proLékaře.cz | 1.7.2025

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

Myši s absenciou jednotlivých molekulových foriem cholínesteráz

Mice lacking individual molecular forms of cholinesterases

Matej Kučera • Anna Hrabovská

Došlo 18. novembra 2015 / Prijato 29. februára 2016

Súhrn

Acetylcholínesteráza (AChE) a butyrylcholínesteráza (BChE) tvoria malú rodinu enzýmov nazývaných cholínesterázy. Tieto enzýmy sú v organizme buď solubilné, alebo kotvené prostredníctvom kotviacich proteínov kolagénu Q (ColQ) a membránovej kotvy bohatej na prolín (PRiMA). Poznatky z molekulovej biológie a genetiky cholínesteráz a ich kotviacich proteínov viedli ku príprave mutantných myší s absenciou rôznych molekulových foriem cholínesteráz. Do dnešných dní bolo pripravených viacero mutantných myší s genetickou modifikáciou na úrovni génov pre cholínestrázy alebo ich kotviace proteíny. Medzi myši s mutáciou v génoch kódujúcich cholínesterázy patria predovšetkým: myši s celkovou absenciou AChE, myši s celkovou absenciou BChE, myši s deléciou exónu 5 a 6 v géne kódujúcom AChE a myši s absenciou AChE vo svaloch. Medzi myši s mutáciou v génoch kódujúcich kotviace proteíny cholínesteráz patria: myši s absenciou AChE a BChE kotvenej prostredníctvom proteínu ColQ a myši s absenciou AChE a BChE kotvenej prostredníctvom proteínu PRiMA. Na základe štúdia zmien vyplývajúcich z absencie cholínesteráz, tieto mutantné zvieratá výrazne prispeli k obohateniu doterajších poznatkov o cholínesterázach a cholinergickom nervovom systéme.
Kľúčové slová: absencia cholínesteráz • mutantné myši • acetylcholínesteráza • butyrylcholínesteráza

Summary

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) represent a small family of enzymes called cholinesterases. These enzymes are in the organisms either soluble or anchored through anchoring proteins collagen Q (ColQ) and proline-rich membrane anchor (PRiMA). Knowledge of molecular biology and genetics of cholinesterase and their anchoring proteins resulted in the preparation of mutant mice with the absence of different molecular forms of cholinesterases. So far a number of mutant mice were prepared with a genetic modification on the genes encoding cholinesterases or anchoring proteins. The mice with mutation in the genes encoding the cholinesterases are: the mice with the absence of AChE, mice with the absence of BChE, mice with a deletion of exon 5 and 6 in the AChE gene and mice with the absence of AChE in muscles. The mice with a mutation in the genes encoding anchoring proteins include the mice with the absence of AChE and BChE anchored by ColQ and mice with the absence of AChE and BChE anchored by PRiMA. The study of adaptation changes results from the absence of cholinesterases led to the enrichment of existing knowledge about cholinesterases and the cholinergic nervous system.
Key words: absence of cholinesterases • mutant mice • acetylcholinesterase • butyrylcholinesterase

PharmDr. Matej Kučera (✉) • A. Hrabovská
Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského
Katedra farmakológie a toxikológie
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: kucera@fpharm.uniba.sk

Úvod

U cicavcov sa vyskytujú dva druhy cholínesteráz, acetylcholínesteráza (AChE) a butyrylcholínesteráza (BChE). Tieto enzýmy predominantne štiepia estery cholínu vrátane neuromediátora acetylcholínu (ACh). Od druhej dekády 20. storočia sa cholínesterázy tešia neutíchajúcemu záujmu odbornej verejnosti, o čom svedčí z roka na rok narastajúce množstvo publikovanej vedeckej literatúry[1)]. Jedným z mnohých dôvodov tohto stúpajúceho záujmu je skutočnosť, že AChE patrí medzi kľúčové enzýmy cholinergickej transmisie, kde sa podieľa na degradácii ACh[2)], zohráva kľúčovú úlohu v cholinergickom systéme centrálnej nervovej sústavy[3)] a jej inhibícia má závažné, v mnohých prípadoch až fatálne následky[4)]. Druhým z dôvodov je BChE, ktorá je známa už od roku 1932[1)], ale do dnešných dní nepozná-

proLékaře.cz | 1.7.2025

me jej fyziologický substrát. BChE zohráva významnú úlohu pri degradácii mnohých xenobiotík[5] a zmeny jej hladín sa čím ďalej tým viac spájajú s rôznymi ochoreniami, ako je napríklad Alzheimerova choroba[6], dyslipidémia[7] a mnohé iné. V ľudskom tele sa nachádza až desať násobne viac BChE ako AChE[8].

AChE a BChE sú rozdielne enzýmy kódované dvoma samostatnými génmi[9, 10]. Gén kódujúci AChE podlieha u cicavcov počas transkripcie alternatívnemu zostrihu. Dochádza tak ku vzniku troch rôznych variantov AChE, ktoré majú rovnakú katalytickú podjednotku, ale odlišný C-terminálny peptid. Jedná sa o $AChE_R$, $AChE_H$ a $AChE_T$[11]. Na rozdiel od AChE, gén kódujúci BChE nepodlieha v priebehu transkripcie alternatívnemu zostrihu. V organizme sa preto vyskytuje iba jeden variant BChE[10].

Najmenej zastúpeným variantom AChE v organizme je $AChE_R$ (z angl. readthrough). Vzniká v prípade absencie alternatívneho zostrihu transkripciou časti intrónu 4[12]. Vyskytuje sa vo forme monomérov[11]. Zmeny hladín $AChE_R$ sú zvyčajne spájané so stresom[13], oxidačným stresom[14] a niektorými patologickými stavmi[15]. Napríklad u pacientov trpiacich cirhózou pečene dochádza k nárastu hladín $AChE_R$ v parenchymálnych bunkách[16]. Pri navodenej apoptóze bol pozorovaný až osem násobný nárast hladín $AChE_R$[17]. Naopak zníženie hladín $AChE_R$ sa vyskytuje u Alzheimerovej choroby[18].

