houve crescimento homogêneo das leveduras que foram transformadas e plaqueadas em meio de cultura isento de L e W, indicando que houve transformação. Houve a ativação dos genes repórteres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109, em função da interação física entre CHT1 e BRI3, com o crescimento em meio de cultura isento de L,W,H e A como podemos observar em B.

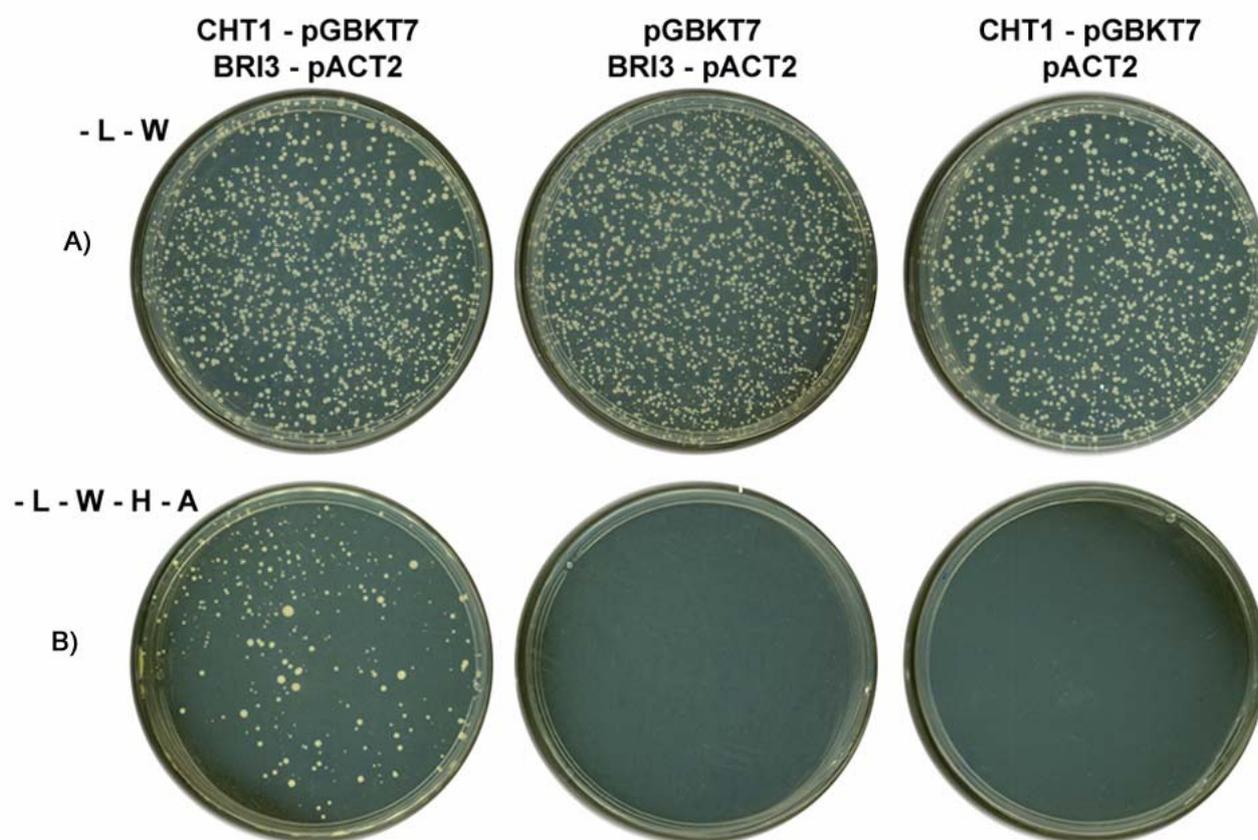


Figura 6: CHT1 e BRI3 interagem no duplo híbrido em leveduras. (A) Controle de transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano. (B) Interção positiva entre CHT1 e BRI3, houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* e crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

4.1.3 – Interação CHT1 x Rab14

Proteínas Rab pertencem à superfamília das pequenas GTPases semelhantes a Ras, que são essenciais para a regulação do tráfego entre diferentes compartimentos intracelulares (Deneka *et al.*, 2003). Como outras GTPases, as proteínas Rab ciclam entre um estado ativo, ligado a GTP, e um estado inativo, ligado a GDP. No estado ativo, Rabs recrutam proteínas efetoras específicas para a membrana (Novick & Zerial, 1997).

Em um trabalho recente, Larance e colaboradores (2005) demonstraram que a regulação do tráfego intracelular do transportador de glicose (GLUT4) envolve a atividade de Rab14, entre outras proteínas.

Não observamos interação física entre o CHT1 e Rab14 no duplo híbrido em leveduras. Na Figura 7 podemos observar em A, a transformação do experimento, com crescimento das leveduras transformadas e plaqueadas em meio de cultura isento de L e W. Em B, observamos que não houve interação entre CHT1 e Rab14, uma vez que não houve crescimento das leveduras em meio de cultura isento de L,W,H e A.

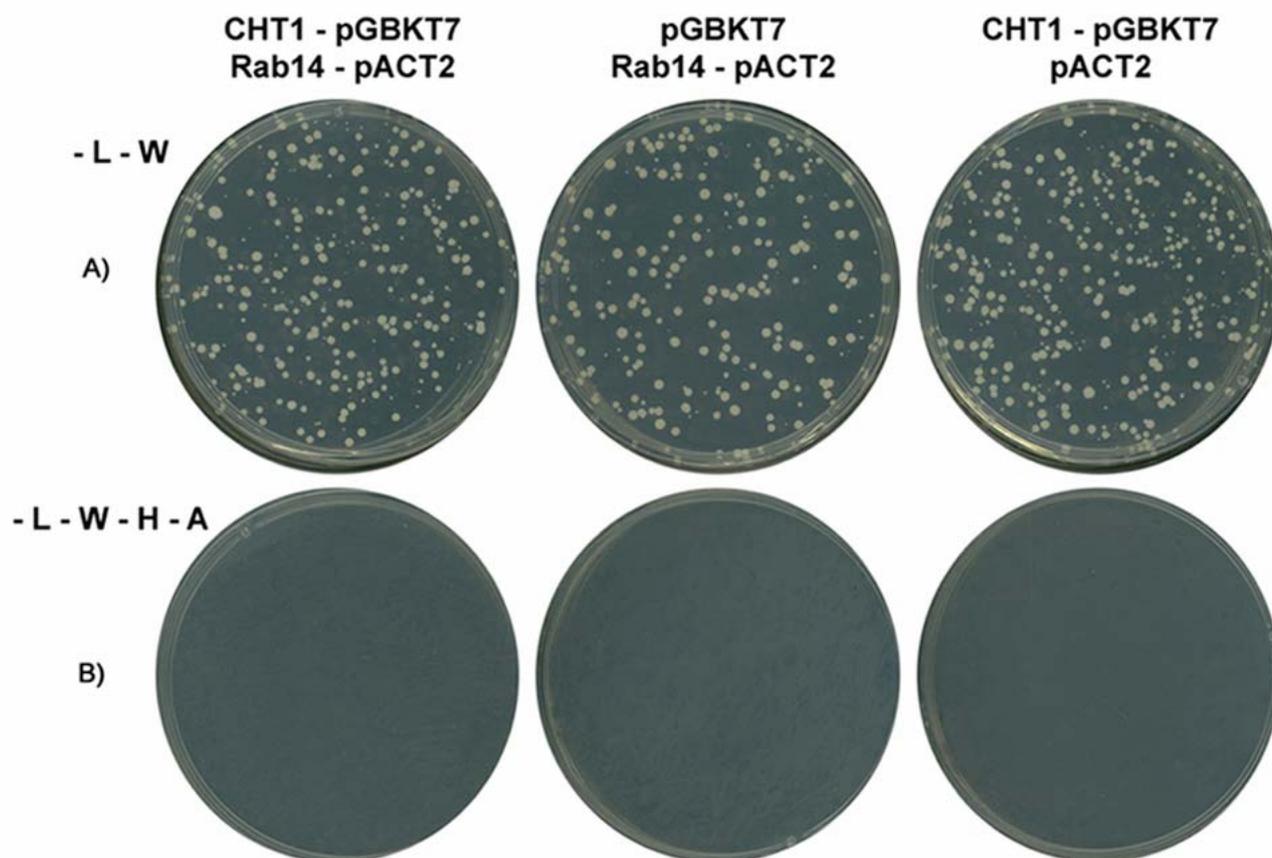


Figura 7: CHT1 e Rab14 não interagem no duplo híbrido em leveduras. (A) Controle de transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano. (B) Ausência de interação entre CHT1 e Rab14. Não houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* como indicado pela ausência de crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

4.1.4 – Interação CHT1 x Niscarina

Niscarina é uma proteína que interage com integrinas e sua superexpressão em fibroblastos leva a mudanças na organização do citoesqueleto e uma grande inibição da migração celular. A superexpressão influencia a organização dos filamentos de actina em vários tipos celulares. Ocorre a formação de filamentos anormais em forma de cesta ao redor da periferia celular (Alahari *et al.*, 2000).

Estudos de fracionamento celular e imunofluorescência indicam que Niscarina é uma proteína citosólica solúvel. Ela é altamente expressa em linhagens celulares neuronais, mais do que em células epiteliais ou fibroblastos, embora níveis basais de expressão sejam encontrados em praticamente todos os tipos celulares (Alahari *et al.*, 2000).

Não observamos interação física entre o CHT1 e Niscarina utilizando a técnica de duplo híbrido em leveduras. Na Figura 8 podemos observar em A, a transformação desse experimento. Houve crescimento homogêneo das leveduras que foram transformadas e plaqueadas em meio de cultura isento de L e W. Em B, verificamos que não houve ativação dos genes repórteres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109, uma vez que não observamos crescimento em meio de cultura isento de L,W,H e A.

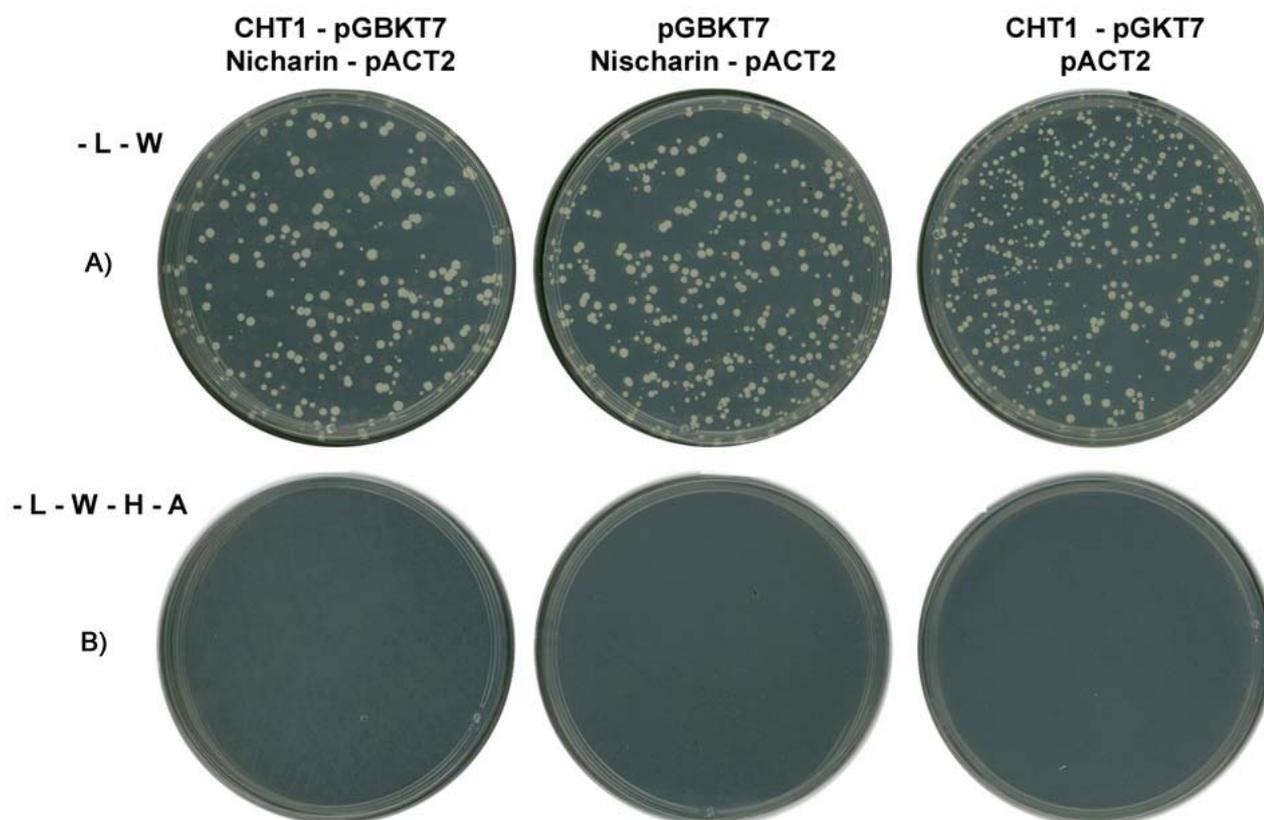


Figura 8: CHT1 e Nischarina não interagem no duplo híbrido em leveduras. (A) Controle de transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano. (B) Ausência de interação entre CHT1 e Nischarina. Não houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* como indicado pela ausência de crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.1.5 – Interação CHT1 x Flotilina1

Flotilina é uma proteína integral de membrana que faz parte da composição de caveolae. Caveolae são microdomínios da membrana plasmática que se apresentam como pequenas invaginações, de diâmetro aproximado de 25-150 nm. Estão envolvidos no tráfego vesicular e transdução de sinais e possuem inúmeras funções definidas (Bickel *et al.*, 1997).

Como podemos observar na Figura 9, existe interação específica entre CHT1 e Flotilina1. Em A, observamos crescimento homogêneo das leveduras que foram transformadas e plaqueadas em meio de cultura isento de L e W, indicando que houve eficiência de transformação. Em B, e houve a ativação dos genes repórteres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109, em função da interação física entre CHT1 e Flotilina1, com o crescimento das leveduras em meio de cultura isento de L,W,H e A.

