

EFEITOS DA FOSFORILAÇÃO DO TRANSPORTADOR VESICULAR DE ACETILCOLINA EM SEU TRÁFEGO E LOCALIZAÇÃO EM CÉLULAS PC12

Paola Fernandes

Discente da Iniciação Científica UNIFOR-MG

Daniela Rodrigues de Faria Barbosa

Docente e Pesquisadora ICB/UNIFOR-MG

José Barbosa Junior

Docente UNIFOR-MG e UNIFENAS

Recebido em: 29/11/2013

Aprovado em: 24/03/2014

RESUMO

O transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) participa efetivamente da neurotransmissão colinérgica. Estudos realizados em células PC12 mostraram que a serina 480 é o sítio de fosforilação do VACHT. Experimentos demonstraram que a proteína quinase C (PKC) é a quinase envolvida na fosforilação do VACHT e que a substituição da serina 480 por glutamato – que imita o evento da fosforilação - aumenta a expressão do VACHT em LCDVs (vesículas maiores onde normalmente se encontram os transportadores de monoaminas ou VMATs). Para verificar se a fosforilação do VACHT altera seu tráfego em células PC12, foram feitos dois mutantes do VACHT. No primeiro, foi substituída a serina 480 (sítio de fosforilação para PKC), por alanina (um aminoácido sem carga, portanto, não pode ser fosforilado), este mutante foi denominado GFP-VACHT S480A. No segundo, a serina foi substituída por glutamato (um aminoácido que imita o estado fosforilado do VACHT), este mutante foi denominado GFP-VACHT S480E. O VACHT foi etiquetado com GFP; uma proteína fluorescente, que permite a visualização do VACHT em células PC12, através de microscopia confocal. O objetivo deste trabalho foi verificar se existem diferenças no tráfego e localização do VACHT no estado fosforilado e não fosforilado em células PC12. O VACHT no estado fosforilado localiza-se em maior concentração nas varicosidades das células (36% mais fluorescência que no corpo celular); local onde a ACh é liberada. Já o VACHT no estado não fosforilado localiza-se em maior concentração no corpo celular (20% mais fluorescência no corpo em relação às varicosidades). Estes resultados indicam que a fosforilação do VACHT afeta seu tráfego e, conseqüentemente, sua localização em células PC12.

Palavras-chave: VACHT. Fosforilação. Células PC12. Acetilcolina.

EFFECTS OF PHOSPHORYLATION OF VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER IN ITS TRAFFIC AND LOCATION IN PC12 CELLS

ABSTRACT

The vesicular acetylcholine transporter (VACHT) participates effectively the cholinergic transmission. Studies in PC12 cells have shown that serine 480 is the site of phosphorylation of VACHT. Experiments have shown that protein kinase C (PKC) is involved in the phosphorylation of VACHT, and that substitution of serine 480 to glutamate - mimicking the phosphorylation event - increases the expression of VACHT in LCDVs (larger vesicles which are usually the monoamine transporters or VMATs). To verify that phosphorylation of VACHT alters their traffic in PC12 cells, we made two mutants of VACHT. At first, it was replaced the serine 480 (phosphorylation site for PKC), by alanine (an amino acid no load, and therefore cannot be phosphorylated), this mutant was designated GFP-S480A VACHT. Then, the serine has been replaced by glutamate (an amino acid that mimics the phosphorylated state of VACHT), this mutant was designated GFP-S480E VACHT. The VACHT was tagged with GFP, a fluorescent protein that allows visualization of VACHT in PC12 cells by confocal microscopy. The aim of this study was to determine whether there are differences in traffic and location the GFP-S480E VACHT and GFP-S480A VACHT in PC12 cells. The VACHT phosphorylated (GFP-S480E VACHT) located in the highest concentration in cells of varicosities (36% more fluorescence in the cell body), where ACh is released. Already VACHT in non-phosphorylated state (GFP-S480A VACHT) located in highest concentration in the cell body (20% more fluorescence in the body in relation to varicosities). These results indicate that phosphorylation of VACHT affects its traffic and, consequently, its location in PC12 cells.

Keywords: VACHT. Phosphorylation. PC12 cells. Acetylcholine.

1 INTRODUÇÃO

A neurotransmissão colinérgica é realizada por meio da armazenagem da ACh em vesículas sinápticas. Esta armazenagem é realizada pelo transportador vesicular de acetilcolina, ou VACHT; um transporte que ocorre pela troca de prótons vesiculares por ACh citoplasmática (KHARE; MULAKALURI; PARSONS, 2010). O VACHT é uma proteína composta por 12 domínios transmembrânicos; 530 aminoácidos e uma grande alça intravesicular entre o primeiro e o segundo domínios transmembrânicos (ROGHANI, 1994). A região C-terminal do VACHT possui um sítio de fosforilação para a proteína quinase C, ou PKC (ERICKSON et al., 1994; ROGHANI et al., 1994). Segundo Barbosa et al. (1997), o VACHT sofre fosforilação e a incorporação de fósforo (^{32}P) aumenta após estimulação da PKC.