Druhým najmenej zastúpeným variatom AChE je $AChE_H$ (z angl. hydrophobic). Ku jej vzniku dochádza v prípade alternatívneho zostrihu na exón 5. Tento exón kóduje C-terminálny peptid, ktorý zabezpečuje spojenie katalytickej podjednotky s glykofosfatydylinozitolovou kotvou (GPI)[19]. $AChE_H$ sa nachádza prevažne v neneuronálnom tkanive, ako je napríklad hrubé črevo[20], kostná dreň, týmus, pečeň poprípade obličky. V týchto tkanivách má najväčší podiel na celkovej aktivite AChE[21]. $AChE_H$ kotvená GPI sa nachádza aj v lipidových raftoch na sarkoléme buniek kostrových svalov[22]. Okrem tkanív sa tento variant AChE nachádza aj na povrchu krvných buniek. Konkrétne sa jedná o erytrocyty[23] a niektoré kmeňové bunky[19].

Najviac zastúpený variant AChE v organizme je $AChE_T$ (z angl tailed). Vzniká na základe alternatívneho zostrihu exónu 6. Tento exón kóduje C-terminálny peptid nazývaný aj T-peptid, ktorý umožňuje tvorbu širokej škály molekulových foriem $AChE_T$[11, 24, 25]. Ako bolo spomenuté vyššie BChE, nepodlieha alternatívnemu zostrihu, a tým pádom existuje vo forme jedného transkripčného variantu. C-terminálny peptid BChE je takmer totožný s C-terminálnym T-peptidom $AChE_T$[10]. Z toho dôvodu má BChE rovnaké schopnosti vytvárať širokú škálu molekulových foriem ako $AChE_T$ a často ju označujeme ako $BChE_T$. Molekulové formy $AChE_T$ a $BChE_T$ sa rozdeľujú na homo-oligomérne formy, ktoré sú tvorené iba katalytickými podjednotkami, a na hetero-oligomérne formy, ktoré sú tvorené katalytickými podjednotkami a kotviacimi proteínmi. Medzi homo-oligomérne formy zaraďujeme solubilné monoméry, diméry a tetraméry. Na druhej strane medzi hetero-oligomérne formy zaraďujeme asymetrimetckú formu a tetramér kotvený malým transmembránovým proteínom[11, 24–26]. Asymetrická forma sa skladá z kotviaceho proteínu kolagénu Q (ColQ), ktorý kotví jeden, dva alebo tri tetraméry katalytických podjednotiek. Táto molekulová forma cholínesteráz je predominantná v kostrovom svale[27–29]. Okrem kotvenia cholínesteráz sa ColQ podieľa aj na zhlukovaní acetylcholínových receptorov a na regulácii génovej expresie na synapsách[30]. V prípade absencie alebo mutácie v géne kódujúcom ColQ dochádza k rozvoju niektorých foriem kongenitálneho myastenického syndrómu[31]. Druhá hetero-oligomérna forma sa skladá z malého transmembránového proteínu, ktorý sa nazýva aj proteín PRiMA (z angl. proline-rich membrane anchor) a jedného tetraméru katalytických podjednotiek[32]. Teramér katalytických podjednotiek býva zložený z podjednotiek – buď AChE, alebo BChE. Avšak v kuracom mozgu bola preukázaná prítomnosť tetramérov zložených z dvoch katalytických podjednotiek AChE a dvoch katalytických podjednotiek BChE kotvených prostredníctvom proteínu PRiMA[33]. Cholínesterázy kotvené proteínom PRiMA sú predominantné v nervovej sústave. Okrem kotvenia cholínesteráz zohráva proteín PRiMA kľúčovú úlohu pri bunkovom transporte a lokalizácii AChE[34]. Nedávno bolo preukázané, že proteín PRiMA môže byť štiepený γ-sekretázovým komplexom konkrétne jeho katalytickou zložkou presenilin-1[35].

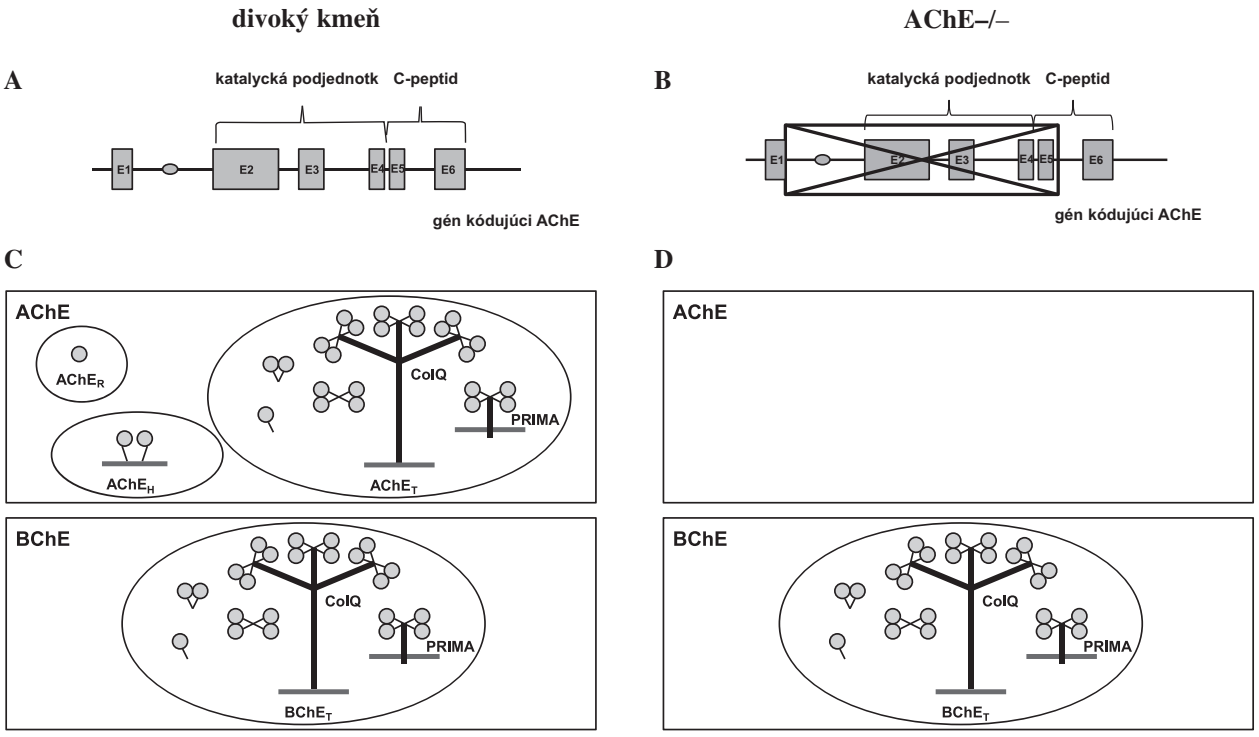
Hetero-oligomérne formy vznikajú na základe hydrofóbnych interakcií medzi doménou WAT (z angl. tryptophan (W) amphiphilic tetramerization) C-terminálneho T-peptidu cholínesteráz a doménou PRAD (z anglického proline-rich attachment domain), ktorá sa nachádza na N-terminálnom konci kotviacich proteínov ColQ a PRiMA. Ku vlastnej interakcii dochádza medzi jednou doménou PRAD a štyrmi doménami WAT[36, 37].