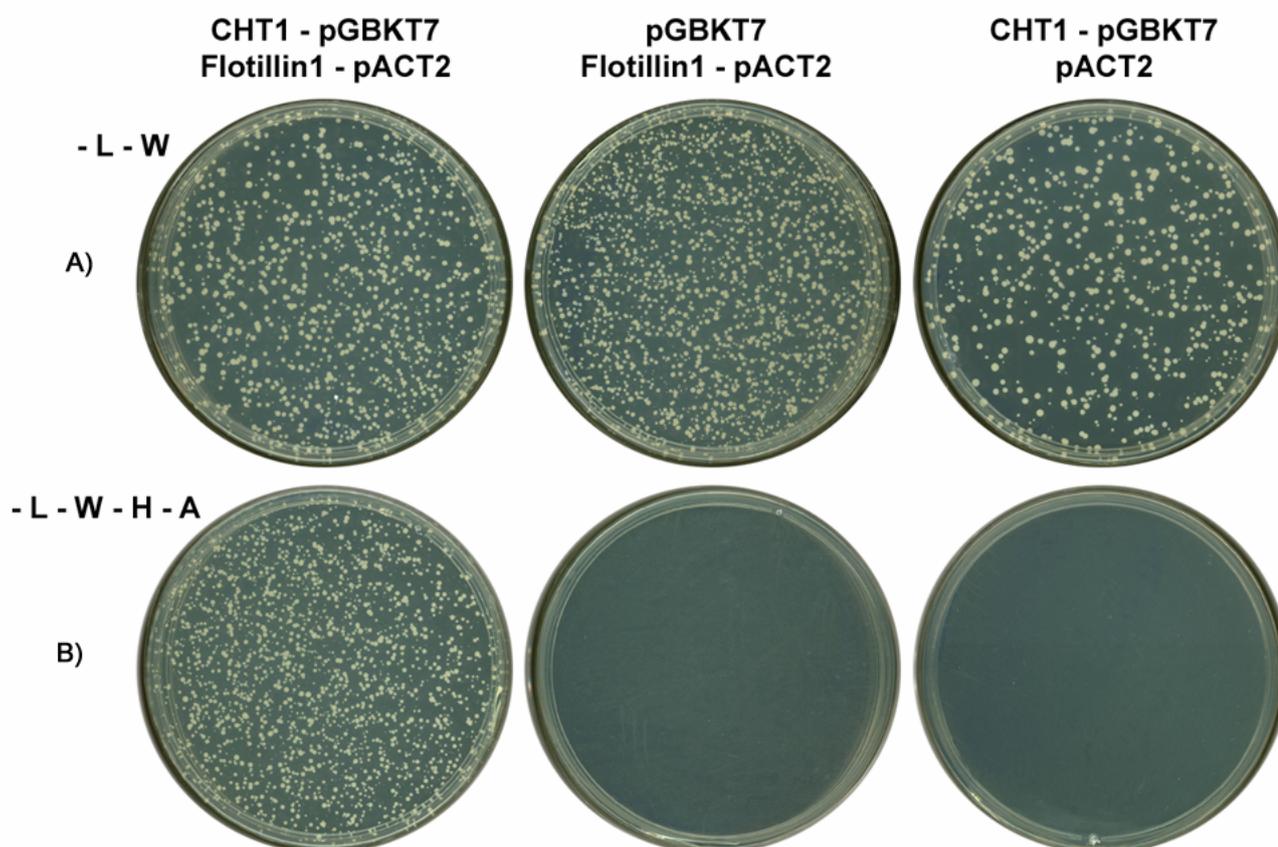


Figura 9: CHT1 e Flotilina1 interagem no duplo híbrido em leveduras. (A) Controle de transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano. (B) Interação positiva entre CHT1 e Flotilina1, houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* e crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

4.1.6 – Interação CHT1 x SEC14/like

SEC14 é a principal proteína envolvida na transferência de fosfatidilinositóis (PI) em *Saccharomyces cerevisiae*. Em humanos seu homólogo é conhecido como SEC14/like. Estudos de fracionamento celular demonstraram que SEC14 é uma proteína encontrada no citoplasma. Acredita-se que ela seja um fator citosólico que promove o transporte de proteínas a partir do complexo de Golgi, presumivelmente em função da sua habilidade de ligação a fosfolípidos (Bankaitis *et al*, 1989). O complexo de Golgi é comum a todas as células eucariotas, esta organela é de fundamental importância para a regulação do tráfego de proteínas intracelulares que transitam entre os últimos estágios do caminho secretório, na reciclagem de membrana a partir da superfície celular, e na comunicação entre diversas etapas do caminho endocítico (Griffiths *et al*, 1986).

Na Figura 10 podemos verificar que existe interação específica entre CHT1 e SEC14/like. Houve crescimento homogêneo das leveduras que foram transformadas e plaqueadas em meio de cultura isento de L e W, indicando que houve transformação e houve a ativação dos genes repórteres da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109, em função da interação física entre CHT1 e SEC14/like, com o crescimento das leveduras em meio de cultura isento de L,W,H e A.

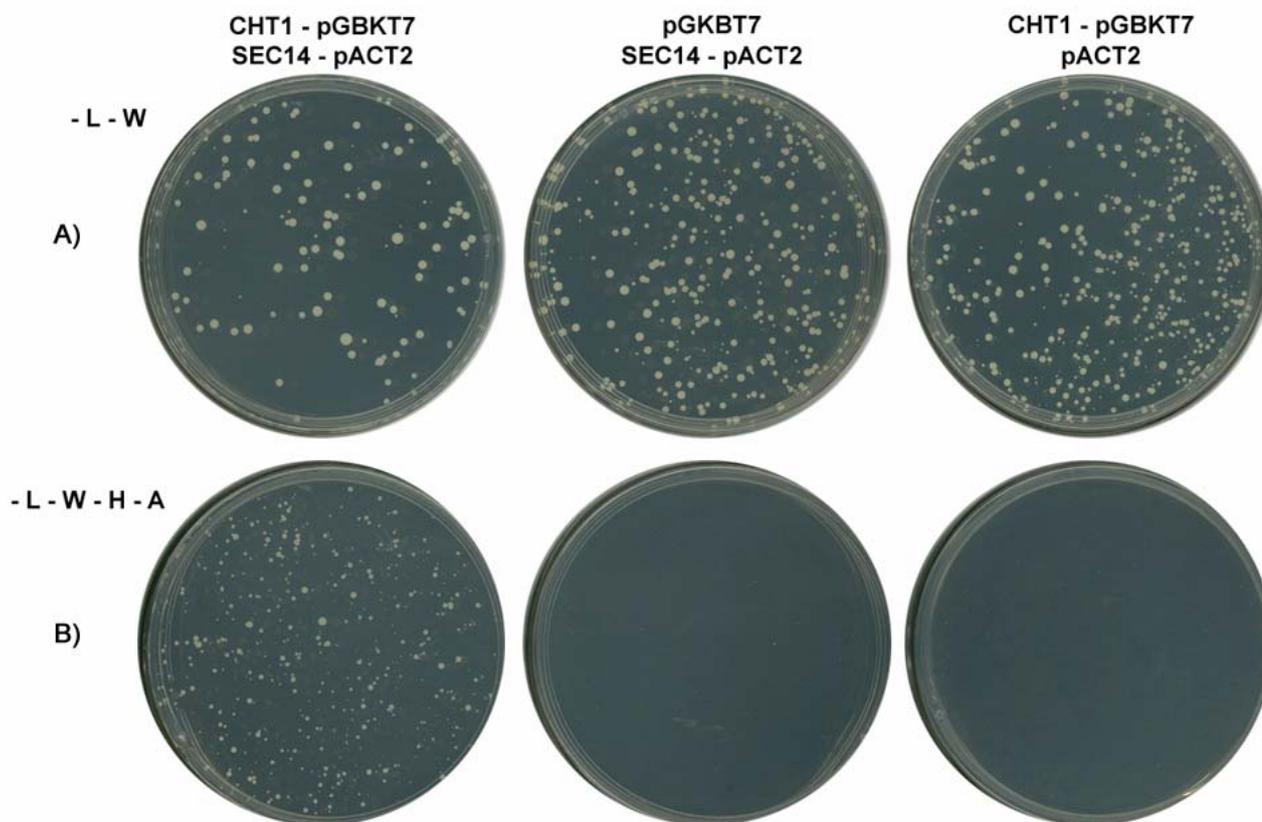


Figura 10: CHT1 e SEC14*like* interagem no duplo híbrido em leveduras. (A) Controle de transformação do experimento: crescimento em meio de cultura isento de leucina e triptofano. (B) Interação positiva entre CHT1 e SEC14*like*, houve ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* e crescimento em meio de cultura isento de leucina, triptofano, histidina e adenina. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

Em humanos, SEC14*like* é uma proteína ainda pouco descrita, por isso, para delinear com maiores detalhes a relevância da interação CHT1-SEC14*like*, procuramos analisar e melhor caracterizar essa interação. Posteriormente, nosso grupo tem interesse em caracterizar também as demais interações verificadas para o CHT1 nesses ensaios.

A interação CHT1-SEC14*like* detectada no duplo híbrido em leveduras ocorreu entre a porção C-terminal do CHT1 e a porção C-terminal da proteína SEC14*like*. Esse foi o fragmento “pescado” no *screening* de duplo híbrido em leveduras utilizando VMAT2 e VACHT como “isca”. Para a realização dos experimentos subsequentes, fizemos a clonagem da janela aberta de leitura da proteína SEC14*like* completa no vetor pCMV-Myc. A clonagem foi realizada por RT-PCR a partir de um *pool* de RNA mensageiros de células HeLa por Sebastian Marion e Vânia Prado.

4.2 – Co-imunoprecipitação CHT1 – SEC14*like*

No intuito de confirmar se a interação detectada entre CHT1 e SEC14 *like* no duplo híbrido em leveduras, também ocorreria em células de mamíferos, nós realizamos ensaios de co-imunoprecipitação. Para isso, transfectamos de forma transiente células HEK 293 com vetores eucariotos pCDNA 3.1 (-) (Invitrogen), onde se encontra inserido o cDNA que codifica CHT1-FLAG; e pCMV-Myc (Clontech) que possui o cDNA que codifica a proteína completa SEC14*like*-myc, cujo peso molecular aproximado é de 70kD.

A inserção do epítipo FLAG foi realizada na porção N-terminal do CHT1. Essa construção foi capaz de conferir às células HEK 293 um transporte de colina de alta afinidade, indicando que a inserção da seqüência FLAG não levou a alterações da função do transportador de colina (Ribeiro *et al.*, 2003).

As células foram lisadas em um tampão de lise contendo CHAPS 1%, a proteína CHT1-FLAG foi imunoprecipitada através da incubação com esferas de agarose conjugadas com o anticorpo de camundongo anti-FLAG, sob agitação por duas horas a 4°C. Em seguida realizamos eletroforese em SDS-PAGE e

Western blot com anticorpos anti-CHT1 policlonal (coelho) e anti-myc monoclonal (camundongo).

Os nossos experimentos mostram como indicado na Figura 11 A que, em células de mamíferos a proteína SEC14*like*-myc co-imunoprecipitou com CHT1-FLAG, nas células HEK293 que foram co-transfectadas tanto com CHT1-FLAG como SEC14*like*-myc. As células que foram transfectadas somente com SEC14*like*-myc e incubadas com as esferas, não apresentaram a banda referente à proteína CHT1-FLAG, indicando que as esferas de agarose conjugadas com anticorpos anti-FLAG precipitaram especificamente CHT1-FLAG.

Como pode ser observado nas canaletas 3 e 4 da Figura 11 A, o nível de expressão de SEC14*like*-myc nas células HEK293 foi o mesmo, nas células co-transfectadas com CHT1-FLAG ou nas células transfectadas apenas com SEC14*like*-myc. Isso sugere que a interação entre CHT1-FLAG e SEC14*like*-myc não foi resultado de uma superexpressão de SEC14*like*-myc nas células que foram co-transfectadas com CHT1-FLAG. Esses resultados sugerem que, em células de mamíferos, existe interação entre CHT1 e SEC14*like*.

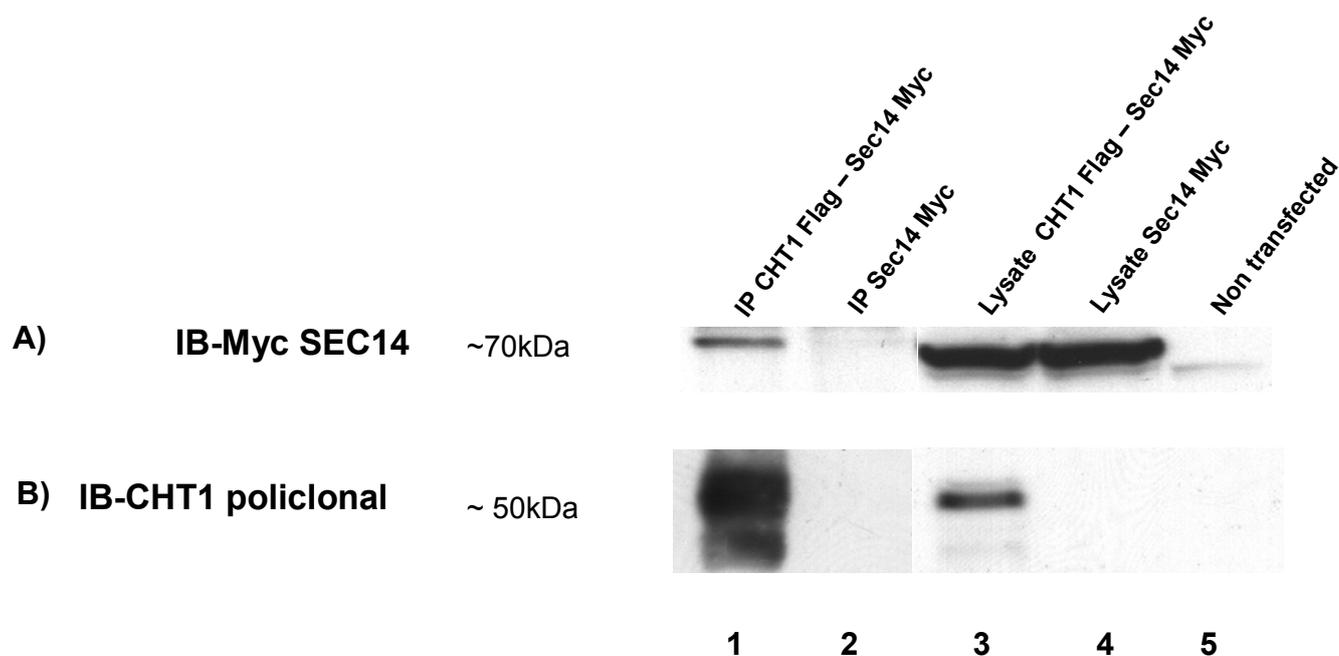


Figura 11: Co-imunoprecipitação CHT1-FLAG x SEC14like-myc (proteína completa) em células HEK 293. Em A) estão representados imunoblots utilizando anticorpos anti-Myc, em B) estão representados imunoblots utilizando anticorpos anti-CHT1 policlonal. Os imunoblots identificados em A) e B) representam a mesma membrana. As canaletas 1 e 2 mostram o resultado da co-imunoprecipitação em células transfectadas com os cDNA's indicados, que foram incubadas com as esferas revestidas com anti-FLAG. As canaletas 3 e 4 mostram o lisado das células transfectadas com os cDNA's indicados. A canaleta 5 mostra o lisado de células HEK 293 não transfectadas. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes.