Por meio de estudos utilizando células PC12, foi demonstrado que o aminoácido serina 480 é sítio de fosforilação no VACHT (CHO et al., 2000; KRANTZ et al., 2000), e outro estudo mostrou que a PKC é a quinase envolvida na fosforilação do VACHT e que a troca da serina 480 por glutamato (um aminoácido negativo que imita o estado fosforilado do VACHT) aumenta a manifestação dessa proteína em LDCVs (large dense core vesicles) (KRANTZ et al., 2000). Já Cho et al. (2000) mostraram que a troca da serina 480 por alanina (um aminoácido sem carga que imita o estado não fosforilado do VACHT) encaminhava a proteína para um compartimento distinto daquele onde se localizam as SLMVs (pequenas vesículas sinápticas).

Para constatar se a fosforilação do VACHT altera seu tráfego em células PC12, foram elaborados dois mutantes do VACHT. No primeiro, a serina 480 (sítio de fosforilação da PKC) foi substituída por alanina e esse mutante foi denominado GFP-VACHT S480A. No segundo, a serina foi substituída por glutamato e foi denominado GFP-VACHT S480E. Ambos foram etiquetados com GFP; uma proteína fluorescente que permite a visualização do VACHT em microscopia confocal.

A compreensão exata sobre o tráfego de proteínas neuronais é importante, pois falhas no direcionamento dessas proteínas podem gerar distúrbios neurológicos como, por exemplo, a doença de Alzheimer. Pacientes que apresentam essa doença demonstram um déficit expressivo do VACHT no sistema nervoso (CHEN et al., 2011). Portanto, a regulação farmacológica do VACHT, possivelmente, poderá beneficiar os pacientes com doença de Alzheimer, assim como os de outras doenças neurodegenerativas caracterizadas pelo déficit dessa proteína.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o tráfego do VACHT em células PC12 e como a fosforilação dessa proteína pode modificar o seu direcionamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar se a fosforilação do GFP-VACHT influencia em sua localização em células PC12.

3 METODOLOGIA

3.1 Clonagem do VACHT

Os clones do VACHT foram feitos através de PCR, utilizando primers com mutações que permitem a troca da base nitrogenada que codifica a serina por glutamato ou alanina e foram inseridos em um vetor de expressão para serem utilizados para transfectar as células PC12 (FIG. 1).

Todas as amplificações foram feitas em um volume final de 25mL de reação, utilizando-se 1,5mM MgCl₂, 200mM de dNTP, 0,6 pmoles de cada iniciador, 0,5U de Taq polimerase PROMEGA, e 400ng de DNA de camundongo. Foram realizados 35 ciclos, sendo que cada ciclo consistia de desnaturamento a 94°C por 45 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto, seguido de extensão do DNA a 72°C por 80 segundos. Após 35 ciclos, fez-se extensão final por 10 minutos a 72°C e os produtos amplificados foram colocados a 4°C.

Os fragmentos foram clonados no vetor de expressão pEGFP-C2 (Clontech) e essas construções foram utilizadas para transformar a linhagem TOP10 (Invitrogen) ou DH5α de *E. coli*. A varredura para encontrar clones positivos foi feita através de PCR de colônia utilizando iniciadores que se ligam ao vetor. Todos os clones positivos foram submetidos a sequenciamento em sequenciador automático ALF (Pharmacia) ou ABI Prism (Applied Biosystems) para verificação das mutações de interesse e exclusão daqueles clones que apresentassem mutações adicionais, introduzidas pela Taq DNA polimerase (dados não mostrados).

Para a construção do clone VACHT S480E foram utilizados os seguintes primers:

Seq (5'-3'): CGCGTGAGGAGCGCGATGTGCTGC

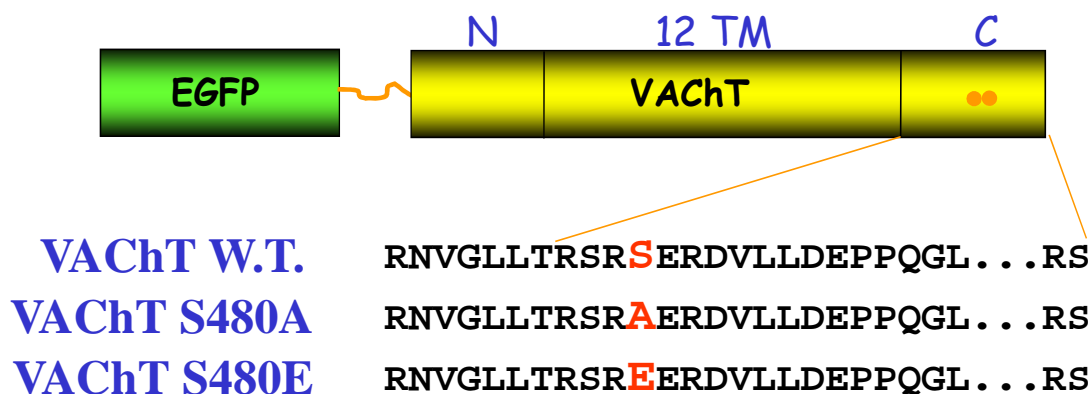
Seq (5'-3'): CGCGCTCCTCACGCGAGCGTGTAAG

Para a construção do clone VACHT S480A foram utilizados os seguintes primers:

Seq (5'-3'): CGCGTGCCGAGCGCGATGTGC

Seq (5'-3'): GCTCGGCACGCGAGCGTGTAAG

Figura 1 - Esquema das construções dos mutantes do VACHT



Nota: Box “N” corresponde ao domínio N-terminal, “12 TM” indica os 12 domínios transmembrânicos e o box “C” representa o domínio C-terminal do VACHT. Parte da sequência C-terminal é indicada para mostrar a mutação de serina para alanina (VACHT S480A), serina para glutamato (VACHT S480E). Essas construções foram usadas para transfectar células PC12 e visualizadas em microscopia confocal.

3.2 Cultura das células PC12

As células PC12 foram provenientes do Instituto Ludwig. As células foram mantidas em meio DMEM (Sigma), mais 10% de soro equino (Cultilab), 5% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO Life Technologies) em garrafas de cultura de 50mL na estufa de CO₂ a 5% e 37° C. As células foram diferenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (Cultilab), e 50 ng/ml de NGF (Sigma); por 7 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias, exceto durante a diferenciação, quando foi trocado a cada 24 horas.

3.3 Transfecção celular

Aproximadamente 1×10^4 células PC12 foram plaqueadas e estas diferenciadas por 7 dias com 50ng/ml de NGF (Sigma) antes das transfecções. As células foram transfectadas usando 1 µg de DNA e LipofectAMINE (Life Technologies) de acordo com as instruções do kit. As células foram mantidas em meio sem soro e antibiótico e, após 4 horas, diferenciadas (NGF). A expressão de GFP foi examinada 48 horas após a transfecção.

3.4 Microscopia confocal

As imagens foram obtidas em um microscópio 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 40X de imersão em água. Para excitar as preparações, foram utilizados laser UV de argônio (488nm) ou laser de argônio/kriptônio (através das linhas 488nm ou 568nm), e a luz emitida foi selecionada com os filtros 522/35 ou 598/40. As imagens foram analisadas e processadas utilizando os seguintes softwares: Lasersharp (Bio-Rad), Confocal Assistant, Adobe Photoshop and Metamorph (Universal Imaging).

3.5 Quantificação de fluorescência

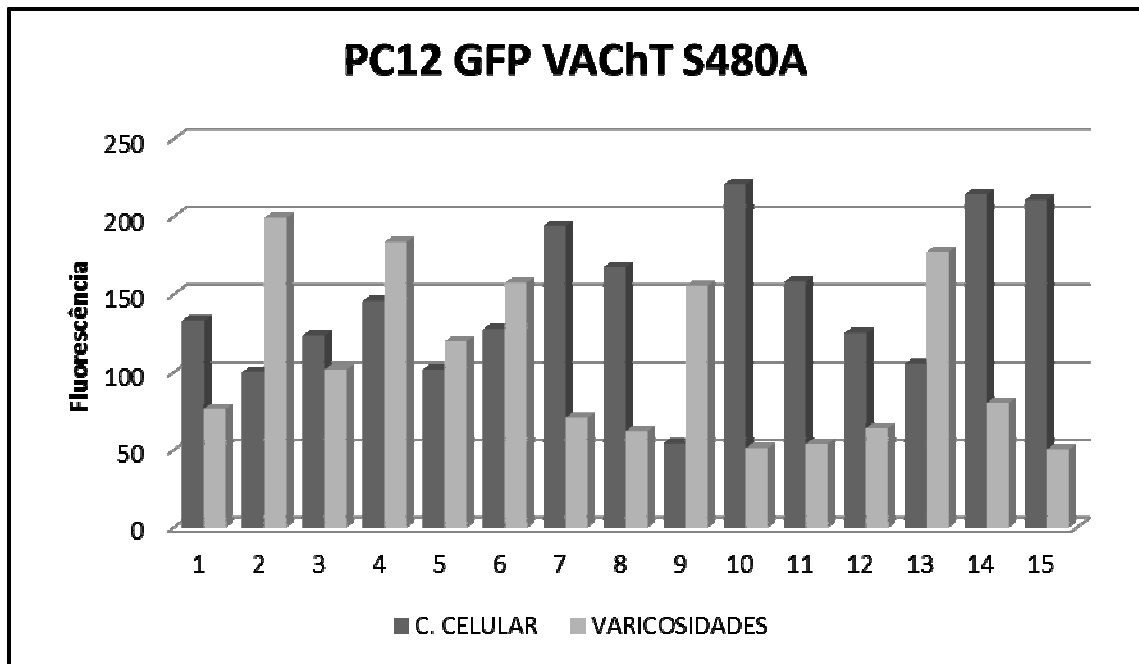
Para a quantificação do número da fluorescência encontrada no corpo celular e nas varicosidades das células PC12, obtivemos imagens no plano Z (vertical) de cada célula e fizemos a reconstrução digital das fatias ópticas, obtendo, assim, a fluorescência de todos os planos de foco. As células foram analisadas individualmente utilizando o recurso pseudocolor do programa Metamorph. A média de fluorescência encontrada do corpo celular e das varicosidades das células dos três tipos de mutantes do VACHT (GFP VACHT S480A, GFP VACHT S480E e VACHT selvagem) foram analisados, e um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