Myši s mutáciou v génoch kódujúcich cholínesterázy

AChE–/–

Myši s absenciou AChE (AChE–/–) boli pripravené pomocou génovej technológie (pre viac informácii viď publikácie[38, 39]. V géne kódujúcom AChE[9] (obr. 1A) bola odstránená oblasť dlhá 5kb, ktorá sa nachádza medzi intrónom 1 a exónom 5 (obr. 1B). Vymazaná oblasť kóduje až 93% sekvencie AChE vrátane katalytickej domény enzýmu[38]. U týchto myší sa nevyskytuje žiadna detegovateľná aktivita AChE v sére ani v tkanivách[41]. Je prekvapujúce, že hladiny BChE nie sú u AChE–/– myší zmenené, a to aj napriek tomu, že BChE participuje na hydrolýze ACh. V mozgu AChE–/– myší je 75–83 % extracelulárneho ACh hydrolyzovaného BChE. Tento enzým je teda kľúčový z hľadiska existencie, respektíve prežívania AChE–/– myší[42, 43]. Tomu nasvedčuje aj skutočnosť, že napriek snahám viacerých výskumných tímov sa do dnešných dní nepodarilo pripraviť „dvojité“ mutanty, ktorým by chýbala AChE aj BChE. V prípade absencie AChE je aj napriek prítomnosti BChE značne obmedzená degradácia ACh, a tým pádom dochádza k enormnému nárastu jeho hladín v tkanivách. Napríklad v hipokampe je možné detegovať až 60-násobne vyššie hladiny ACh ako u divokého kmeňa[43]. Takéto vysoké hladiny ACh v tkanivách sú zodpovedné za výrazné zmeny vo fenotype AChE–/– myší[44].

proLékaře.cz | 1.7.2025



Obr. 1. Delécia časti génu kódujúceho AChE (A (divoký kmeň) vs. B (AChE–/–)), ktorá viedla k príprave myší s absenciou všetkých molekulových foriem AChE (C (divoký kmeň) vs. D (AChE–/–))[11, 38–40]

Tesne po narodení sú AChE–/– myši na nerozoznanie od divokého kmeňa, avšak už po pár dňoch sa u nich začínajú objavovať zmeny vo fenotype. Mláďatá majú spomalený rast reprezentovaný oneskoreným zvyšovaním hmotnosti[39]. Bez špeciálnej starostlivosti umierajú niektoré jedince ešte pred dosiahnutím dospelosti. Najvyššiu úmrtnosť AChE–/– myší je možné zaznamenať medzi 13. až 21. dňom po narodení. Kŕmenie AChE–/– myší tekutou a na tuky bohatou potravou vedie k výraznému predĺženiu ich života a jedince sa dožívajú viac ako jeden rok[45]. Okrem menšieho vzrastu je možné na prvý pohľad pozorovať tras počas pohybu aj v pokoji, atypické držanie tela a abnormálnu chôdzu[44]. Výrazná slabosť kostrových svalov[45], ktorá je u týchto myší takisto prítomná, je s najväčšou pravdepodobnosťou zapríčinená zmenami na úrovni nervovo-svalovej platničky. Zakončenie motorického neurónu na nervovo-svalovej platničke je fragmentované na niekoľko častí, ktoré obklopujú postsynaptické nervové vlákno. Schwannové bunky, ktoré sú za normálnych okolností lokalizované na povrchu motorického neurónu, zasahujú do synaptickej štrbiny. Okrem toho dochádza na nervovo-svalovej platničke aj k zníženiu počtu nikotínových receptorov (NR)[42]. Podobné zníženie počtu NR na nervovo-svalovej platničke je možné pozorovať aj v prípade aplikácie inhibítorov cholínesteráz – organofosfátov[46]. Všetky tieto pozorovania je možné pripísať vysokým hladinám ACh. BChE, ktorá sa nachádza na nervovo-svalovej platničke aspoň čiastočne hydrolyzuje ACh, a tým chráni NR pred nadmernou stimuláciou[47]. Napriek tomu BChE plnohodnotne nezastupuje AChE, nakoľko jej hladiny na nervovo-svalovej platničke sú relatívne nízke[48].