4.3 – O CHT1-FLAG co-localiza com SEC14/like-myc em células SN56 diferenciadas

Uma vez caracterizada a interação CHT1-FLAG e SEC14/like-myc, nosso próximo objetivo foi determinar se a localização celular do CHT1-FLAG e sua distribuição era modificada em função da superexpressão SEC14/like-myc nas células SN56. Para isso utilizamos células SN56 diferenciadas, que foram transfectadas de forma transiente. As células foram analisadas por microscopia confocal após dois dias de diferenciação em dibutilil –AMPc (Sigma).

Como pode ser observado na Figura 12 A, nas células transfectadas somente com o CHT1-FLAG, o transportador localizava-se predominantemente na região intracelular, em processos e varicosidades, onde se acumulam vesículas tipo sinápticas. No corpo celular a marcação se mostrou pontuada, com um padrão de distribuição sugerindo a presença do transportador em endossomos. Esses experimentos de localização celular indicam que o CHT1 encontra-se predominantemente em organelas intracelulares em células em cultura. Esses resultados corroboram estudos anteriores (Ribeiro *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2003).

A análise das imagens de microscopia confocal de células SN56 que foram transfectadas somente com SEC14/like-myc revelam dois padrões característicos. Em torno de 50% das células analisadas a distribuição de SEC14/like-myc se mostrou bastante homogênea, em um padrão muito pouco pontuado (Figura 12 C), distribuído nas células como um todo. Esse dado de certa forma já era esperado, uma vez que SEC14 é uma proteína solúvel no citoplasma e que se encontra em trânsito contínuo entre membranas. Um outro padrão de distribuição foi observado, onde essa proteína encontra-se concentrada em vesículas grandes, sobretudo próximas à região perinuclear (Figura 12 B).

Quando utilizamos células SN56 co-transfectadas com CHT1-FLAG e SEC14/like-myc, observamos que o padrão de distribuição de SEC14/like-myc

não se mostrou muito alterado, porém a distribuição de CHT1-FLAG se mostrou bastante concentrada no corpo celular (Figura 13 B e 14 B). Observamos também que existe grande co-localização entre as duas proteínas em células fixadas, sugerindo que elas se encontram nos mesmos compartimentos nessas células. Esse dado, juntamente com os dados anteriores sugere fortemente que SEC14*like* interage com CHT1.

A superexpressão de SEC14*like*-myc modificou a localização celular de CHT1-FLAG sugerindo que a interação entre essas proteínas altera ou regula de alguma maneira o tráfego celular do transportador. Isso é de grande importância pois, uma vez que o CHT1 se encontra predominantemente em estruturas localizadas no citoplasma, uma proteína que altera seu padrão de distribuição pode regular seu tráfego e conseqüentemente sua atividade.

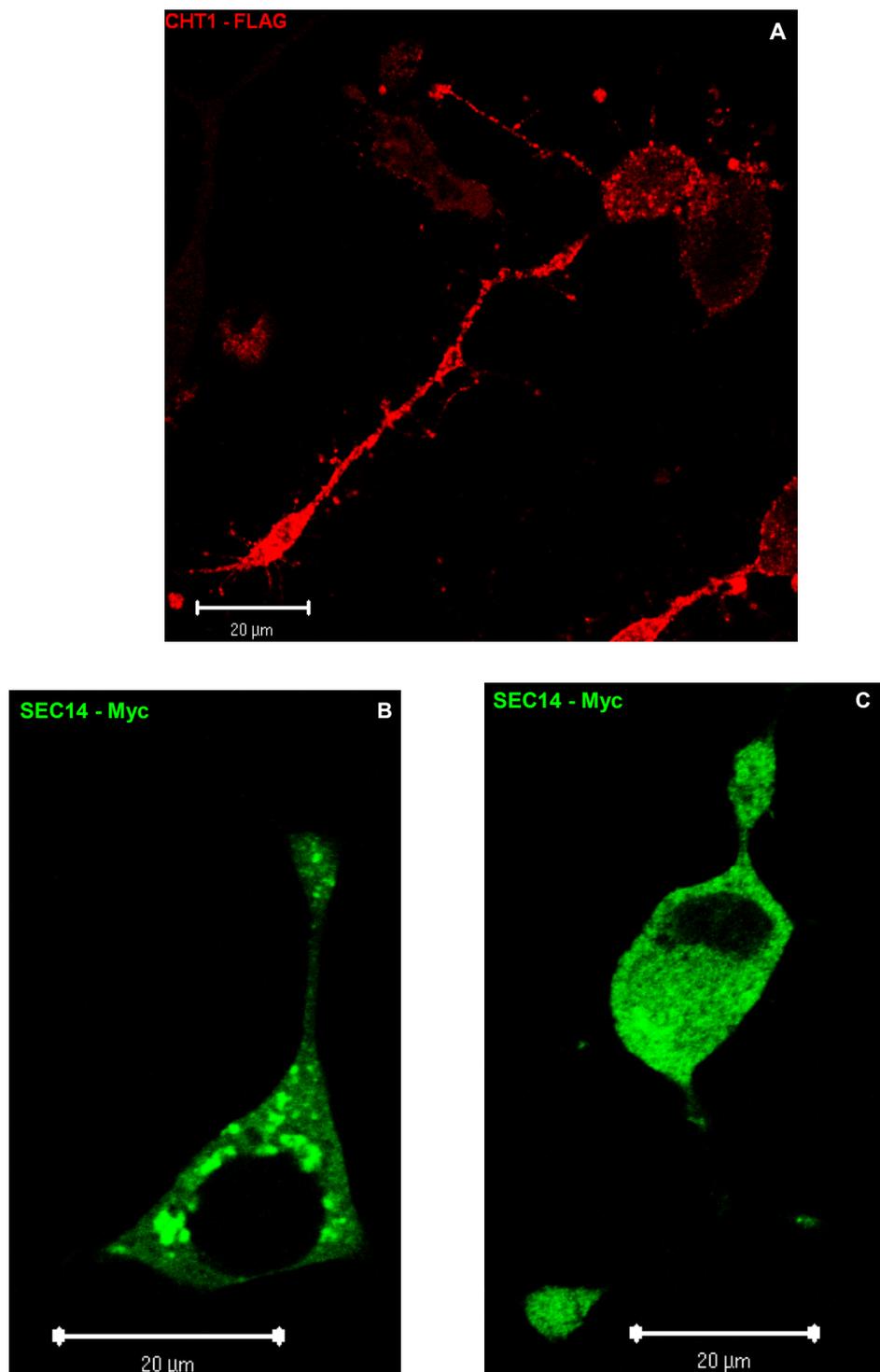


Figura 12: Imagens de imunofluorescência em microscopia confocal em células SN56 diferenciadas, transfectadas isoladamente com CHT1-FLAG e SEC14 *like* – myc. (A) Padrão de distribuição de CHT1-FLAG e em (B) observamos a expressão de SEC14 *like* – myc. (C) Expressão de SEC14 *like* – myc em um padrão mais solúvel, menos pontuado. Imagens representativas de pelo menos 20 células analisadas em cada experimento. Foram realizados 5 experimentos em dias alternados.

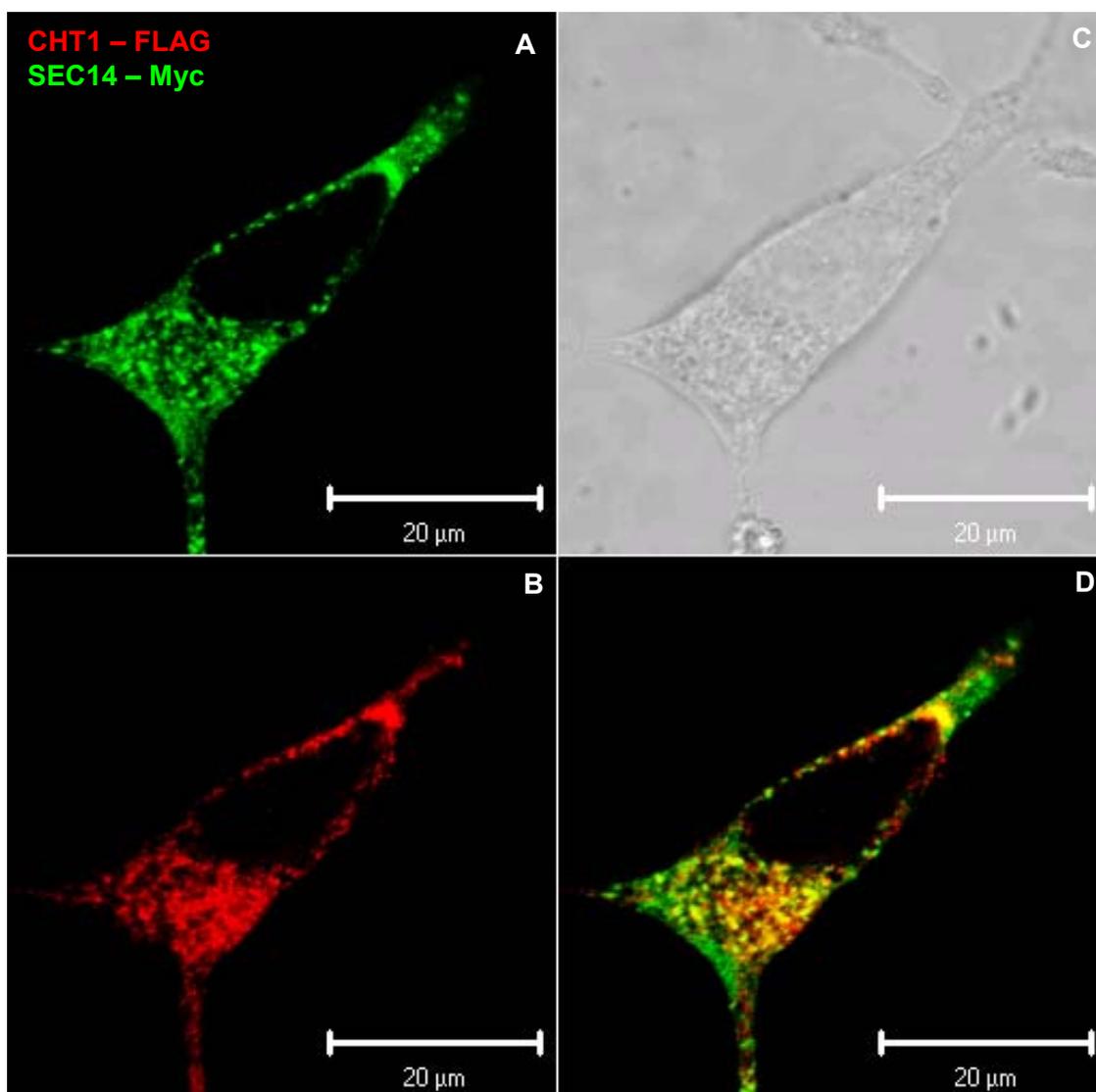


Figura 13: Imagens de imunofluorescência em microscopia confocal em células SN56 diferenciadas, co-transfectadas com CHT1-FLAG e SEC14like-myc. (A) Padrão de distribuição de CHT1-FLAG, em (B) observamos a expressão de SEC14like-myc. Em (C) temos a imagem de luz transmitida da célula em foco e em (D) temos a sobreposição das imagens de (A) e (B). Imagens representativas de pelo menos 20 células analisadas em cada experimento. Foram realizados 5 experimentos em dias alternados.

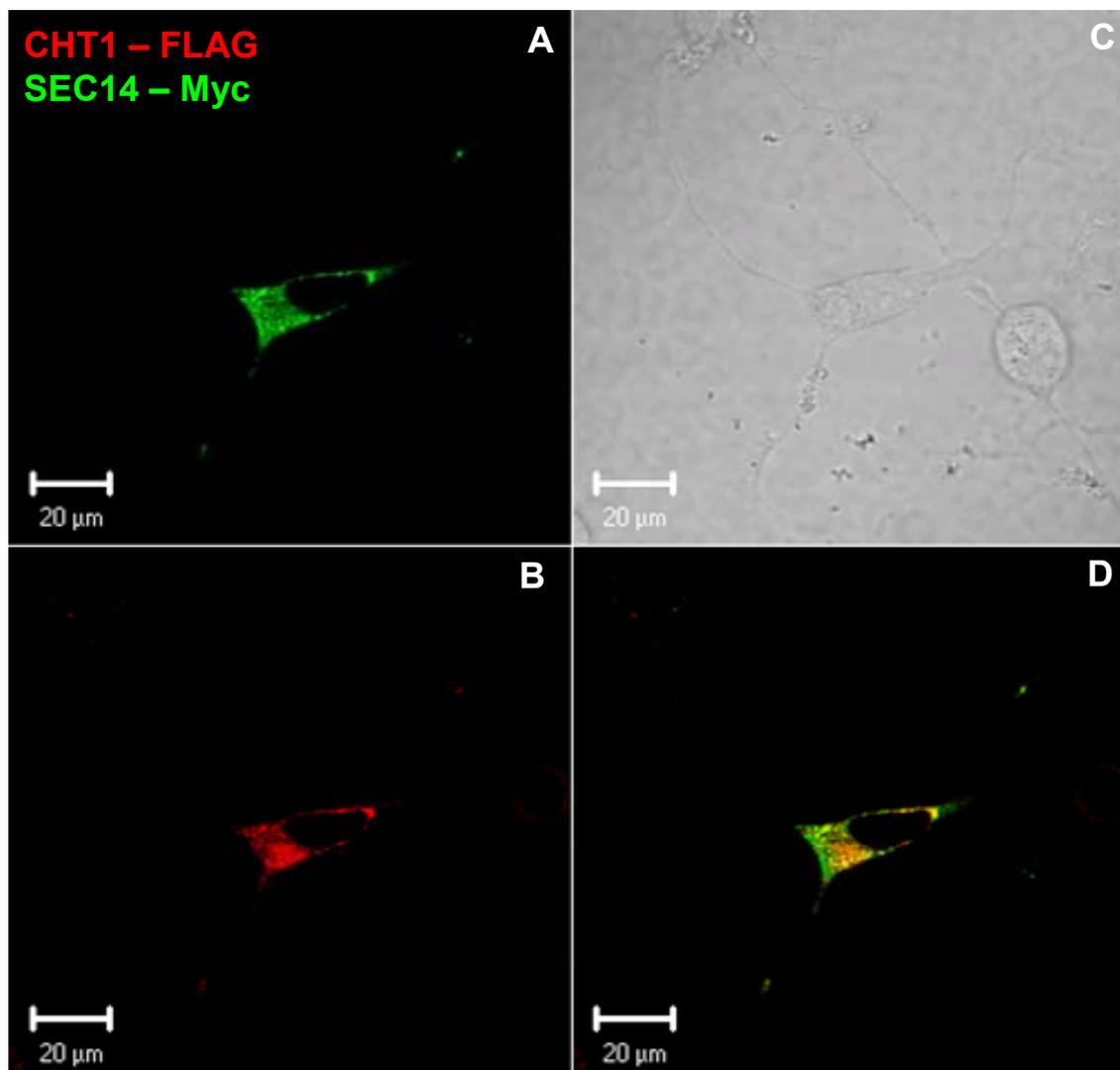


Figura 14: Imagens de imunofluorescência em microscopia confocal em células SN56 diferenciadas, co-transfectadas com CHT1-FLAG e SEC14-like-myc. (A) Padrão de distribuição de CHT1-FLAG, em (B) observamos a expressão de SEC14-like-myc. Em (C) temos a imagem de luz transmitida da célula em foco e em (D) temos a sobreposição das imagens de (A) e (B). A distribuição do CHT1 se concentra sobretudo no corpo celular. Imagens representativas de pelo menos 20 células analisadas em cada experimento. Foram realizados 5 experimentos em dias alternados.