As células PC12 foram transfectadas com o mutante GFP VACHT S480A e sua localização foi analisada por meio de microscopia confocal. A fluorescência do GFP foi obtida utilizando laser no comprimento de onda de 488nm. Os resultados foram adquiridos com base na quantificação da fluorescência das células PC12. O programa Metamorph foi utilizado para medir a fluorescência dos mutantes.

Nas células transfectadas com o mutante GFP VACHT S480A, que simula o estado não fosforilado do VACHT, foram analisadas um total de quinze células de dois experimentos isolados. Os resultados obtidos mostraram que o corpo celular da maioria das células transfectadas com o mutante no estado não fosforilado apresentou uma taxa mais elevada de fluorescência, comparada com as varicosidades das células (GRAF. 1).

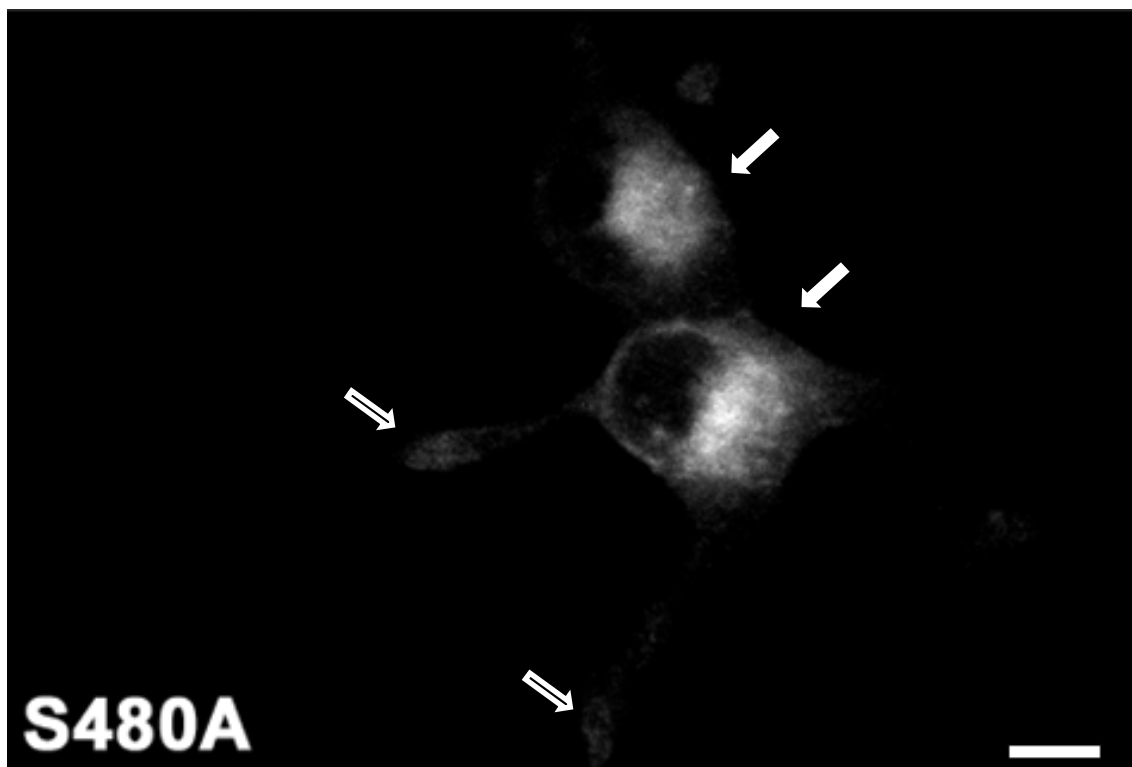
Gráfico 1 – Fluorescência encontrada no corpo celular e nas varicosidades das células PC12 transfetadas com GFP VACHT S480A



Observe que a fluorescência se mostrou marcante no corpo celular da maioria das células analisadas com o GFP VACHT S480A.

Pela imagem de uma das células analisadas, pode-se observar a presença marcante do GFP no corpo celular (FIG. 2).