V AChE–/– myšiach je možné okrem nervovo-svalovej platničky pozorovať výrazné zmeny aj na úrovni centrálnej nervovej sústavy. Chýbanie AChE nespôsobuje žiadne zjavné histologické zmeny neuronálnych ani gliových buniek, či prítomnosť patologických štruktúr[49–51]. Avšak ako už bolo spomenuté vyššie AChE–/– myši majú v mozgu až 60-násobne vyššie hladiny ACh ako myši divokého kmeňa[43]. Takéto extrémne vysoké hladiny ACh bezpodmienečne vedú k adaptačným zmenám, ktoré umožňujú prežívanie AChE–/– myší. Najvýraznejšie zmeny je možné pozorovať na úrovni muskarínových receptorov (MR). V hipokampe, časti mozgu spájanou s pamäťou a priestorovou orientáciou, dochádza k 50–80% poklesu hladín M_1R, M_2R a M_4R na povrchu buniek[52]. Podobne ako v hipokampe, aj v striate a v kortexe (M_2R) dochádza k poklesu počtu MR[53, 54]. Nižšie hladiny MR boli preukázané aj funkčnými farmakologickými experimentmi. Dôkazom poklesu hladín MR je zníženie prahu na vznik kŕčov po aplikácii pilokarpínu (M_1R), zníženie salivácie (pravdepodobne M_3R), analgetickej odpovede (pravdepodobne M_2R a M_4R) a trasu (pravdepodobne M_2R) po aplikácii oxotremorínu[55]. Pri podrobnejšom výskume bolo zistené, že k spomínanému poklesu MR dochádza iba na povrchu neurónov[52]. Naopak v intracelulárnom prostredí (endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát) dochádza ku kumulácii MR. Zvýšenie degradácie ACh prostredníctvom exogénnej AChE alebo blokovanie MR má za následok zvýšenie hladín MR na povrchu neurónov a zníženie hladín intracelulárnych MR[54].

Okrem vyššie spomínaného zníženia hladín MR v mozgu bol v mozgovom kmeni AChE–/– myší preukázaný aj pokles hladín NR[56]. Popri zmenách na úrovni cholinergických MR alebo cholinergických NR nastávajú pri chýbaní AChE adaptačné zmeny aj v iných receptorových systémoch, ako je napríklad dopaminergický[57] alebo adrenergický[58]. V striate AChE–/– myší je možné pozorovať oveľa výraznejší pokles dopaminergických

proLékaře.cz | 1.7.2025

receptorov ako cholinergických MR alebo NR[57]. Kým hladiny MR sú v porovnaní s divokým kmeňom znížené o 54–83 %[52], D1 podtyp dopaminergických receptorov sa vyznačuje 95% poklesom a D2 podtyp dopaminergických receptorov poklesom až na hranicu detekcie[57].

Pri absencii AChE dochádza k poklesu hladín receptorov nielen na nervovo-svalovej platničke a v centrálnej nervovej sústave, ale aj v iných tkanivách. Napríklad v pľúcach je možné pozorovať až o 50 % nižšie hladiny MR ako u myší divokého kmeňa. Popritom dochádza v pľúcach AChE–/– myší aj k poklesu hladín adrenergických receptorov. Konkrétne sa jedná o α_1 a β-receptory. Súčasne s poklesom hladín spomínaných adrenergických receptorov nastáva aj zmena ich vzájomného pomeru[58]. Dramatické adaptačné zmeny v hladinách cholinergických receptorov (MR a NR) a takisto aj iných receptorových systémov (dopaminergický a adrenergický) sa zdajú byť kľúčové z hľadiska prežívania AChE–/– myší.

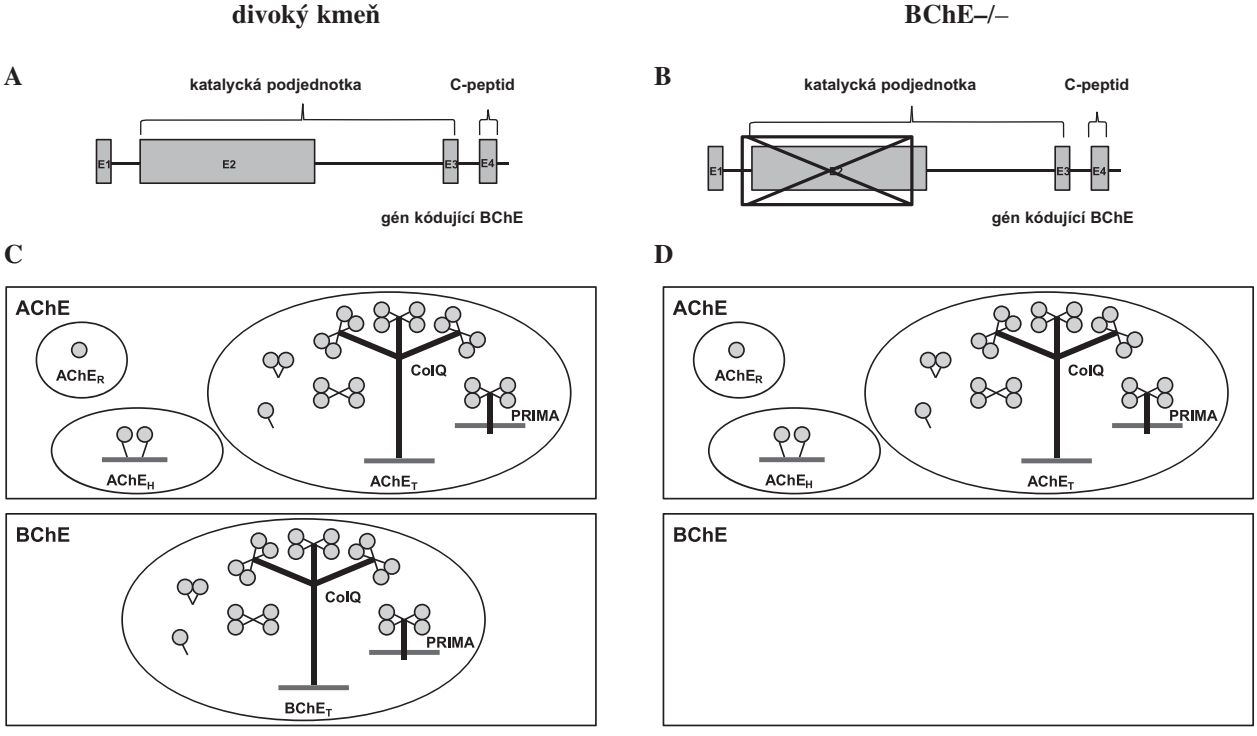
AChE–/– myši sa líšia od myší divokého kmeňa aj vo vývine termoregulácie, ktorá je u týchto mutantov oneskorená. Počas rastu a dospievania musia byť preto AChE–/– myši chované na vyhrievacej platni. Rozdiely v telesnej teplote medzi AChE–/– myšami a myšami divokého kmeňa možno pozorovať aj v dospelosti. Kým priemerná telesná teplota myší divokého kmeňa je 37,1 °C, u myší s absenciou AChE dosahuje iba 36,5 °C[45]. Poruchu termoregulácie u AChE–/– myší potvrdzuje zistenie, že aplikácia či už agonistu MR oxotremorínu alebo inibítora AChE donepezilu im nespôsobuje pokles telesnej teploty ako u myší divokého kmeňa[3, 55]. Farmakologické experimenty na PRiMA–/– a Del E5+6–/– myšiach preukázali, že hypotermia navodená oxotremorínom má svoj pôvod v mozgu, a naopak hypotermia navodená donepezilom má svoj pôvod na periférii. Z toho vyplýva, že v prípade absencie AChE dochádza k poruche termoregulácie nielen v centrálnej nervovej sústave, ale aj na periférii[3, 59]. Niektorí autori pripisujú poruchu termoregulácie downregulácii NR vo vegetatívnych gangliách sympatiku[40].