4.4 – O transporte de colina de alta afinidade realizado pelo CHT1-FLAG é alterado pela superexpressão de SEC14/like-myc em células HEK 293

Nossos dados demonstraram que existe interação física entre CHT1-FLAG e SEC14/like-myc e a superexpressão de SEC14/like-myc altera o padrão de distribuição normalmente encontrado para o CHT1 em células SN56. Assim, nosso próximo objetivo foi verificar se essa interação é capaz de alterar a atividade do transportador.

Para estudar os processos de tráfego e regulação do CHT1 nós optamos pela expressão heteróloga das proteínas em uma linhagem celular bem caracterizada, as células HEK 293. Essa linhagem celular não expressa o CHT1, visto que não se trata de uma linhagem celular colinérgica. Isso torna essa cultura celular um sistema interessante para o estudo do transporte de colina realizado pelo CHT1 recombinante. Linhagens celulares com características colinérgicas poderiam expressar o transportador de colina de alta afinidade endógeno, o que dificultaria o teste de funcionalidade do CHT1 expresso heterologicamente.

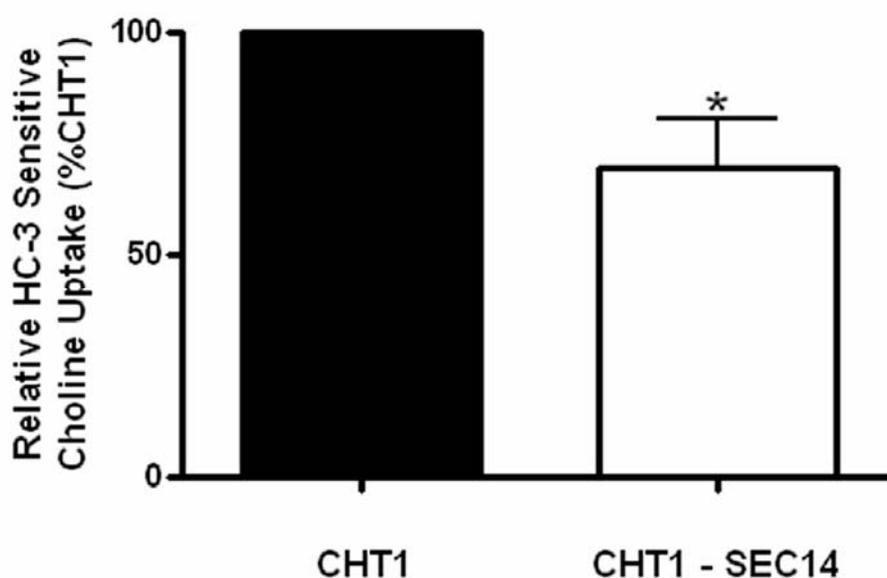
Ribeiro e colaboradores (2003) já haviam demonstrado que células HEK 293 transfectadas transientemente com o cDNA do CHT1 foram capazes de apresentar transporte de colina de alta afinidade, dependente de sódio e sensível a HC-3. Como ocorre com outras células, as células HEK 293 apresentam um sistema de transporte de colina de baixa afinidade. Para analisar especificamente o transporte de colina de alta afinidade, era necessário excluir a parcela realizada pelo transporte de baixa afinidade. Assim, transfectamos as células com CHT1-FLAG ou, como controle, transfectamos as células com o vetor sem o inserto de cDNA que codifica o CHT1. Realizamos o experimento de transporte de colina e verificamos que as células que expressavam CHT1-FLAG, quando na presença de colina e 1 μ M de HC-3, apresentavam a taxa de transporte de colina semelhante às células que não expressavam CHT1-FLAG (dados não mostrados). Subtraindo o transporte de colina na ausência de HC-3

por aquele realizado pelas células na presença de HC-3, analisamos especificamente o transporte de colina de alta afinidade.

A metodologia utilizada para estudar o transporte de colina está descrita em materiais e métodos. Em resumo, as células foram incubadas a 37°C por 10 minutos em meio KREBS contendo colina radioativa. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com meio KREBS gelado para remoção da colina radioativa presente no sobrenadante. As células foram então lisadas utilizando NaOH 0,1 M, e esse lisado foi utilizado para determinação da radioatividade por cintilação líquida. Como sempre ocorre alguma variação no número de células por placa, utilizou-se a dosagem de proteínas para normalizar os resultados obtidos. Dessa forma, os resultados são expressos como dpm/ μ g de proteína, que fornece a estimativa do transporte de colina levando-se em conta o número de células por placa.

Como pode ser observado na Figura 15 A, a captação de colina, expressa em dpm/ μ g de proteína, em células transfectadas com CHT1-FLAG e células co-transfectadas com CHT1- FLAG e SEC14*like*-myc foi estatisticamente diferente ($p < 0,01$). Para essa análise utilizamos o teste *t* de *student's* pareado. As células que co-expressavam CHT1- FLAG e SEC14*like*-myc tiveram uma diminuição em torno de 30% no total de colina captada quando comparadas com as células transfectadas apenas com CHT1-FLAG. Essa diminuição não foi reflexo de uma diminuição da expressão do transportador nas células em questão, uma vez que nas duas condições a expressão do transportador foi semelhante, como podemos verificar na Figura 15 B.

A)



B)

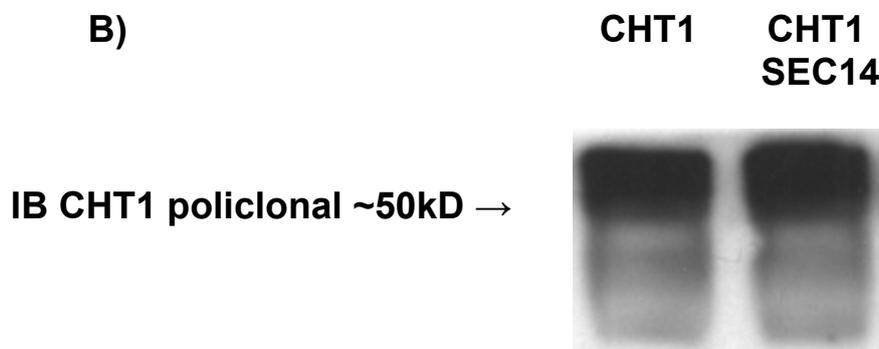


Figura 15: (A) Análise percentual da taxa de transporte de colina de alta afinidade em células HEK 293 que expressavam CHT1-FLAG isoladamente e que co-expressavam CHT1-FLAG e SEC14 $like$ -myc. O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa, utilizando teste t de *student's* pareado, entre as duas condições analisadas ($p < 0,01$). (B) Imunoblot dos lisados das células utilizadas nos experimentos de transporte de colina, transfectadas somente com o cDNA que codifica o CHT1 ou com os cDNA's que codificam CHT1 e SEC14. Utilizamos anticorpo policlonal anti-CHT1 para revelar a membrana de nitrocelulose. A expressão do transportador é bem semelhante nas duas condições de transfecção. Os dados são representativos de 13 experimentos independentes.

5 – Discussão

5.1 – Duplo híbrido em leveduras

A chave para vários processos biológicos reside na interação física entre proteínas. Mecanismos tais como síntese de DNA, ativação transcricional, tradução de proteínas, transdução de sinais, envolvem complexos protéicos. Inúmeras proteínas intracelulares podem estar associadas a receptores ou canais e participam de maneira bem definida da transdução de sinais, em nível de regulação dos mesmos (Browning *et al.*, 1985; Levitan, 1985). Além disso, essas proteínas podem dirigir fisiologicamente etapas subcelulares de sinalização de receptores, corroborando com a plasticidade neuronal (Migaud *et al.*, 1998). Um aspecto de grande relevância no estudo da função de redes moleculares no interior das células reside em elucidar como elas contribuem para a rede neuronal, em nível de circuitos, e como essa rede dirige a plasticidade neuronal.

De maneira geral, supõe-se que proteínas que interagem diretamente entre si possam participar dos mesmos processos celulares. Assim, ao se detectar a interação entre uma proteína de função ainda não estabelecida, e outra de atividade classicamente determinada, pode-se inferir um possível caminho celular no qual a proteína de atividade desconhecida participa (Oliver, 2000).

Inúmeras estratégias baseadas em estudos de proteômica têm sido usadas no intuito de determinar a rede de interações entre as proteínas expressas em uma célula (Causier, 2002). Várias técnicas foram desenvolvidas, desde abordagens bioquímicas como co-imunoprecipitação e cromatografia de afinidade, a ensaios genético-moleculares como o duplo-híbrido em leveduras (*yeast two hybrid system* - YTH).

Em 1989, Fields e Song desenvolveram o ensaio de duplo híbrido em leveduras, um ensaio genético-molecular que detecta interações proteína-proteína *in vivo*. O sistema utiliza o produto do gene *GAL4* de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. *GAL4* é uma proteína com dois domínios funcionais que ativa a transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo da galactose. O domínio N-terminal se liga a regiões específicas do DNA (UAS_G , onde G se refere especificamente ao gene *GAL4*), sendo também

chamado de DNA-BD (DNA *binding domain*), já o domínio C-terminal possui regiões acídicas, necessárias para ativar a transcrição, também chamado de DNA-AD (DNA *activation domain*). UAS (*upstream activating sequences*) são regiões reconhecidas por ativadores de transcrição específicos, capazes de aumentar a transcrição de genes adjacentes.

O domínio N-terminal se liga ao DNA de maneira específica, mas isoladamente não é capaz de ativar a transcrição. O C-terminal possui regiões ativadoras, mas sem o domínio de ligação ao DNA é incapaz de ativar a transcrição porque ele falha em localizar a região UAS. Esses dois domínios não necessariamente devem estar presentes no mesmo polipeptídeo para formar um fator de transcrição ativo, mas precisam estar na vizinhança ou em proximidade um do outro. Uma interação não covalente é capaz de levar à expressão do gene repórter regulado por estes sítios de ligação (Fields, 1993). A Figura 16 mostra um esquema representativo do sistema acima descrito.

Embora inicialmente desenvolvido para detectar interações físicas entre duas proteínas conhecidas, o duplo híbrido em leveduras rapidamente se tornou um sistema amplamente utilizado em *screenings* para avaliar interações proteína-proteína através do uso de bibliotecas de cDNA's de determinado tecido ou órgão, e uma proteína conhecida. As proteínas da biblioteca são denominadas de "presa" nesse sistema, enquanto a proteína em estudo é chamada de "isca".

O uso do duplo híbrido em leveduras para rastrear uma biblioteca de cDNA resulta numa detecção imediata de inúmeros genes para proteínas que interagem com a proteína alvo, assim como a determinação dos domínios dessas proteínas envolvidos na interação (Fields, 1993).

Em muitos sistemas comerciais disponíveis, a expressão das proteínas híbridas é alcançada através do uso de um promotor constitutivo, presente no gene *ADH1* de leveduras. O promotor *ADH1* permite um alto nível de expressão de seqüências (proteínas híbridas inseridas nos vetores) que estão sob o seu controle. A localização nuclear é direcionada através de seqüências internas no domínio de ligação da proteína híbrida ou por uma seqüência SV40 (*Simian Virus 40*), ligada ao N-terminal do domínio de ativação da proteína híbrida (McAlister-Henn, 1999).