Figura 2 - Imagem típica de células expressando GFP-VACHT S480A

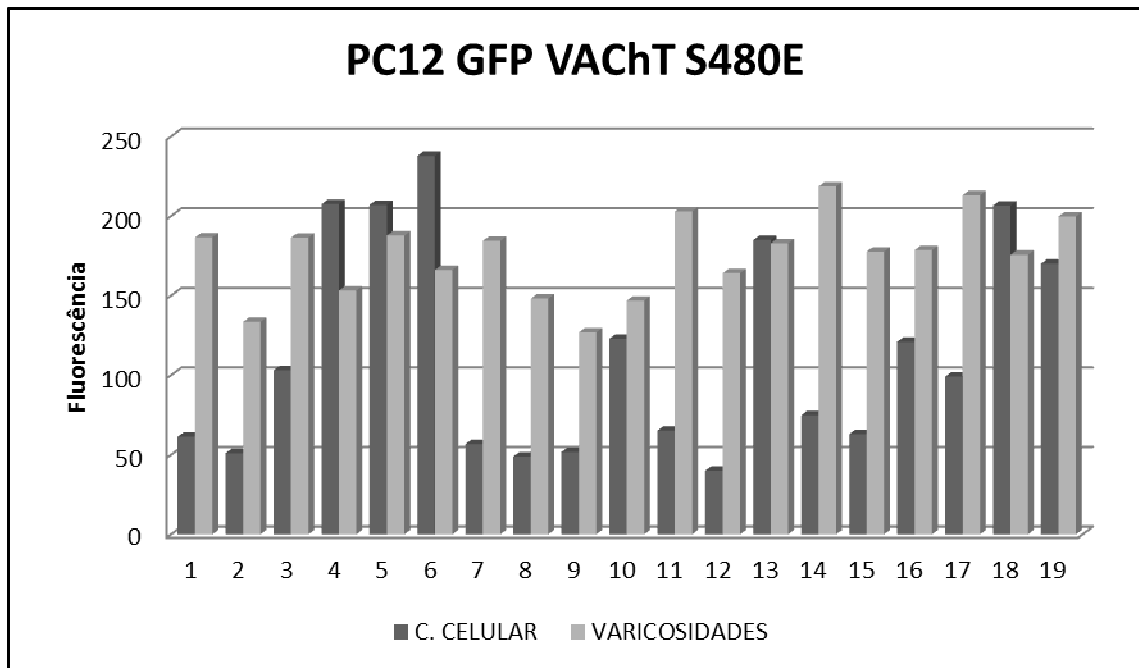


Nota: Imagem do plano Z vertical, obtida por meio de microscopia confocal com objetiva de 40x de imersão em água, utilizando laser no comprimento de onda de 488nm. Barras = 10 μ m. A fluorescência está mais presente no corpo celular (indicado pelas setas cheias) comparando-o às varicosidades (indicada pelas setas vazias).

As células PC12 também foram transfectadas com o mutante GFP VACHT S480E e a localização do VACHT foi analisada por microscopia confocal. Para isso, foi utilizado laser de comprimento de onda de 488 nm para medir a fluorescência do GFP. Os resultados também foram adquiridos com base na quantificação da fluorescência das células PC12.

Nas células transfectadas com o mutante GFP VACHT S480E, que simula o estado fosforilado do VACHT, foram analisadas um total de dezenove células de dois experimentos independentes. Os resultados obtidos mostraram que as varicosidades da maioria das células transfectadas com o mutante no estado fosforilado apresentaram uma taxa mais elevada de fluorescência, comparada com o corpo celular das células (GRAF. 2).

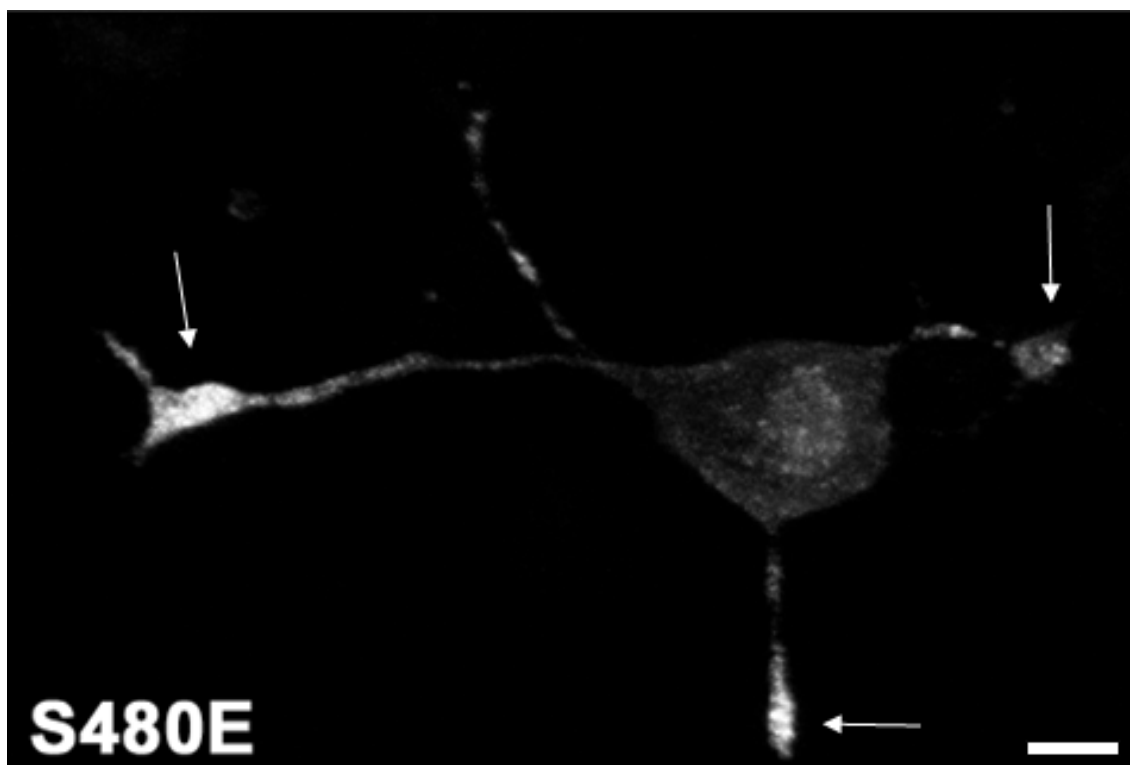
Gráfico 2 – Fluorescência encontrada no corpo celular e nas varicosidades das células PC12 contendo o GFP VACHT S480E