Zaujímavé je, že AChE–/– myši pri narušení ich prostredia vydávajú charakteristické piskľavé zvuky[45]. Rovnakými zvukmi sa prejavujú aj mutantné myši Del E 5+6–/– a ColQ–/– popísané nižšie[27, 60]. Podobné zvuky možno pozorovať aj u myší divokého kmeňa, avšak len pri extrémnych stresových podmienkach[45].

Aplikácia selektívneho inhibítora BChE bambuterolu nespôsobuje myšiam divokého kmeňa žiadne známky toxicity, avšak u AChE–/– myší vyvoláva rovnaká dávka bambuterolu vážne príznaky cholinergickej intoxikácie[39]. Tento toxický efekt bambuterolu je u mutantných myší pripisovaný inhibícii BChE v periférnych tkanivách[56]. To naznačuje, že BChE participuje na degradácii ACh v AChE–/– myšiach a čiastočne u nich nahrádza funkciu AChE[39, 50].

BChE–/–

Mutantné myši s absenciou BChE (BChE–/–) boli pripravené vymazaním časti exónu 1, intrónu 1 a veľkej časti exónu 2 v géne kódujúcom BChE. Vymazanie veľkej časti exónu 2 bolo použité pri príprave BChE–/– myší z toho dôvodu, že tento exón kóduje až 84 % myšacej BChE vrátane signálneho peptidu a 478 z celkového počtu 574 aminokyselín proteínu (obr. 2)[61]. BChE–/– myši nemajú podľa očakávania v tkanivách ani v plazme žiadnu detegovateľnú aktivitu BChE[62] a nedochádza u nich ani ku kompenzačnému zvýšeniu hladín AChE[63]. Na prvý pohľad nie je možné rozpoznať BChE–/– myši od myší divokého kmeňa. Na rozdiel od AChE–/– myší sa nevyznačujú žiadnymi poruchami rastu[62], abnormál-



Obr. 2. Delécia časti génu kódujúceho BChE (A (divoký kmeň) vs. B (BChE–/–)), ktorá viedla ku príprave myší s absenciou BChE (C (divoký kmeň) vs. D (BChE–/–))[11, 61]

proLékaře.cz | 1.7.2025

nym držaním tela ani svalovou slabosťou. Ich telesná teplota je približne zhodná s teplotou tela myší divokého kmeňa. Srdcová frekvencia, tlak krvi a ani dýchanie nie sú v porovnaní s divokým kmeňom zmenené. Li et al.[63] urobili širokú škálu fyziologických experimentov, no v žiadnom zo sledovaných parametrov sa BChE–/– myši nelíšili od myší divokého kmeňa[63]. Zaujímavé však je pozorovanie, že skonzumovanie rovnakej dávky krmiva so zvýšeným obsahom tukov (11 %, oproti 5 % v bežnej strave) spôsobuje u BChE–/– myší, rýchlejšie zvyšovanie hmotnosti ako u myší divokého kmeňa. V konečnom dôsledku takéto myši dosahujú až o 30 % vyššiu telesnú hmotnosť ako BChE–/– myši, ktoré sú kŕmené normálnou stravou[64]. Takéto rýchle zvyšovanie telesnej hmotnosti u BChE–/– myší pravdepodobne súvisí s úlohou BChE pri metabolizme lipidov[65]. V súlade s touto myšlienkou je aj fakt, že aktivita BChE v sére pozitívne koreluje s BMI pacientov, hladinami LDL cholesterolu, celkového cholesterolu a triglyceridmi[66]. Zmeny hladiny, respektíve aktivity BChE sú spájané s dyslipidémiou[7, 67].