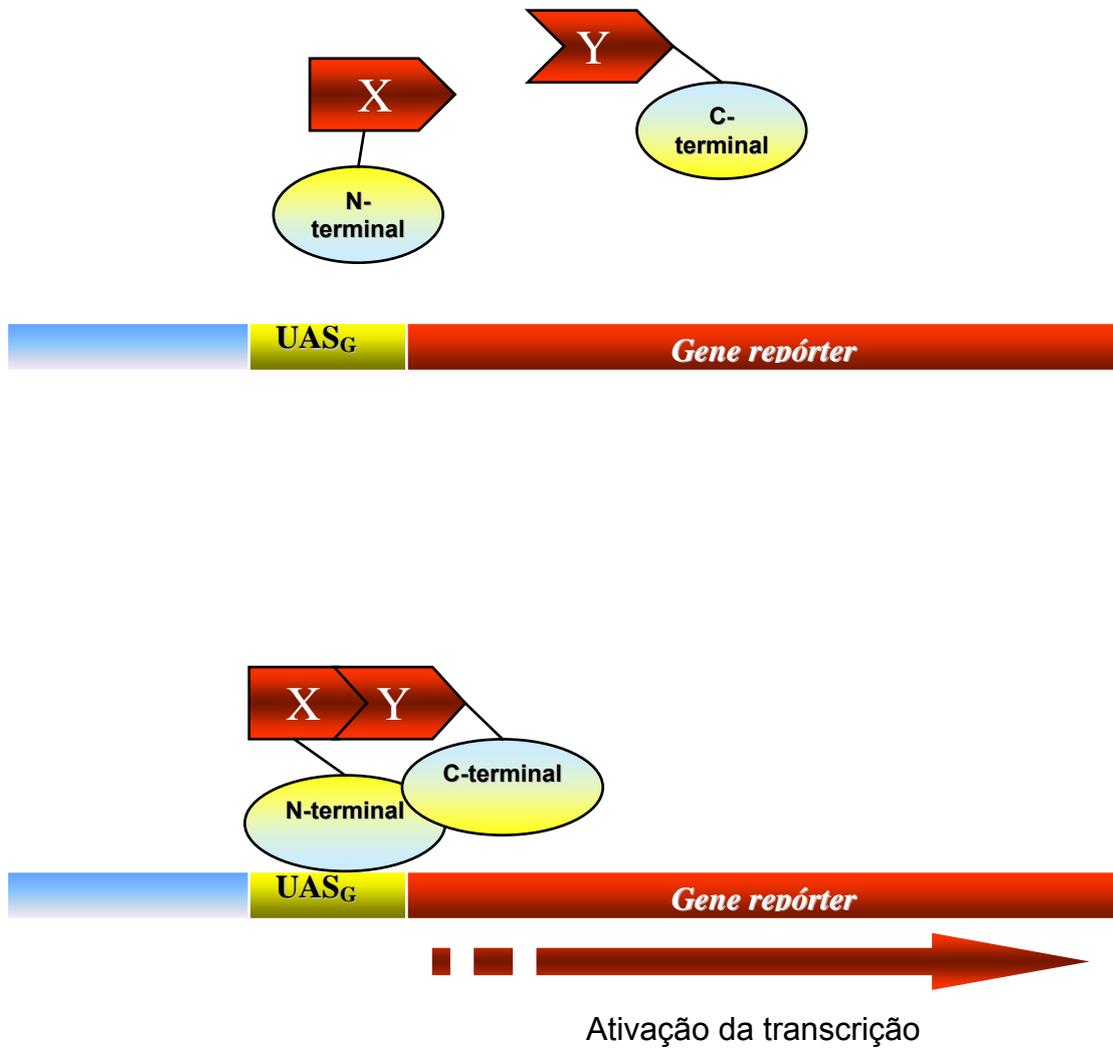


Figura 16: Esquema do sistema de duplo híbrido em leveduras criado por Fields e Song em 1989. X representa uma proteína híbrida em fusão com o domínio N-terminal de GAL4 e Y representa outra proteína híbrida em fusão com o domínio C-terminal de GAL4.

O sistema de duplo híbrido em leveduras empregado nos nossos experimentos utiliza como genes repórteres *ADE2* e *HIS3*, cujos produtos de ativação levam à expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de adenina e histidina. Dessa forma, o crescimento da levedura em meios restritivos para esses nutrientes indica interação positiva. O gene repórter *HIS3* é considerado um gene repórter fraco, ou seja, ele apresenta certo nível de expressão constitutiva. Para suprimir este contraponto é comum adicionar a substância 3-aminotriazol (3-AT), um análogo da histidina, inibidor do produto de ativação do gene *HIS3*, imidazolglicerol-fosfato desidratase, para que seja reduzido o crescimento *background* durante o ensaio.

5.2 – Considerações sobre o duplo híbrido em leveduras

Embora o sistema do duplo híbrido seja um método eficiente para a análise de interação proteína-proteína, existem algumas limitações que devem ser avaliadas: como o sistema é baseado na ativação da transcrição, o gene da proteína a ser estudada não pode apresentar uma atividade transcricional intrínseca ; algumas proteínas quando em fusão com o domínio de ligação ao DNA de GAL4, podem apresentar certa toxicidade para a levedura hospedeira, possivelmente devido a um alto nível de expressão; o ensaio requer que a interação proteína-proteína ocorra no núcleo da levedura, para isso, os vetores devem ser direcionados eficientemente para o núcleo da mesma; uma causa potencial de resultados falso-negativos é que a levedura pode não promover as modificações pós-traducionais necessárias (como glicosilação) requeridas para que a proteína assuma sua conformação nativa ou mesmo por assumir uma conformação terciária diferente, quando expressas em fusão com os domínios do fator de transcrição (Coates & Hall, 2003). Tendo em vista os argumentos acima relatados, é necessário que abordagens alternativas sejam usadas para complementar o sistema de duplo-híbrido onde ele tem falhado na detecção de tais interações (Aronheim, 2000).

5.3 – CHT1 e o sistema colinérgico

A regulação da atividade do sistema colinérgico está diretamente relacionada à regulação da atividade do CHT1, uma vez que o transporte de colina é a etapa limitante da síntese de acetilcolina. Além disso, vários estudos indicam que regulação da atividade do CHT1 está diretamente associada à atividade neuronal (Simon & Kuhar, 1975; Kuhar & Murrin, 1978; Saltarelli *et al.*, 1987). A regulação da recaptação de colina é modulada pelo influxo de íons cálcio, o que demonstra uma semelhança com a exocitose de vesículas sinápticas (Saltarelli *et al.*, 1987).

As vias de regulação da transmissão colinérgica são múltiplas. Camundongos heterozigotos para mutações no gene *CHAT* demonstraram um aumento no transporte de colina, assim como nos níveis protéicos de CHT1 em 50-100%, compensando a atividade diminuída da enzima e mantendo os níveis basais de ACh (Brandon *et al.*, 2004).

O CHT1 é essencial para a vida como demonstrado por Ferguson e colaboradores em 2004, utilizando animais nocaute para o transportador. Esses animais morriam uma hora após o nascimento, porém os animais heterozigotos apresentavam uma taxa de transporte de colina semelhante aos animais selvagens, demonstrando o quão importante é a regulação da atividade do CHT1. O *pool* intracelular de CHT1 teve importante participação, mostrando que a regulação do tráfego celular também influi na atividade colinérgica.

Mutações pontuais no transportador também afetam a atividade do mesmo, de maneiras diferentes. Mutações em um motivo dileucina bem conservado na região C-terminal do CHT1 alteram a internalização e atividade do transportador significativamente, com um aumento em cerca de duas vezes da taxa de transporte de colina (Ribeiro *et al.*, 2005). Já Okuda e colaboradores (2002) demonstraram que uma mutação pontual no terceiro domínio transmembrânico do CHT1 é responsável por uma diminuição na captação de colina em 40-50%. Essas mutações alteram diferentemente a atividade do CHT1 e podem ser capazes de modificar significativamente a transmissão colinérgica.

Todos esses dados nos mostram o quão importante é o estudo da regulação do tráfego celular do transportador e da sua atividade. Com base nisso, procuramos identificar através do sistema de duplo híbrido em leveduras, proteínas presentes no cérebro de humanos que poderiam interagir com o CHT1.

5.4 – Análise das interações observadas no duplo híbrido em leveduras

Nos experimentos que realizamos, observamos a interação do CHT1 com as proteínas MAP1A, BRI3, SEC14*like* e Flotilina1. Existem vários trabalhos sugerindo a participação de BRI3, MAP1A e Flotilina1 em doenças neurodegenerativas:

- Na doença de Alzheimer as alterações bioquímicas e protéicas supostamente relacionadas com a patogênese da doença, envolvem modificações no citoesqueleto via interação da proteína tau anormal com MAP1A (Alonso *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997).

- A enzima conversora da proteína β -amilóide (BACE1), também associada à doença de Alzheimer interage com BRI3 (Wickham *et al.*, 2004). Uma mutação pontual no códon de parada da proteína BRI2 resulta na formação de um peptídeo amiloidogênico, responsável por um tipo de demência no Reino Unido (Vidal *et al.*, 1999).

- A distribuição de Flotilina1 no hipocampo, amígdala e córtex do cérebro de pacientes com doença de Alzheimer demonstrou um padrão de acúmulo em neurônios que continham aglomerados neurofibrilares (Girardot *et al.*, 2003). Flotilina1 parece ter um papel importante também em neuropatias associadas à proteína prion (Pimpinelli *et al.*, 2005).

Nas condições experimentais que utilizamos, CHT1 não interagiu com Niscarina nem com Rab14.

Niscarina é uma proteína que está envolvida na organização do citoesqueleto e na migração celular. Ela interage com integrinas e sua superexpressão em fibroblastos leva a mudanças na organização do citoesqueleto e uma grande inibição da migração celular (Alahari *et al.*, 2000).

As glicoproteínas de superfície celular da família das integrinas possuem um papel importante na interação das células com a matriz extracelular. As integrinas podem influenciar o comportamento celular através da interação de seus domínios citoplasmáticos com proteínas intracelulares regulando a adesão, forma e motilidade celular (Liu *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual Niscarina regula o tráfego celular envolve a interação e inibição da quinase ativada por p21 (PAK1), controlando dessa maneira uma cadeia de eventos envolvidos em transdução de sinais, como por exemplo a atividade da proteína Rac1 que regula a motilidade celular via interação com PAK1 (Reddig *et al.*, 2005). A inibição de PAK1 através da interação com Niscarina está diretamente correlacionada com a inibição da migração celular (Alahari *et al.*, 2004).

Em mamíferos Rab14 está presente em diversos tecidos, o que sugere que essa proteína está envolvida em um evento de tráfego de membranas comum a vários tipos celulares. No cérebro, coração, rins, pulmões e placenta, são encontrados altos níveis de expressão de Rab14. A análise em estudos de microscopia revelou sua presença em compartimentos biossintéticos (retículo endoplasmático, Golgi e TGN) e endossomais (Junutula *et al.*, 2004). Além disso, estudos de imunolocalização de Rab14 em células NRK (*Normal Rat Kidney*) mostraram que essa proteína colocaliza-se com o receptor de transferrina – TfR, um marcador de endossomos primários e de reciclagem. Isso nos sugere que Rab14 provavelmente regula o transporte de membranas entre esses compartimentos.

Em resumo, diversas evidências sugerem que Rab14 e Niscarina têm um papel importante no tráfego celular. É possível que essas proteínas sejam importantes para o tráfego do VACHT, uma vez que nós observamos a interação VACHT-Rab14 e VACHT-Niscarina no duplo híbrido em leveduras.

Experimentos adicionais serão necessários para confirmar essas interações e para avaliar seu papel funcional. Entretanto, usando o sistema do duplo híbrido nós não conseguimos detectar interações entre Rab14 ou Niscarina com CHT1, sugerindo que essas proteínas não participam do tráfego de CHT1. Apesar do CHT1 e o VACHT se co-localizarem em organelas intracelulares e possuírem motivos protéicos semelhantes (endossomos, vesículas sinápticas) (Ribeiro *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005), esses transportadores exercem suas funções em compartimentos diferentes. Portanto, acredita-se que algumas etapas do tráfego/reciclagem desses dois transportadores, como por exemplo, a endocitose seja regulada diferentemente. De fato, os resultados do duplo híbrido mostram que nem todas as proteínas que interagem com o VACHT interagem também com o CHT1.

5.4.1 – Interação CHT1 x MAP1A

A polimerização, estabilização, assim como as propriedades dinâmicas dos microtúbulos são influenciadas por interações com proteínas MAP (*Microtubule Associated Proteins*) (Iqbal *et al.*, 2005). MAP1A e MAP1B são complexos protéicos multiméricos, consituídos de uma cadeia pesada e várias cadeias leves (LC2 e LC1 respectivamente). Em cada tipo de MAP, a cadeia pesada e uma das cadeias leves são geradas pela clivagem proteolítica do respectivo precursor. LC1 e LC2 possuem a capacidade de se ligar à cadeia pesada tanto de MAP1A como de MAP1B. Além disso as cadeias leves são responsáveis pela ligação a microfilamentos de actina e microtúbulos, permitindo aumento da polimerização de microtúbulos (Noiges *et al.*, 2002).

No cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, existe uma hiperfosforilação anormal da proteína tau (que também participa da formação e estabilização de microtúbulos, sendo sua atividade regulada pelo grau de fosforilação), que resulta na formação de aglomerados neurofibrilares, característicos dessa enfermidade (Iqbal *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1991). A proteína tau anormal, hiperfosforilada, não interage com microtúbulos/tubulina e,

além disso, seqüestra tau normal, assim como MAP1A, MAP1B e MAP2, causando inibição e desestruturação dos microtúbulos *in vitro* (Alonso *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997).

No cérebro de adultos, MAP1A está presente em dendritos, incluindo dendritos das células de Purkinje e neurônios piramidais do hipocampo e córtex. Os níveis de MAP1A aumentam no cérebro após a segunda semana de nascimento, quando informações aferentes são estabelecidas, dendritos são ramificados e alongados e as sinapses são formadas. Em contraste, ocorre um declínio de MAP1B após o nascimento, sendo encontrada principalmente em axônios (Szebenyi *et al.*, 2005).

Em 2001 Orzech e colaboradores identificaram interação entre MAP1A e a proteína adaptadora AP1, que está associada com a formação de vesículas envolvidas no transporte exocítico a partir do TGN. É possível que o controle do tráfego de vesículas no citoplasma envolva a participação da proteína AP1, via interação direta com MAP1A, através de um caminho “microtubular”, direcionado por MAP1A.

Em nossos experimentos verificamos que a porção C-terminal do CHT1 interagiu com a cadeia leve de MAP1A no duplo híbrido em leveduras. Essa interação pode ser de importância uma vez que MAP1A tem um papel importante na reorganização do citoesqueleto celular. É possível que MAP1A tenha alguma participação no tráfego celular do CHT1, porém, é necessário um estudo mais aprofundado para confirmar essa interação e conseqüentemente a relevância da mesma.

5.4.2 – Interação CHT1 x BRI3

Em 2004, Wickham e colaboradores demonstraram que BRI3 interage com a enzima conversora da proteína β -amilóide (BACE1). Na doença de Alzheimer a base biológica relacionada à vulnerabilidade do cérebro ao peptídeo amilóide ainda não é bem compreendida, embora se acredite que altos níveis da proteína precursora amilóide (APP) assim como níveis de expressão maiores e

maior atividade da enzima BACE1, pró-amiloidogênica, tenham um papel crucial na susceptibilidade do sistema nervoso central à doença (Yang *et al.*, 2003).