Observe que a fluorescência se mostrou marcante nas varicosidades da maioria das células analisadas com o GFP VACHT S40E.

A imagem de uma das células analisadas mostra a presença marcante do GFP nas varicosidades (FIG. 3).

Figura 3 - Reconstrução digital de célula PC12 expressando GFP-VACHT S480E



Nota: Imagem do plano Z vertical, obtida por meio de microscopia confocal com objetiva de 40x de imersão em água, utilizando laser no comprimento de onda de 488nm. Barras = 10 μ m. Observe que a fluorescência se acumula nas varicosidades (indicadas pelas setas).

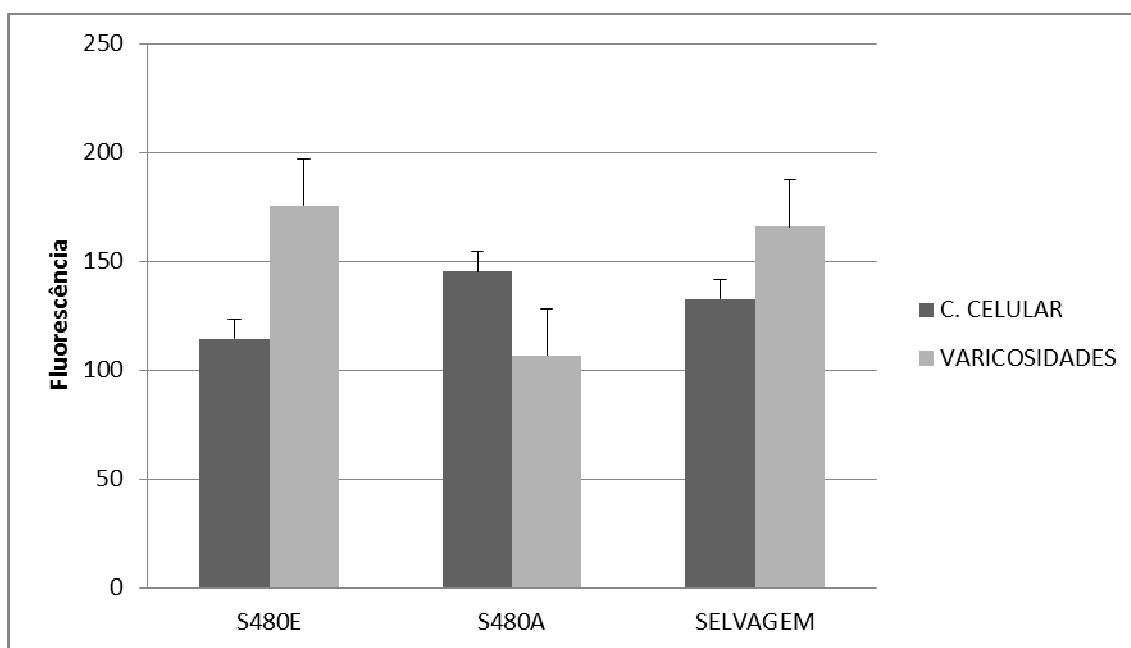
As células PC12 também foram transfectadas com o VACHT selvagem ligado ao GFP. Este experimento foi analisado por microscopia confocal e sua fluorescência obtida com um comprimento de onda de 488 nm. E, mais uma vez, os resultados foram obtidos com base na quantificação da fluorescência das células PC12.