Skutočnosť, že popri AChE sa aj BChE podieľa na degradácii ACh potvrdzujú experimenty nielen s AChE–/– myšami[39, 50], ale aj experimenty s BChE–/– myšami. Zatiaľ, čo aplikácia selektívneho inhibítora AChE (donepezil alebo huperzin A) spôsobuje u myší divokého kmeňa len mierne cholinergické príznaky, ako je napríklad salivácia alebo lakrimácia, tak u BChE–/– myší spôsobujú rovnaké dávky takéhoto inhibítora smrť sprevádzanú masívnymi kŕčami[62]. V ľudskej populácii sa vyskytujú jedinci, ktorí majú mutáciu v géne kódujúcom BChE. Takíto jedinci môžu mať znížené hladiny, alebo zníženú aktivitu tohto enzýmu. Z toho dôvodu je podľa autorov štúdie nutná opatrnosť pri aplikácii spomínaných selektívnych inhibítorov AChE pri terapii Alzheimerovej choroby[62, 68]. Asi najznámejším prípadom spájaným s nízkou aktivitou BChE je apnoe, ktoré nastáva po aplikácii sukcinylcholínu. Za bežných okolností je toto depolarizujúce periférne myorelaxans veľmi rýchlo metabolizované BChE na neúčinné metabolity. V prípade nízkej aktivity BChE nastáva dlhotrvajúca blokáda prenosu nervových vzruchov do bránice[69]. Rovnako aj kokaín patrí medzi látky, ktoré sú prednostne metabolizované BChE, a inhibícia BChE vedie k nárastu jeho toxicity[70]. V prípade absencie BChE dochádza k výrazným akútnym aj chronickým účinkom po jeho podávaní. Medzi akútne prejavy patrí abnormálne dýchanie charakterizované výraznými pauzami medzi jednotlivými nádychmi, pričom tieto nádychy sú veľmi hlboké. Medzi chronické prejavy patrí hepatotoxicita a srdcová perivaskulárna fibróza. U myší divokého kmeňa sa spomínané akútne a ani chronické prejavy nevyskytujú[71]. Niektorými autormi bolo navrhnuté použiť BChE–/– myši ako model ľudskej deficiencie BChE. Pomocou nich by bolo možné predvídať nežiaduce a toxické účinky nových liečiv u pacientov, ktorým chýba BChE[62]. Avšak napriek tomu, že BChE–/– myši nemajú žiadnu aktivitu BChE v tkanivách, môžeme u nich pozorovať nízku aktivitu hydrolýzy butyryltiocholínu (substrát pre BChE), ktorá je spôsobená aktivitou karboxyesterázy[63]. Vzhľadom k tomu, že u myší sa nachádzajú relatívne vysoké hladiny karboxyesterázy, ktorá u ľudí chýba, bol pripravený mutantný kmeň s absenciou BChE a karboxyesterázy. Takýto dvojitý mutant sa podľa autorov štúdie javí ako vhodnejší model pre štúdium ľudskej deficiencie BChE ako samotné BChE–/– myši[72].

AChE Del E5–/–, Del E6–/–, Del E5+6–/–

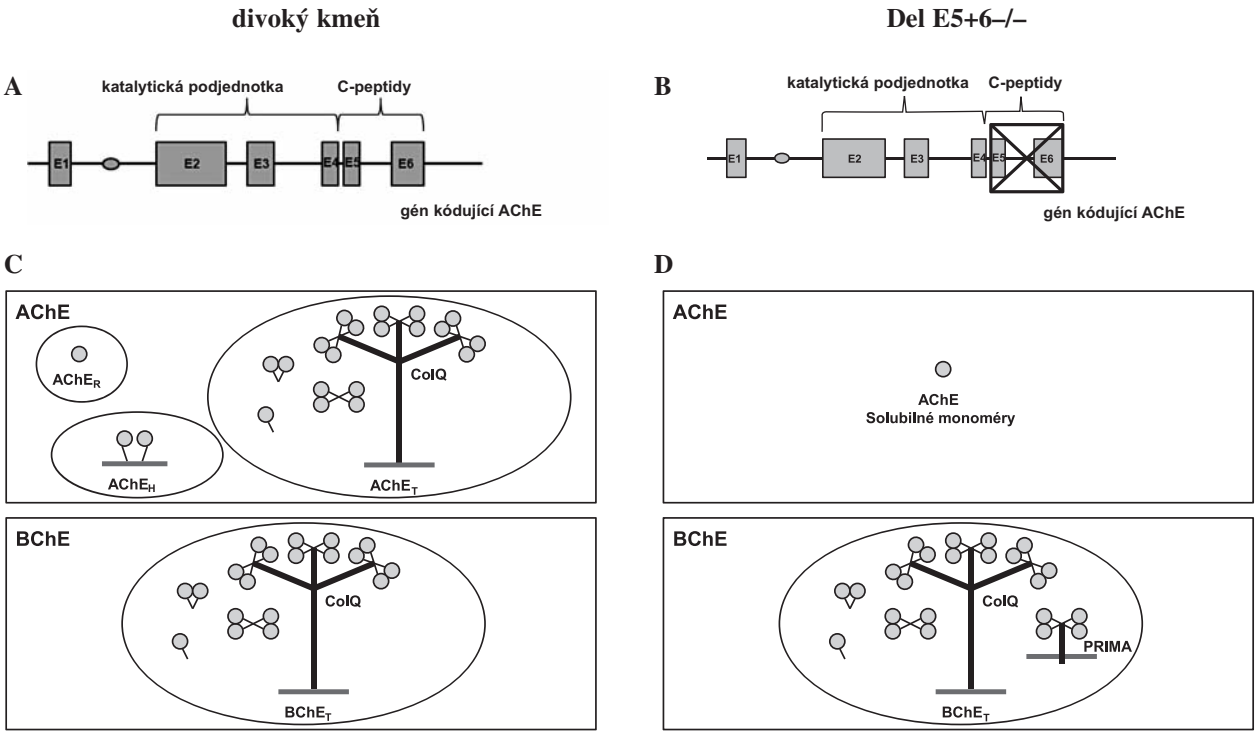
Ako bolo spomenuté vyššie, gén kódujúci AChE[9] je tvorený šiestimi exónmi pričom exóny 2–4 kódujú katalytickú doménu a exóny 5 a 6 podliehajú alternatívnemu zostrihu[11]. V prípade alternatívneho zostrihu na exón 5 vzniká $AChE_H$[19] a alternatívnym zostrihom na exón 6 $AChE_T$[11]. Tieto poznatky viedli ku príprave troch rôznych typov mutantných myší, v ktorých je deléciou sekvencie na C-konci ovplyvnená schopnosť vzájomných interakcií medzi katalytickými podjednotkami ako aj schopnosť interakcie s kotviacimi molekulami.

Del E5–/– myši boli pripravené vymazaním exónu 5[60] v géne kódujúcom AChE[9]. Majú normálnu veľkosť tela a nevyznačujú sa trasom počas pohybu[60], ako je tomu u AChE–/– myší[45]. Celková expresia AChE v mozgu a vo svaloch je u týchto myší ovplyvnená iba minimálne. Je to spôsobené tým, že v týchto tkanivách AChE vzniká predovšetkým alternatívnym zostrihom na exón 6 ($AChE_T$). Na rozdiel od toho sa na erytrocytoch a krvných doštičkách nachádza $AChE_H$ tvorená alternatívnym zostrihom na exón 5. Tým pádom Del E5–/– myši podľa očakávania neobsahujú na povrchu erytrocytov a krvných doštičiek žiadnu aktivitu AChE[60, 73]. Okrem toho u nich dochádza aj k 60% poklesu aktivity AChE v sére[60].