No sistema nervoso central os peptídeos amilóides são gerados por clivagens seqüenciais proteolíticas da APP por duas enzimas ligadas à membrana: BACE1 cliva APP gerando o fragmento C-terminal APP β - (APP β -CTFs) (Hussain *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). A clivagem de APP β -CTFs pela γ -secretase leva à produção de peptídeos A β (Takasugi *et al.*, 2003).

A análise funcional da seqüência das proteínas BRI revelou um domínio funcional denominado BRICHOS de aproximadamente 100 aminoácidos, que é encontrado em uma grande variedade de proteínas envolvidas em demência, alterações respiratórias e câncer (Sanchez-Pulido *et al.*, 2002). Em BRI3, o domínio BRICHOS se encontra entre os resíduos de aminoácidos 136-231 (Vidal *et al.*, 2001), uma região que estaria na região ancorada à membrana e que interage com BACE1.

Ainda não sabemos se a interação CHT1-BRI3 observada no duplo híbrido em leveduras possui alguma relevância funcional. É necessário que a interação detectada no duplo híbrido em leveduras seja confirmada utilizando outras metodologias para que possamos avaliar mais concretamente a importância da mesma. A análise dessa interação é interessante uma vez que BRI3 pode estar associada à doença de Alzheimer.

5.4.3 – Interação CHT1 x Flotilina1

Em células endoteliais, caveolae medeiam a translocação de macromoléculas entre o lúmen vascular e o espaço sub-endotelial, assim caveolae contêm proteínas que estão envolvidas no tráfego vesicular (Bickel, 2002). Caveolae podem ser considerados como sítios onde pequenas moléculas são concentradas, através da ligação a glicosilfosfatidilinositóis (GPI) ligados a receptores e atravessam a membrana plasmática em direção ao citosol.

Caveolae também podem participar da retransmissão de sinais extracelulares para o citosol através da organização de moléculas envolvidas na transdução de sinais (Bickel *et al.*, 1997).

A associação de lípidos da membrana plasmática forma microdomínios denominados *lipid rafts*. Esses domínios são regiões ricas em colesterol, fosfolípidos e glicosíngolípidos, que são pouco solubilizados em detergentes não iônicos, uma propriedade resultante da alta organização das cadeias lipídicas nesses locais. Caveolae foram originalmente identificados em *lipid rafts* (Pike, 2004). Uma grande variedade de proteínas incluindo caveolina, proteínas ancoradas por GPI, e várias proteínas envolvidas em sinalização celular foram encontradas associadas a esses microdomínios. A identificação dessas proteínas em *lipid rafts*, levou à hipótese de que essa região está intimamente envolvida em processos de transdução de sinais, além de eventos endocíticos, assim como tráfego de colesterol (Parton & Richards, 2003).

A glia e os neurônios são enriquecidos em *rafts* e a proteína flotilina é um marcador desses *rafts* no cérebro, que colocaliza com lípidos saturados. Flotilina 1 e 2 são proteínas ubíquas ligadas a vários eventos celulares. A distribuição celular dessas proteínas parece depender do tipo celular e da diferenciação da célula em questão (Liu *et al.*, 2005): em células de linfoma elas estão presentes em organelas intracelulares que lembram lisossomos; em macrófagos, Flotilina1 está presente em fagossomos; em linhagens celulares derivadas de rim de hamster, está localizada na superfície celular.

Baumann e colaboradores (2000) demonstraram que Flotilina1 está envolvida na translocação do transportador de glicose (GLUT4) em resposta à insulina, via recrutamento de proteínas Cbl fosforiladas e proteínas associadas a Cbl (CAP) para os microdomínios de *rafts*.

Depósitos de agregados protéicos caracterizam várias doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Huntington e doenças associadas à proteína prion PrP^{Sc}. As isoformas de prion estão associadas a *lipid rafts*. Ao infectar células GT1-7 (uma linhagem celular derivada do sistema nervoso central) com a proteína prion normal (PrP^C) e a proteína prion alterada (*scrapie*, PrP^{Sc}), Pimpinelli e colaboradores (2005) demonstraram que PrP^{Sc} colocaliza com Flotilina1 e LAMP1 (um marcador de

endossomos tardios) em células GT1-7. Isso sugere que a proteína prion patológica está presente nesses locais. Já a PrP^c não colocaliza com Flotilina1 em GT1-7. Esses dados indicam que Flotilina1 pode ter um papel importante na distribuição de PrP^{Sc}.

Girardot e colaboradores (2003) analisaram a distribuição de Flotilina1 no hipocampo, amígdala e córtex do cérebro de pacientes com doença de Alzheimer. Eles observaram que Flotilina1 se acumulava em neurônios que continham aglomerados neurofibrilares, porém não houve colocalização com a proteína tau, indicando que tau não está em contato direto com Flotilina1. É possível que Flotilina1 esteja presente em compartimentos onde se encontram agregados protéicos e que tenha alguma participação em desordens neurodegenerativas (Pimpinelli *et al.*, 2005).

No tocante ao CHT1, estudos de microscopia confocal utilizando células que co-expressam CHT1 e Flotilina1 podem indicar se o CHT1 se encontra em rafts e se Flotilina tem algum papel na localização celular do transportador. Como rafts são domínios que parecem estar envolvidos na transdução de sinais (Parton & Richards, 2003), a presença do CHT1 nesses compartimentos pode indicar possível local onde o tráfego do transportador pode ser modulado.

5.4.4 – Interação CHT1 x SEC14like

SEC14 é uma proteína solúvel que, em leveduras, possui atividade de transferência de fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilcolina (PC). Ela modifica o metabolismo lipídico e afeta o transporte vesicular. Acredita-se que SEC14 controle o transporte vesicular a partir do TGN através de alterações do ambiente lipídico local. Aparentemente, a regulação do metabolismo lipídico local promove o recrutamento de proteínas essenciais para a formação de vesículas. Além disso, alterando as propriedades físicas dos lípidos, é possível que a formação e a fusão de vesículas sejam aceleradas em função de alterações energeticamente favoráveis na estrutura da membrana (Wong *et al.*, 2005).

Proteínas que transferem fosfatidilinositol (PITP) são proteínas ubíquas e que transportam fosfatidilinositol (PI) ou fosfatidilcolina (PC) entre membranas e participam do metabolismo celular de fosfolípidos durante a transdução de sinais e tráfego de vesículas (Hsuan *et al.*, 2001). Deleções no gene *SEC14* ou alterações funcionais em seu transcrito inibem o transporte protéico mediado pelo Golgi, o que resulta em morte celular (Phillips *et al.*, 1999).

De fato Fernandez Murray e McMaster (2005) demonstraram que *SEC14* regula a taxa de síntese e degradação de PC. *SEC14* age como regulador positivo de Nte1, uma fosfolipase presente na membrana do retículo endoplasmático, que degrada PC produzindo glicerofosfocolina e ácidos graxos livres.

Quando ligada a PC, *SEC14* regula sua biossíntese, através da inibição da atividade da enzima CCT (CTP-fosfocolina-citidil-transferase, uma enzima limitante na biossíntese de PC, envolvida na via CDP-colina), prevenindo a utilização de diacilglicerol pelo complexo de Golgi (Cockcroft, 1998). Em leveduras existe outra via que leva à formação de PC através da metilação de fosfatidiletanolamina, formando PC. Quando ligada a PI, *SEC14* promove a síntese de fosfoinosítídeos, diminuindo a produção de DAG (Litvak *et al.*, 2005).

Procuramos caracterizar estruturalmente *SEC14like* através da análise da sua seqüência primária de aminoácidos, utilizando como ferramenta o programa PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>). Verificamos que a proteína apresenta três domínios de importância: PRELI_MS1, CRAL_TRIO e GOLD. A seqüência primária de aminoácidos de *SEC14like* assim como o esquema dos domínios em questão estão apresentados na Figura 17.

O domínio PRELI_MS1 é um módulo protéico encontrado em proteínas eucarióticas que está presente em várias proteínas, entre elas PRELI humana e MS1 de levedura, assim como o domínio N-terminal da proteína humana *SEC14like*. O domínio PRELI_MS1 tem aproximadamente 170 aminoácidos e sugere-se que tenha alguma função associada a ligação à membrana plasmática (Anantharaman & Aravind, 2002).

CRAL_TRIO é um domínio estruturalmente conservado de aproximadamente 170 aminoácidos, 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 uma família de proteínas ligadoras de regiões hidrofóbicas, incluindo SEC14 e as proteínas que têm a capacidade de ligar a α -tocoferol. O domínio CRAL_TRIO pode constituir uma proteína inteira ou ser apenas uma região da mesma. Sua função ainda não foi claramente determinada, embora se acredite estar envolvida no direcionamento e tráfego de proteínas mitocondriais, assim como estruturação e remodelamento de actina, necessários para a migração e crescimento celular. Esse domínio é encontrado em inúmeras proteínas eucariotas (Sha *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2000).

O domínio GOLD (*Golgi dynamics*) representa uma região encontrada em várias proteínas do complexo de Golgi de eucariotos e proteínas envolvidas no tráfego de lípidos. Geralmente possui de 90 a 150 aminoácidos. Esse domínio também pode se encontrar associado ao domínio RUN, que parece ter papel importante na interação de várias proteínas com o citoesqueleto. Acredita-se que GOLD tenha a função de mediar diversas interações proteína-proteína (Aravind *et al.*, 2002).

Os três domínios encontrados na estrutura primária de SEC14*like*, reforçam a hipótese dessa proteína atuar como uma proteína adaptadora, com a possibilidade de interagir diretamente com outras proteínas e também com diferentes lípidos das membranas celulares.

Para confirmar se a interação CHT1-SEC14*like* detectada no sistema de duplo híbrido em leveduras ocorre também em células de mamíferos, realizamos experimentos de co-immunoprecipitação. Nossos resultados mostram que SEC14*like* e CHT1 interagem em células HEK 293.

Analisando a Figura 17 podemos verificar que o fragmento da proteína SEC14*like* utilizado no duplo híbrido em leveduras (C-terminal), é parte da constituição do domínio GOLD. Como GOLD tem a capacidade de mediar interações proteína-proteína, podemos inferir que a interação CHT1-SEC14*like* ocorra via esse domínio.



MVQKYQSPVRVYKYPFELIMAAYERRFPTCPLIPMFVGS
SDTVNEFKSE DGAIHVIERRCKLDVDAPRLLKKIAGVD
YVYFVQKNSLNSRERTLHIEAYNETFSNRVIINEHCY T
VHPENEDWTCFEQSASLDIKSFFGFESTVEKIAMKQYT
SNIKKGKEIIEYYLRQLEEEGITFVPRWSPPSITPSSET
SSSSSKKQAASMAVVIPEAALKEGLSGDALSSPSAPE
PVVGTPDDKLDADYIKRYLGDLTPLQESCLIRLRQWLQ
ETHK GKIPKDEHILRFLRARDLNIDKAREIMCQSLTWR
KQH QVDYILETWT**PPQVLQDYYAGGWHHHDKDGRPLY**
VLRLGQMDTKGLVRALGEEALLRYVLSINEEGLRRCE
ENTKVFGRPISSWTRLVDLEGLNMRHLWRPGVKALLR
IIEVVEANYPETLGRLLILRAPRVFPVLWTLVSPFIDDN
TRRKFLIYAGNDYQGGPGLLDYIDKEIIPDFLSGECMC
EVPEGGLVPKSLYRTAEEL ENEDLKLWTETIHQSASVF
KGAPHEILIQIVDASSVITWDFDVCKGDIVFNIYHSKRS
PQPPKKDSLGAHSITSPGGNNVQLIDK V W Q L G R D Y S M
VESPLICKEGESVQGSHVTRWPGFYILQWKFHSM PAC
AASSLPRVDDVLASLQVSSHKCKVMYYTEVIGSEDFR
GSMTSLESSHSGFSQLSAATTSSSQSHSSSMISR

Figura 17: Estrutura primária de SEC14like. Os domínios protéicos PRELI_MS F1, CRAL_TRIO e GOLD estão identificados em azul, verde e vermelho, respectivamente. Os aminoácidos sublinhados representam o fragmento protéico (C-terminal) utilizado dos ensaios de duplo híbrido em leveduras.

5.5 – A distribuição do CHT1 é modificada pela superexpressão de SEC14/like em células SN56

Para avaliarmos se a distribuição celular do CHT1 é alterada pela superexpressão de SEC14/like, realizamos estudos de microscopia confocal e imunofluorescência em células SN56, que é um modelo celular neuronal colinérgico. A análise desses dados revelou que o CHT1, quando transfectado sozinho em células SN56 diferenciadas, apresentava-se bastante pontuado e localizava-se predominantemente na região intracelular em processos e varicosidades, onde se acumulam vesículas tipo sinápticas. Em células que co-expressavam ambas as proteínas verificamos que houve uma modificação no padrão geral de distribuição do CHT1. Observamos que o transportador se concentrava em vesículas maiores, sobretudo na região perinuclear. Havia grande co-localização entre CHT1 e SEC14/like, sugerindo que elas se encontram nos mesmos compartimentos nessas células.

Portanto, a superexpressão de SEC14/like-myc modificou a localização celular de CHT1-FLAG. É possível que a interação resulte em uma modificação no tráfego celular do CHT1 por duas vias:

- A superexpressão de SEC14/like, pode resultar em uma alteração na rota de tráfego do CHT1. Como SEC14/like é uma proteína envolvida no tráfego protéico, sua superexpressão pode direcionar o CHT1 equivocadamente para outras vesículas citoplasmáticas, atrasando a sua chegada e direcionamento para a membrana plasmática.

- Outra explicação seria algum tipo de impedimento estérico, ou seja, a interação CHT1- SEC14/like (quando superexpressa) pode impedir ou dificultar a interação do transportador com outras proteínas envolvidas no tráfego. Dessa forma haveria uma modificação no trajeto normalmente utilizado, direcionando-o para outras estruturas que não as classicamente utilizadas.

Nossos dados demonstram que existe uma interação entre CHT1 e SEC14 e sugerem que SEC14*like* tem participação no tráfego celular do CHT1. Como esse tráfego é altamente dinâmico e complexo, a elucidação de toda maquinaria protéica recrutada é essencial para entender como a célula consegue regular esse processo, especialmente no caso do CHT1, que possui inúmeras vias de regulação.

5.6 – SEC14*like* quando superexpressa diminui a atividade do CHT1 em 30%

A modulação da atividade de transportadores através da interação com outras proteínas é um tema recorrente e de grande importância. Por exemplo, o transportador de creatina CRT, membro do grupo de transportadores dependente de sódio e cloreto (assim como o CHT1), é responsável pelo transporte de creatina para o interior da célula. A inibição farmacológica da glicosilação do CRT por tunicamicina faz com que haja diminuição de 49% da atividade do transportador (Straumann et al., 2006). Além disso ocorre diminuição da expressão do transportador não glicosilado na membrana plasmática.