Nas células transfectadas com o VACHT Selvagem, foi analisado o total de quinze células de dois experimentos independentes. Os resultados obtidos mostraram uma variabilidade grande entre a fluorescência do corpo celular e da varicosidade (dados não mostrados). Este resultado é esperado já que as células possuem o VACHT selvagem, podendo, assim, ele ser ou não fosforilado.

Para confirmar que o GFP VACHT S480E se direciona com muita intensidade para as varicosidades em relação ao GFP VACHT S480A, foi calculada a média de fluorescência do corpo e das varicosidades de todas as células desses dois mutantes e do VACHT selvagem. As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste Turkey-Kramer. Os resultados estatísticos mostraram que os mutantes GFP VACHT S480A e GFP VACHT S480E apresentaram uma diferença estatística significativa entre o corpo celular e as varicosidades.

O VACHT no estado fosforilado (GFP VACHT S480E) se direciona com muito mais intensidade para as varicosidades das células PC12 em relação ao VACHT no estado não fosforilado (GFP VACHT S480A). Este resultado indica que a fosforilação do VACHT, provavelmente, é um importante mecanismo usado pelas células neuronais para controlar a quantidade do VACHT que será enviada para as terminações nervosas. Já as células transfectadas com o VACHT Selvagem não apresentaram diferença estatística.

Gráfico 4 – Resultado de todas as médias obtidas dos mutantes VACHT S480A e VACHT S480E e VACHT Selvagem



Observe que a média encontrada nas células com o GFP VACHT S480E e S480A mostra uma diferença estatística significativa entre o corpo celular e as varicosidades. O GFP VACHT S480E é mais presente nas varicosidades das células PC12.

Os resultados mostraram que os mutantes GFP VACHT S480A e GFP VACHT S480E apresentaram uma diferença estatística significativa entre o corpo celular e as varicosidades. O VACHT no estado fosforilado (GFP VACHT S480E) se direciona com muito mais intensidade para as varicosidades das células PC12 em relação ao VACHT no estado não fosforilado (GFP VACHT S480A). As células transfectadas com o GFP VACHT S480E apresentaram um valor de fluorescência na varicosidade de aproximadamente 170 (unidade arbitrária). Já as células transfectadas com o GFP VACHT S480A apresentaram um valor de fluorescência de aproximadamente 100 (unidade arbitrária). Além disso, as células

transfectadas com o GFP VACHT S480E apresentaram suas varicosidades com 36% mais fluorescência que os corpos celulares. Nas células transfectadas com o GFP VACHT S480A, os corpos celulares é que apresentaram uma maior fluorescência (20%) em relação às varicosidades. Estes resultados indicam que a fosforilação do VACHT, provavelmente, é um importante mecanismo usado pelas células neuronais para controlar a quantidade do VACHT que será enviada para as terminações nervosas.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a fosforilação do VACHT altera a sua localização nas células PC12 no estado fosforilado, se concentrando de forma marcante nas varicosidades das células, onde a ACh é liberada para a realização da sinapse. Já em células apresentando o mutante não fosforilado (GFPVACHT S480A), a sua localização foi marcante no corpo celular.

5 DISCUSSÃO

Outros estudos foram realizados sugerindo uma mudança no tráfego do VACHT após a sua fosforilação (BARBOSA JUNIOR, 2002; BARBOSA JUNIOR et al., 1997; CHO et al., 2000; KRANTZ et al., 2000). E os resultados desses estudos condizem com os deste trabalho, pois, de acordo com os resultados obtidos, nas células PC12 transfectadas com GFP VACHT S480E (estado fosforilado), o VACHT se acumulou preferencialmente nas varicosidades das células. Já nas células transfectadas com GFP VACHT S480A (estado não fosforilado), o VACHT se acumulou de forma marcante no corpo celular. Portanto, a fosforilação do VACHT alterou o seu tráfego nas células PC12.

Experimentos realizados por Cho et al. (2000) sugerem que a retirada da serina 480 (sítio de fosforilação do VACHT) indica que a fosforilação exerce um importante papel no tráfego dessa proteína. Para esta pesquisa, foi utilizado o mutante S480A, que mimetiza o estado não fosforilado do VACHT, para mostrar que a serina 480 é o exclusivo sítio de fosforilação da proteína. Este estudo mostrou que o transporte de acetilcolina e a ligação com a droga vesamicol não são induzidos pela fosforilação do VACHT. E mostrou, ainda, que o mutante no estado não fosforilado (S480A) não foi direcionado para SLMVs, pequenas vesículas sinápticas onde o VACHT normalmente se localiza em células PC12 (KRANTZ et al., 2000).

Já um estudo realizado por Krantz et al. (2000) mostrou que o VACHT fosforilado em células PC12 é direcionado para LDCVs (vesículas maiores que se encontram em todas as partes da célula e liberam transmissores de forma mais lenta - local onde normalmente se

encontram os VMATs que estão fortemente ligados ao VACHT), e que o VACHT no estado não fosforilado diminui a concentração da proteína em LDCVs. Para se chegar a este resultado, além do mutante S480A, também foi utilizado o mutante S480E; que mimetiza o estado fosforilado do VACHT, e o VACHT selvagem. Foi demonstrado que os mutantes, assim como o VACHT selvagem, não tiveram suas funções catalíticas alteradas e que o VACHT no estado fosforilado (S480E) se concentrou de forma marcante nas varicosidades das células PC12.