Del E6–/– myši boli pripravené vymazaním exónu 6[60, 74] v géne kódujúcom AChE[9]. Tieto myši sú výrazne menšie ako myši divokého kmeňa a podobne ako AChE–/– myši sa vyznačujú trasom počas pohybu. Z dôvodu, že v kostrových svaloch a v mozgu vzniká AChE na základe aternatívneho zostrihu na exón 6, dochádza u Del E6–/– myší k silnému poklesu aktivity AChE v mozgu (93 %) a kostrových svaloch (72 %). Prekvapujúce ale je, že pokles aktivity AChE nastáva aj na erytrocytoch (60 %) a krvných doštičkách (80 %), kde AChE vzniká alternatívnym zostrihom exónu 5 ($AChE_H$). Napriek 80% poklesu aktivity na povrchu krvných doštičiek dochádza v porovnaní s divokým kmeňom k dvojnásobnému zvýšeniu hladín AChE v ich intracelulárnom prostredí[60, 73].

Súčasné odstránenie exónov 5 a 6 u Del E5+6–/– myší, má za následok absenciu všetkých foriem AChE s výnimkou solubilných monomérov (obr. 3). Podobne ako Del E6–/– myši sa aj tento mutantný genotyp vyznačuje výraznými zmenami vo fenotype v porovnaní s divokým kmeňom[73]. Tieto zmeny sú v mnohých parametroch podobné alebo zhodné s AChE–/– myšami[34, 44, 45]. Napríklad Del E5+6–/– myši sú oveľa menšie ako myši divokého kmeňa a vyznačujú sa aj trasom počas pohybu[73]. Svalová sila je u týchto myší výrazne redukovaná. To sa prejavuje najmä zníženou silou úchopu[34]. V porovnaní s myšami divokého kmeňa sa neudržia na horizontálne natiahnutom tenkom drôte ani na kovovej mriežke v pozícii dolu hlavou a nedokážu sa ani vertikálne šplhať. Okrem svalovej sily je u Del E5+6–/– myší obmedzené aj balansovanie a koordinácia pohybov[60]. Narušenú funkciu kostrového svalstva potvrdzujú aj experimenty na izolovanej hemidiafragme. V prípade

proLékaře.cz | 1.7.2025



Obr. 3. Delécia exónov 5 a 6 v géne kódujúcom AChE (A (divoký kmeň) vs. B (Del E5+6–/–)), ktorá viedla ku príprave myší s absenciou AChE$_H$ a AChE$_T$ (C (divoký kmeň) vs. D (Del E5+6–/–))[11, 60]

stimulácie frénického nervu, ktorý inervuje bránicu, dochádza u Del E5+6–/– myší k vyvinutiu menšej sily kontrakcie, zášklbom, tetanickým kontrakciám a tetanickým ochabnutiam v porovnaní s divokým kmeňom[75]. Zmeny na úrovni kostrových svalov zúčastňujúcich sa na dýchaní dokazujú aj fyziologické experimenty *in vivo*. Tie preukázali, že Del E5+6–/– myši majú v porovnaní s myšami divokého kmeňa skrátený čas nádychu, väčší dychový objem a väčší inspiračný prietok[76]. Podrobnejšia analýza nervo-svalovej platničky u týchto myší preukázala podobné zmeny, aké boli pozorované u AChE–/– myší[42, 75]. U Del E5+6–/– myší nebola na nervovo-svalovej platničke zaznamenaná žiadna expresia AChE. Okrem toho u nich dochádza ku zmene lokalizácie NR, ktorá umožňuje jednoduchší únik ACh z priestoru nervovo-svalovej platničky[75].

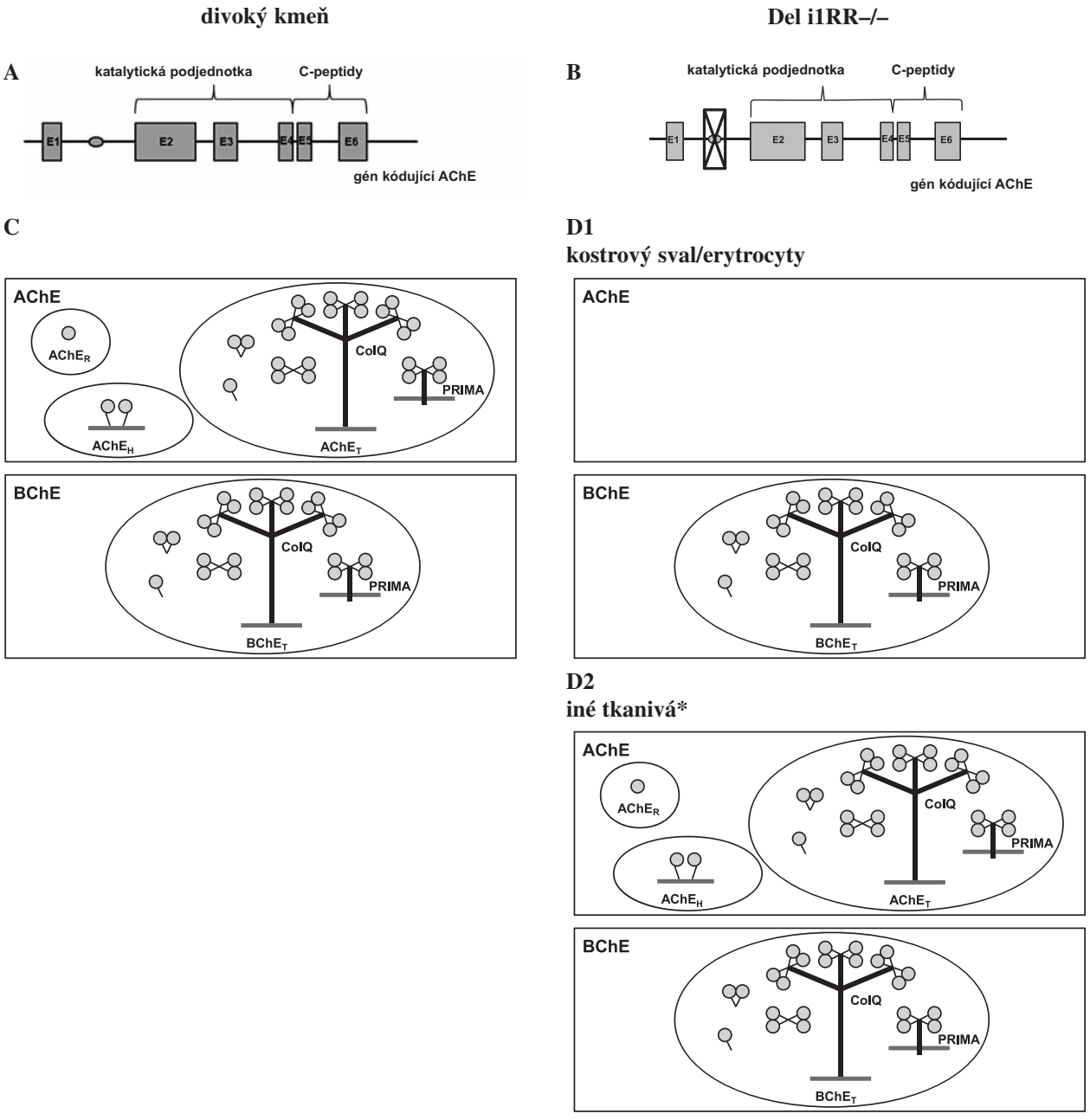
U Del E5+6–/– myší je aktivita AChE v mozgu podobná ako u AChE–/– myší[34, 60]. Detailnejšie skúmanie preukázalo, že Del E5+6–/– myši obsahujú v striate iba 2–3 % aktivity AChE v porovnaní s divokým kmeňom. Táto aktivita je lokalizovaná intracelulárne, prevažne v endoplazmatickom retikule. Absencia AChE má za následok 200–300-násobne vyššie hladiny ACh v striate, čo v konečnom dôsledku vedie k adaptačným zmenám na úrovni MR[34, 59]. Podobne ako ako v prípade AChE–/– myší[53, 54] dochádza na povrchu neurónov k poklesu hladín M_2R. Vo vnútrobunkovom prostredí neurónov sú naopak hladiny MR zvýšené[34].