Em nossos experimentos, procuramos avaliar a relevância funcional da interação CHT1-SEC14*like*. Para isso utilizamos o ensaio de transporte de colina em células HEK 293. Observamos que houve uma diminuição no transporte de colina em torno de 30% quando havia superexpressão de SEC14*like* em comparação com a atividade do transportador quando transfectado isoladamente. Esses dados somados às evidências de que a superexpressão de SEC14*like* em células SN56 modificam a distribuição do transportador, indicam que o CHT1 permanece por mais tempo no interior da célula. Experimentos adicionais como biotinylação de membrana plasmática, são necessários para

demonstrar a real proporção entre o CHT1 presente na membrana plasmática e aqueles que permanecem no interior celular.

A partir da análise desses dados podemos afirmar que essa interação é importante para a elucidação de mais uma possível via de regulação da atividade do CHT1 e da própria transmissão colinérgica. A contribuição do nosso trabalho para o sistema colinérgico é apenas um pequeno passo para identificar a maquinaria citoplasmática envolvida em toda sua dinâmica.

6 – Conclusões

Em nosso estudo utilizando o sistema de duplo híbrido em leveduras, tendo como “isca” o transportador de colina de alta afinidade – CHT1, verificamos os seguintes resultados:

↳ Interação positiva entre o CHT1 e as seguintes proteínas:

- BRI3
- SEC14*like*
- MAP1A
- Flotilina1

↳ Nesse sistema o transportador não interage com:

- Niscarina
- Rab14

↳ Um estudo mais aprofundado da interação CHT1 x SEC14*like* indicou que a interação observada pelo sistema de duplo híbrido em leveduras, também é observada em células de mamíferos, em ensaios de co-imunoprecipitação.

↳ Em células de mamíferos existe co-localização entre essas proteínas e há uma alteração na distribuição do transportador.

↳ A atividade do transportador também foi modificada em função dessa interação como observamos nos experimentos de transporte de colina, com diminuição de cerca de 30% da atividade normal.

7 – Referências bibliográficas

Alahari,S.K., Lee,J.W. & Juliano,R.L. Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha 5 subunit and inhibits cell migration. *Journal of Cell Biology* **151**, 1141-1154 (2000).

Alahari,S.K., Reddig,P.J. & Juliano,R.L. The integrin-binding protein Nischarin regulates cell migration by inhibiting PAK. *Embo Journal* **23**, 2777-2788 (2004).

Alonso,A.D., Grundkeiqbal,I. & Iqbal,K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature Medicine* **2**, 783-787 (1996).

Alonso,A.D., Grundkeiqbal,I., Barra,H.S. & Iqbal,K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 298-303 (1997).

Anantharaman,V. & Aravind,L. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biology* **3**, research0023 (2002).

Apparsundaram,S., Schroeter,S., Giovanetti,E. & Blakely,R.D. Acute regulation of norepinephrine transport: II. PKC-modulated surface expression of human norepinephrine transporter proteins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **287**, 744-751 (1998).

Apparsundaram,S., Ferguson,S.M., George,A.L. & Blakely,R.D. Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**, 862-867 (2000).

Aravind,L., Anantharaman,V. & Koonin,E.V. Monophyly of class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETFP, photolyase, and PP-ATPase nucleotide-binding domains: Implications for protein evolution in the RNA world. *Proteins-Structure Function and Genetics* **48**, 1-14 (2002).

Aronheim, A. Protein recruitment systems for the analysis of protein-protein interactions. *Biochem Pharmacol* **60**, 1009-1013 (2000)

Asano,T. *et al.* The Role of N-Glycosylation in the Targeting and Stability of Glut1 Glucose-Transporter. *Febs Letters* **324**, 258-261 (1993).

Auerbach,D., Thaminy,S., Hottiger,M.O. & Stagljar,I. The post-genomic era of interactive proteomics: Facts and perspectives. *Proteomics* **2**, 611-623 (2002).

Bankaitis,V.A., Malehorn,D.E., Emr,S.D. & Greene,R. 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 (1989).

- Barbosa, J. *et al.* Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *Journal of Neurochemistry* **82**, 1221-1228 (2002).
- Barker, L.A., Dowdall, M.J. & Mittag, T.W. Comparative studies on synaptosomes: high-affinity uptake and acetylation of N-(Me-3H)choline and N-(Me-3H)n-hydroxyethylpyrrolidinium. *Brain Res* **86**, 343-348 (1975).
- Baumann, C.A. *et al.* CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202-207 (2000).
- Baumert, M. *et al.* P-29 - A Novel Tyrosine-Phosphorylated Membrane-Protein Present in Small Clear Vesicles of Neurons and Endocrine-Cells. *Journal of Cell Biology* **110**, 1285-1294 (1990).
- Bear, M.F., Connors, B. W., Paradiso, M.A. *Neurociencias: desvendando o sistema nervoso; coord. trad. Jorge Alberto Quillfeldt – 2 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2002.*
- Beckman, M.L. *et al.* Neurotransmitter Transporters: Regulators of Function and Functional Regulation. *Journal of Membrane Biology* **164**, 1-10 (1998).
- Beckman, M.L., Bernstein, E.M. & Quick, M.W. Protein Kinase C Regulates the Interaction between a GABA Transporter and Syntaxin 1A. *J. Neurosci.* **18**, 6103-6112 (1998).
- Beckman, M.L., Bernstein, E.M. & Quick, M.W. Multiple G Protein-Coupled Receptors Initiate Protein Kinase C Redistribution of GABA Transporters in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* **19**, 9RC (1999).
- Beigneux, A.P. *et al.* ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *J. Biol. Chem.* **279**, 9557-9564 (2004).
- Bennett, M.K. & Scheller, R.H. A Molecular Description of Synaptic Vesicle Membrane Trafficking. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 63-100 (1994).
- Bickel, P.E. *et al.* Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 13793-13802 (1997).
- Bickel, P.E. Lipid rafts and insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1-10 (2002).
- Birks, R. & Macintosh, F.C. Acetylcholine Metabolism of A Sympathetic Ganglion. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **39**, 787-& (1961).
- Blusztajn, J.K. & Wurtman, R.J. Choline and Cholinergic Neurons. *Science* **221**, 614-620 (1983).

- Boehm,M. & Bonifacino,J.S. Adaptins - The final recount. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2907-2920 (2001).
- Bradford MM. 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 (1976).
- Brandon,E.P. *et al.* Choline transporter 1 maintains cholinergic function in choline acetyltransferase haploinsufficiency. *J. Neurosci.* **24**, 5459-5466 (2004).
- Browning,M.D., Haganir,R. & Greengard,P. Protein-Phosphorylation and Neuronal Function. *Journal of Neurochemistry* **45**, 11-23 (1985).
- Canfield,V.A. & Levenson,R. Transmembrane Organization of the Na,K-ATPase Determined by Epitope Addition. *Biochemistry* **32**, 13782-13786 (1993).
- Carroll,P.T. Membrane-Bound Choline-O-Acetyltransferase in Rat Hippocampal Tissue Is Associated with Synaptic Vesicles. *Brain Research* **633**, 112-118 (1994).
- Casado,M., Zafra,F., Aragon,C. & Gimenez,C. Activation of High-Affinity Uptake of Glutamate by Phorbol Esters in Primary Glial-Cell Cultures. *Journal of Neurochemistry* **57**, 1185-1190 (1991).
- Causier,B. & Davies,B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology* **50**, 855-870 (2002).
- Choe,C.U., Harrison,K.D., Grant,W. & Ehrlich,B.E. Functional Coupling of Chromogranin with the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Shapes Calcium Signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 35551-35556 (2004).
- Coates, P.J. & Hall, P.A. The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions. *The Journal of Pathology* **199**, 4-7, (2003)
- Cockcroft,S. Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *Bioessays* **20**, 423-432 (1998).
- Collier,B. & Katz,H.S. Acetylcholine Synthesis from Recaptured Choline by A Sympathetic-Ganglion. *Journal of Physiology-London* **238**, 639-655 (1974).
- Collier,B. & Ilson,D. Effect of Preganglionic Nerve-Stimulation on Accumulation of Certain Analogs of Choline by A Sympathetic-Ganglion. *Journal of Physiology-London* **264**, 489-509 (1977).
- Cooper,J.R. Unsolved Problems in the Cholinergic Nervous-System. *Journal of Neurochemistry* **63**, 395-399 (1994).
- Corey,J.L., Davidson,N., Lester,H.A., Brecha,N. & Quick,M.W. Protein-Kinase-C Modulates the Activity of A Cloned Gamma-Aminobutyric-Acid Transporter

- Expressed in Xenopus-Oocytes Via Regulated Subcellular Redistribution of the Transporter. *J. Biol. Chem.* **269**, 14759-14767 (1994).
- Deken,S.L., Beckman,M.L., Boos,L. & Quick,M.W. Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nature Neuroscience* **3**, 998-1003 (2000).
- Deneka,M., Neeft,M. & van der Sluijs,P. Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 121-142 (2003).
- Doody,R.S. Current treatments for Alzheimer's disease: Cholinesterase inhibitors. *Journal of Clinical Psychiatry* **64**, 11-17 (2003).
- Drouet,B., Pincon-Raymond,M., Chambaz,J. & Pillot,T. Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 705-715 (2000).
- Ferguson,S.M. *et al.* Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J. Neurosci.* **23**, 9697-9709 (2003).
- Ferguson,S.M. & Blakely,R.D. The Choline Transporter Resurfaces: New Roles for Synaptic Vesicles? *Mol. Interv.* **4**, 22-37 (2004).
- Fernandez-Chacon,R. & Sudhof,T.C. Genetics of synaptic vesicle function: Toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annual Review of Physiology* **61**, 753-776 (1999).
- Fernandez-Chacon,R. *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**, 41-49 (2001).
- Fernandez Murray,J.P. & McMaster,C.R. Nte1p-mediated Deacylation of Phosphatidylcholine Functionally Interacts with Sec14p. *J. Biol. Chem.* **280**, 8544-8552 (2005).
- Fernstrom,J.D. Effects of the Diet on Brain-Function. *Acta Astronautica* **8**, 1035-1042 (1981).
- Ferreira,L.T. *et al.* Structural requirements for steady-state localization of the vesicular acetylcholine transporter. *Journal of Neurochemistry* **94**, 957-969 (2005).
- Fields,S. & Song,O.K. A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
- Fields,S., Bartel,P.L., Iwabuchi,K., Li,B. & Marraccino,R.L. The 2-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Faseb Journal* **7**, A1261 (1993).
- Gates,J., Ferguson,S.M., Blakely,R.D. & Apparsundaram,S. Regulation of choline transporter surface expression and phosphorylation by protein kinase C and protein phosphatase 1/2A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **310**, 536-545 (2004).

Gietz,R.D., Schiestl,R.H., Willems,A.R. & Woods,R.A. Studies on the Transformation of Intact Yeast-Cells by the Liac/S-Dna/Peg Procedure. *Yeast* **11**, 355-360 (1995).

Girardot,N. *et al.* Accumulation of flotillin-1 in tangle-bearing neurones of Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **29**, 451-461 (2003).

Gold,P.E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* **80**, 194-210 (2003).

Griffiths,G. & Simons,K. The Trans Golgi Network - Sorting at the Exit Site of the Golgi-Complex. *Science* **234**, 438-443 (1986).

Grundkeiqbal,I. *et al.* Microtubule-Associated Protein-Tau - A Component of Alzheimer Paired Helical Filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 6084-6089 (1986).

Guo,Q. *et al.* Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nature Medicine* **4**, 957-962 (1998).

Guo,Q., Xie,J. & Du,H.M. Par-4 induces cholinergic hypoactivity by suppressing ChAT protein synthesis and inhibiting NGF-inducibility of ChAT activity. *Brain Research* **874**, 221-232 (2000).

Haga,T. Synthesis and Release of [C-14]Acetylcholine in Synaptosomes. *Journal of Neurochemistry* **18**, 781-& (1971).

Hammond, D.N., Lee, H.J., Tonsgard, J.H., & Wainer, B.H. Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res* **512**, 190-200(1990)

Hicke, L. Getting down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**, 107-112 (1999).

Hoffman, B.B. & Taylor, P. *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York (2001).

Huff,R.A., Vaughan,R.A., Kuhar,M.J. & Uhl,G.R. Phorbol esters increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport V-max. *Journal of Neurochemistry* **68**, 225-232 (1997).

Hussain,I. *et al.* Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as [beta]-Secretase. *Molecular and Cellular Neuroscience* **14**, 419-427 (1999).

Iqbal,K. *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1739**, 198-210 (2005).

Jope,R.S. & Jenden,D.J. Ch Transport and Ach Synthesis in Rat Striatal Synaptosomes. *Federation Proceedings* **38**, 272 (1979).

Junutula, J.R. *et al.* Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 2218-2229 (2004).

Kaduszkiewicz, H., Zimmermann, T., Beck-Bornholdt, H.P. & van den Bussche, H. Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *British Medical Journal* **331**, 321-323 (2005).

Kar, S. *et al.* Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry* **70**, 2179-2187 (1998).

Kirchhausen, T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 705-732 (1999).

Kuhar, M.J., Sethy, V.H., Roth, R.H. & AGHAJANI, G.K. Choline - Selective Accumulation by Central Cholinergic Neurons. *Journal of Neurochemistry* **20**, 581-& (1973).

Kuhar, M.J. & Aghajani, G.K. Selective Accumulation of H-3-Serotonin by Nerve Terminals of Raphe Neurons - Autoradiographic Study. *Nature-New Biology* **241**, 187-189 (1973).

Kuhar, M.J. & Murrin, L.C. Sodium-Dependent, High Affinity Choline Uptake. *Journal of Neurochemistry* **30**, 15-21 (1978).

Kuhar, M.J. & Zarbin, M.A. Synaptosomal Transport - Chloride Dependence for Choline, Gaba, Glycine and Several Other Compounds. *Journal of Neurochemistry* **31**, 251-256 (1978).

Kushmerick, C., Romano-Silva, M.A., Gomez, M.V. & Prado, M.A. Changes in Ca²⁺ channel expression upon differentiation of SN56 cholinergic cells. *Brain Res* **916**, 199-210.

Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S. & Caron, M.G. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* **275**, 23120-23126. (2000)

Larance, M. *et al.* Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J. Biol. Chem.* **280**, 37803-37813 (2005).