Mas não só a fosforilação do VACHT foi investigada, como também a fosforilação de outras proteínas neuronais já foi alvo de investigação. Experimentos realizados por Vaughan et al. (1997) mostraram que o transportador de dopamina, o DAT, sofre fosforilação rápida após ativação da PKC e que isso fez com que a atividade do transporte de dopamina fosse reduzida. Isso foi comprovado por Daniels e Amara (1999), que mostraram que a redução do transporte de dopamina após a fosforilação do DAT é provocada pela internalização rápida do transportador na membrana plasmática, ou seja, o transportador sofre uma endocitose mediada por clatrina diminuindo, assim, a atividade do transportador de dopamina.

Ainda não se sabe quais são as consequências fisiológicas da fosforilação do VACHT (BARBOSA JUNIOR et al., 1997). Mas, o fato de o mutante fosforilado se acumular nas varicosidades das células PC12 supõe que, possivelmente, a liberação de ACh nos terminais nervosos aumente. Estudos realizados por Barbosa Junior et al. (1997) mostraram que a ativação farmacológica de mecanismos de fosforilação, como a PKC, pode induzir a liberação de [3H]ACh em terminações nervosas de hipocampo na presença de vesamicol (inibidor do VACHT). Portanto, esses dados indicam que a neurotransmissão colinérgica possa ser modificada com a fosforilação do VACHT e que, possivelmente, o tráfego da proteína também possa ser modulado.

Segundo Barbosa Junior (2002), o VACHT passa pela membrana plasmática antes de chegar às varicosidades. Porém, foi demonstrado que o VACHT no estado fosforilado é direcionado diretamente às varicosidades, reduzindo a sua passagem pela membrana celular (BARBOSA JUNIOR, 2002). Segundo o mesmo autor, o tráfego do VACHT pode ser influenciado por vários outros sinais, além da fosforilação.

As consequências da fosforilação do VACHT devem ser melhor elucidadas, pois esse evento pode influenciar na transmissão colinérgica, podendo, assim, contribuir com novos conhecimentos para o tratamento de doenças caracterizadas pelo déficit de acetilcolina como, por exemplo, o mal de Alzheimer e Miastenia grave.

REFERÊNCIAS

BARBOSA JUNIOR, J.; CLARIZIA, A. D.; GOMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, V. F.; PRADO M. A. Effect of protein kinase C activation on the release of [3H]acetylcholine in the presence of vesamicol. **Journal of Neurochemistry**, v. 6, n. 69, p. 2608-2611, dez. 1997.

BARBOSA JUNIOR, J.; FERREIRA, L. T.; MARTINS-SILVA, C.; SANTOS, M. S.; TORRES, G. E.; CARON, M. G.; GOMEZ, M. V.; FERGUSSON, S. S. G.; PRADO, M. A. M.; PRADO, V. F. Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamim-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, p. 1221-1228, 2002.

CHEN, K. H. et al. Disturbed neurotransmitter transporter expression in Alzheimer's disease brain. **Journal of Alzheimer disease**, v. 4, n. 26, p. 755-766, Jan. 2011.

CHO, G. W.; KIM, M. H.; CHAI, Y. G.; GILMOR, M. L.; LEVEY, A. I.; HERSEH, L. B. Phosphorylation of the rat vesicular acetylcholine transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 379-396, Feb. 2000.

DANIELS, G. M.; AMARA, S. G. Regulated trafficking of the human dopamine transporter. Clathrin-mediated internalization and lysosomal degradation in response to phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, n. 4, v. 50, p. 35794-35801, July 1999.

EDWARDS, R. H. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. **Neurobiology**, v. 91, n. 22, p. 10620-10624, Oct. 1994.

ERICKSON, J. D.; VAROQUI, H.; SCHAFFER, M. K.; MODI, W.; DIEBLER, M. F.; WEIHE, E.; RAND, J.; EIDEN, L. E.; BONNER, T. I.; USDIN, T. B. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 35, p. 21929-21032, Sept. 1994.

KHARE, P.; MALAKALURI, A.; PARSONS, M. S. Search for the acetylcholine and vesamicol binding sites in vesicular acetylcholine transporter: the region around the luminal end of the transport channel. **Journal of Neurochemistry**, v. 4, n. 115, p. 984-993, Nov. 2010.

KRANTZ, D. E.; WAITES, C.; OORSCHOT, V.; WILSON, R. I.; TAN, P. K. KLUMPERMAN, J.; EDWARDS, R. H. A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. **Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 2, p. 379-396, Apr. 2000.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 24, n. 272, p. 15541-15546, Mar. 1997.

Fontes financiadoras do projeto: FAPEMIG e UNIFOR-MG.