Lee, V.M.Y., Balin, B.J., Otvos, L. & Trojanowski, J.Q. A68 - A Major Subunit of Paired Helical Filaments and Derivatized Forms of Normal-Tau. *Science* **251**, 675-678 (1991).

Leslie, R.A. Imaging Alzheimer's disease in vivo: not so 'implaqueable' anymore. *Trends in Neurosciences* **25**, 232-233 (2002).

Levitan, I.B. Phosphorylation of Ion Channels - A Fundamental Regulatory Mechanism in the Control of Nerve-Cell Activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **366**, 331-332 (1985).

Lin, R.C. & Scheller, R.H. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* **19**, 1087-1094 (1997).

Lin, X. *et al.* Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta -secretase site of beta -amyloid precursor protein. *PNAS* **97**, 1456-1460 (2000).

Littleton, J.T. *et al.* synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca²⁺-triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo. *J. Neurosci.* **21**, 1421-1433 (2001).

Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H. & Lev, S. Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nature Cell Biology* **7**, 225-U14 (2005).

Liu, J., DeYoung, S.M., Zhang, M., Dold, L.H. & Saltiel, A.R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 16125-16134 (2005).

Liu, S.C., Calderwood, D.A. & Ginsberg, M.H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of Cell Science* **113**, 3563-3571 (2000).

Loewi, O., Navratil, E. Ueber humorale ubertragbarkeit der herznervenwirkung. X mitteilung. Uber das schickasal des vagustoff. *Pflugers arch. Gestante Physiol.* **214**, 678-688 (1926).

Macintosh, F.C., Birks, R.I. & Sastry, P.B. Pharmacological Inhibition of Acetylcholine Synthesis. *Nature* **178**, 1181 (1956).

Mackler, J.M., Drummond, J.A., Loewen, C.A., Robinson, I.M. & Reist, N.E. The C2BCa²⁺-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* **418**, 340-344 (2002).

Marchbanks, R.M. & Kessler, P.D. The Independency of Choline Transport and Acetylcholine Synthesis. *Journal of Neurochemistry* **39**, 1424-1433 (1982).

McAlister-Henn, L., Gibson, N. & Panisko, E. Applications of the yeast two-hybrid system. *Methods* **19**, 330-337 (1999).

Melikian, H.E., Ramamoorthy, S., Tate, C.G. & Blakely, R.D. Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. *Molecular Pharmacology* **50**, 266-276 (1996).

Migaud, M. *et al.* Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433-439 (1998).

- Mirecki,A. *et al.* Brain antioxidant systems in human methamphetamine users. *Journal of Neurochemistry* **89**, 1396-1408 (2004).
- Misgeld,T. *et al.* Roles of neurotransmitter in synapse formation: Development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* **36**, 635-648 (2002).
- Murrin,L.C. & Kuhar,M.J. Activation of High-Affinity Choline Uptake In vitro by Depolarizing Agents. *Molecular Pharmacology* **12**, 1082-1090 (1976).
- Nelson,N. The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *Journal of Neurochemistry* **71**, 1785-1803 (1998).
- Noiges,R. *et al.* Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: Light chains determine distinct functional properties. *J. Neurosci.* **22**, 2106-2114 (2002).
- Novick,P. & Zerial,M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 496-504 (1997).
- Oda,Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology International* **49**, 921-937 (1999).
- Okuda,T. & Haga,T. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *Febs Letters* **484**, 92-97 (2000).
- Okuda,T. *et al.* Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature Neuroscience* **3**, 120-125 (2000).
- Okuda,T., Okamura,M., Kaitsuka,C., Haga,T. & Gurwitz,D. Single nucleotide polymorphism of the human high affinity choline transporter alters transport rate. *J. Biol. Chem.* **277**, 45315-45322 (2002).
- Olivares,L., Aragon,C., Gimenez,C. & Zafra,F. The Role of N-Glycosylation in the Targeting and Activity of the Glyt1 Glycine Transporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 9437-9442 (1995).
- Oliver,S. Guilt-by-association goes global. *Nature* **403**, 601-603 (2000).
- Oregan,S. & Collier,B. Effect of Increasing Choline, In vivo and In vitro, on the Synthesis of Acetylcholine in A Sympathetic-Ganglion. *Journal of Neurochemistry* **36**, 420-430 (1981).
- Orzech,E. *et al.* Interactions between adaptor protein-1 of the clathrin coat and microtubules via type 1a microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 31340-31348 (2001).
- Owen,D.J. Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochemical Society Transactions* **32**, 1-14 (2004).

Pahud,G. *et al.* Study of subcellular localization of membrane-bound choline acetyltransferase in *Drosophila* central nervous system and its association with membranes. *European Journal of Neuroscience* **10**, 1644-1653 (1998).

Parihar,M.S. & Hemnani,T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience* **11**, 456-467 (2004).

Park,S.H. & Raines,R.T. Genetic selection for dissociative inhibitors of designated protein-protein interactions. *Nature Biotechnology* **18**, 847-851 (2000).

Parsons,S.M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *Faseb Journal* **14**, 2423-2434 (2000).

Parton,R.G. & Richards,A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: New insights and common mechanisms. *Traffic* **4**, 724-738 (2003).

Perry,E.K. & Perry,R.H. Acetylcholine and Hallucinations - Disease-Related Compared to Drug-Induced Alterations in Human Consciousness. *Brain and Cognition* **28**, 240-258 (1995).

Phillips,S.E. *et al.* Yeast Sec14p Deficient in Phosphatidylinositol Transfer Activity Is Functional In Vivo. *Molecular Cell* **4**, 187-197 (1999).

Pike,L.J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal* **378**, 281-292 (2004).

Pimpinelli,F., Lehmann,S. & Maridonneau-Parini,I. The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. *European Journal of Neuroscience* **21**, 2063-2072 (2005).

Polak,R.L., Molenaar,P.C. & Vangelder,M. Acetylcholine Metabolism and Choline Uptake in Cortical Slices. *Journal of Neurochemistry* **29**, 477-485 (1977).

Prado,V.F. & Prado,M.A.M. Signals Involved in Targeting Membrane Proteins to Synaptic Vesicles. *Cellular and Molecular Neurobiology* **22**, 565-577 (2002).

Purves, D. *et al.* Neuroscience, second edition. 2001.Sinauer Associates.

Qian,Y. *et al.* Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *J. Neurosci.* **17**, 45-57 (1997).

Ramamoorthy,S., Giovanetti,E., Qian,Y. & Blakely,R.D. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J. Biol. Chem.* **273**, 2458-2466 (1998).

Rebois,R.V., Reynolds,E.E., Toll,L. & Howard,B.D. Storage of Dopamine and Acetylcholine in Granules of Pc12, A Clonal Pheochromocytoma Cell-Line. *Biochemistry* **19**, 1240-1248 (1980).

Reddig,P.J., Xu,D. & Juliano,R.L. Regulation of p21-activated kinase-independent Rac1 signal transduction by nischarin. *J. Biol. Chem.* **280**, 30994-31002 (2005).

Rettig,J. & Neher,E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* **298**, 781-785 (2002).

Ribeiro,F.M. *et al.* The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry* **87**, 136-146 (2003).

Ribeiro,F.M. *et al.* Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *Journal of Neurochemistry* **94**, 86-96 (2005).

Robinson,M.B. Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *Journal of Neurochemistry* **80**, 1-11 (2002).

Robinson,M.S. 100-Kd Coated Vesicle Proteins - Molecular Heterogeneity and Intracellular-Distribution Studied with Monoclonal-Antibodies. *Journal of Cell Biology* **104**, 887-895 (1987).

Rylett R. J. Synaptosomal "membrane-bound" choline acetyltransferase is most sensitive to inhibition by choline mustard. *J Neurochem* **52**, 869-875 (1989).

Saltarelli,M.D., Lowenstein,P.R. & Coyle,J.T. Rapid Invitro Modulation of [H-3] Hemicholinium-3 Binding-Sites in Rat Striatal Slices. *European Journal of Pharmacology* **135**, 35-40 (1987).

Sanchez-Pulido,L., Devos,D. & Valencia,A. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 329-332 (2002).

Santos,M.S. *et al.* Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line (vol 78, pg 1104, 2001). *Journal of Neurochemistry* **79**, 717 (2001).

Schueler,F.W. A New Group of Respiratory Paralyzants .1. the Hemicholiniums. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **115**, 127-143 (1955).

Sha,B.D., Phillips,S.E., Bankaitis,V.A. & Luo,M. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* **391**, 506-510 (1998).

Sherman,K.A., Zigmond,M.J. & Hanin,I. High Affinity Choline Uptake in Striatum and Hippocampus - Differential Effects of Treatments Which Release Acetylcholine. *Life Sciences* **23**, 1863-1870 (1978).

Simon,J.R. & Kuhar,M.J. Impulse-Flow Regulation of High Affinity Choline Uptake in Brain Cholinergic Nerve-Terminals. *Nature* **255**, 162-163 (1975).

- Sollner, T. *et al.* Snap Receptors Implicated in Vesicle Targeting and Fusion. *Nature* **362**, 318-324 (1993).
- Stock, S.D., Hama, H., Dewald, D.B. & Takemoto, J.Y. SEC14-dependent secretion in *Saccharomyces cerevisiae* - Nondependence on sphingolipid synthesis-coupled diacylglycerol production. *J. Biol. Chem.* **274**, 12979-12983 (1999).
- Straumann, N., Wind, A., Leuenberger, T. & Wallimann, T. Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochemical Journal* **393**, 459-469 (2006).
- Südhof, T.C. & Jahn, R. Proteins of Synaptic Vesicles Involved in Exocytosis and Membrane Recycling. *Neuron* **6**, 665-677 (1991).
- Südhof, T.C. The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* **27**, 509-547 (2004).
- Sung, U. *et al.* A regulated interaction of syntaxin 1A with the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter establishes catecholamine clearance capacity. *J. Neurosci.* **23**, 1697-1709 (2003).
- Sweeney, G. *et al.* An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10071-10078 (1999).
- Szebenyi, G. *et al.* Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Current Biology* **15**, 1820-1826 (2005).
- Takasugi, N. *et al.* The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **422**, 438-441 (2003).
- Tan, P.K., Waites, C., Liu, Y.J., Krantz, D.E. & Edwards, R.H. A leucine-based motif mediates the endocytosis of vesicular monoamine and acetylcholine transporters. *J. Biol. Chem.* **273**, 17351-17360 (1998).
- Tate, C.G. & Blakely, R.D. The Effect of N-Linked Glycosylation on Activity of the Na⁺-Dependent and Cl⁻-Dependent Serotonin Transporter Expressed Using Recombinant Baculovirus in Insect Cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26303-26310 (1994).
- Tomaszewicz, M., Rossner, S., Schliebs, R., Cwikowska, J. & Szutowicz, A. Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. *Journal of Neurochemistry* **87**, 318-324 (2003).
- Torreilles, F. & Touchon, J. Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* **66**, 191-203 (2002).

- Torres,G.E. *et al.* Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* **30**, 121-134 (2001).
- Towbin,H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**, 4350-4354 (1979).
- Tucek,S., Dolezal,V. & Ricny,J. Regulation of Acetylcholine Synthesis in Presynaptic Endings of Cholinergic Cns Neurons. *Neurophysiology* **16**, 453-460 (1984).
- Tucker,W.C., Weber,T. & Chapman,E.R. Reconstitution of Ca²⁺-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* **304**, 435-438 (2004).
- Vajda,F.J.E. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Neuroscience* **9**, 4-8 (2002).
- Van der Kloot,W., Molgo,J., Cameron,R. & Colasante,C. Vesicle size and transmitter release at the frog neuromuscular junction when quantal acetylcholine content is increased or decreased. *Journal of Physiology-London* **541**, 385-393 (2002).
- Vaughan,R.A., Huff,R.A., Uhl,G.R. & Kuhar,M.J. Protein kinase C-mediated phosphorylation and functional regulation of dopamine transporters in striatal synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **272**, 15541-15546 (1997).
- Vickroy,T.W., Roeske,W.R. & Yamamura,H.I. Sodium-Dependent High-Affinity Binding of [H-3] Hemicholinium-3 in the Rat-Brain - A Potentially Selective Marker for Presynaptic Cholinergic Sites. *Life Sciences* **35**, 2335-2343 (1984).
- Vidal,R. *et al.* A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* **399**, 776-781 (1999).
- Vidal,R. *et al.* A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4920-4925 (2000).
- Vidal,R. *et al.* Sequence, genomic structure and tissue expression of Human BRI3, a member of the BRI gene family. *Gene* **266**, 95-102 (2001).
- Waugh,M.G., Minogue,S., Anderson,J.S., dos Santos,M. & Hsuan,J.J. Signalling and non-caveolar rafts. *Biochemical Society Transactions* **29**, 509-512 (2001).
- Weber,T. *et al.* SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772 (1998).

West,A.E. *et al.* Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11024-11031 (2001).

Wheeler, D.D. A model of high affinity choline transport in rat cortical synaptosomes. *J Neurochem* **32**, 1197-1213. (1979).

Whitehouse,P.J. *et al.* Alzheimers-Disease and Senile Dementia - Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *Science* **215**, 1237-1239 (1982).

Winkler,J., Suhr,S.T., Gage,F.H., Thal,L.J. & Fisher,L.J. Essential Role of Neocortical Acetylcholine in Spatial Memory. *Nature* **375**, 484-487 (1995).

Wong,T.A. *et al.* Membrane metabolism mediated by Sec14 family members influences Arf GTPase activating protein activity for transport from the trans-Golgi. *PNAS* **102**, 12777-12782 (2005).

Wu,D.H. & Hersh,L.B. Choline-Acetyltransferase - Celebrating Its 50Th Year. *Journal of Neurochemistry* **62**, 1653-1663 (1994).

Xie,J. & Guo,Q. Par-4 inhibits choline uptake by interacting with CHT1 and reducing its incorporation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **27**, 28266-28275 (2004).

Yamamura,H.I. & Snyder,S.H. High Affinity Transport of Choline Into Synaptosomes of Rat-Brain. *Journal of Neurochemistry* **21**, 1355-1374 (1973).

Yang,L.B. *et al.* Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nature Medicine* **9**, 3-4 (2003).

Zeisel,S.H. Dietary Choline - Biochemistry, Physiology, and Pharmacology. *Annual Review of Nutrition* **1**, 95-121 (1981).

Zimmer,S. *et al.* A novel human tocopherol-associated protein - Cloning, in vitro expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **275**, 25672-25680 (2000).