Na rozdiel od AChE–/– myší je telesná teplota Del E5+6–/– jedincov porovnateľná s divokým kmeňom[3, 59, 76]. Okrem toho sa tieto mutantné myši vyznačujú podobnými zvukovými prejavmi ako AChE–/– myši. Zaujímavé je, že napriek absencii AChE v tkanivách sérum Del E5+6–/– myší obsahuje takmer dvojnásobnú aktivitu AChE ako sérum myší divokého kmeňa [60].

Del i1RR–/–

V priebehu vývoja kostrových svalov dochádza ku zmenám transkripcie veľkého počtu rôznych proteínov, vrátane AChE[77, 78]. Na regulácii expresie mRNA AChE v kostrových svaloch sa podieľa aj regulačná oblasť ktorá sa nachádza v intróne 1 v géne kódujúcom AChE[79]. Podrobný výskum preukázal, že táto regulačná oblasť má veľkosť 255 bp. Vymazaním tejto regulačnej oblasti v intróne 1 v géne kódujúcom AChE boli pripravené myší s absenciou AChE v kostrových svaloch (Del i1RR–/–) (obr. 4)[74]. V porovnaní s ColQ–/– myšami majú Del i1RR–/– myši plne zachované hladiny BChE na nervovo-svalovej platničke[73]. Na druhej strane im na nervovo-svalovej platničke chýba aj AChE kotvená proteínom PRiMA[80]. S absenciou AChE v kostrových svaloch súvisia aj zmeny vo fenotype, ktoré sú podobné AChE–/– myšiam, Del E5+6–/– myšiam a ColQ–/– myšiam[27, 44, 45, 60, 73, 74]. Del i1RR–/– myši sa vyznačujú trasom počas pohybu, svalovou slabosťou a menším vzrastom ako myši divokého kmeňa[74]. Okrem toho sa slabosť svalov participujúcich na dýchaní podpisuje pod väčší dychový objem, inspiračný prietok, oslabenú odpoveď na hyperkapniu a hypoxiu v porovnaní s jedincami divokého kmeňa[76]. Poškodenie kostrových svalov je rovnako ako u AChE–/– myší, Del E5+6–/– myší a ColQ–/– myší možné pozorovať aj na mikroskopickej úrovni[27, 42, 74, 75]. Popri kostrových svaloch, kde je aktivita AChE na úrovni 0–4 % divokého kmeňa dochádza k poklesu aktivity aj v orgánoch, ako sú napríklad pľúca (28 % aktivity AChE divokého kmeňa), či srdce (35 % aktivity AChE divokého kmeňa), alebo trachea (24 % aktivity AChE divokého kmeňa)[73]. V nervovom tkanive, ako je napríklad mozog alebo miecha, nedochádza u Del i1RR–/– myší k ovplyvneniu aktivity AChE[73]. Tak isto u týchto myší nie je zmenená aktivita AChE vo vnútorných orgánoch,

proLékaře.cz | 1.7.2025



Obr. 4. Delécia regulačnej oblasti v intróne 1 v géne kódujúcom AChE (A (divoký kmeň) vs. B (Del i1RR–/–)), ktorá viedla ku príprave myší s absenciou AChE vo svaloch a erytrocytoch (C (divoký kmeň) vs. D1, D2 (Del i1RR–/–))
**Iné tkanivá (D2) – napríklad mozog alebo miecha[11, 74]*

hladkých svaloch ani slinných žľazách. Je to spôsobené tým, že regulačná oblasť v intróne 1 ovplyvňuje expresiu AChE iba v niektorých tkanivách (napr. srdce, pľúca, kostrový sval). Prekvapujúco Del i1RR–/– myši nemajú žiadnu aktivitu AChE na krvných doštičkách, zatiaľ čo na erytrocytoch alebo v sére je aktivita AChE v porovnaní s divokým kmeňom nezmenená[73, 74].

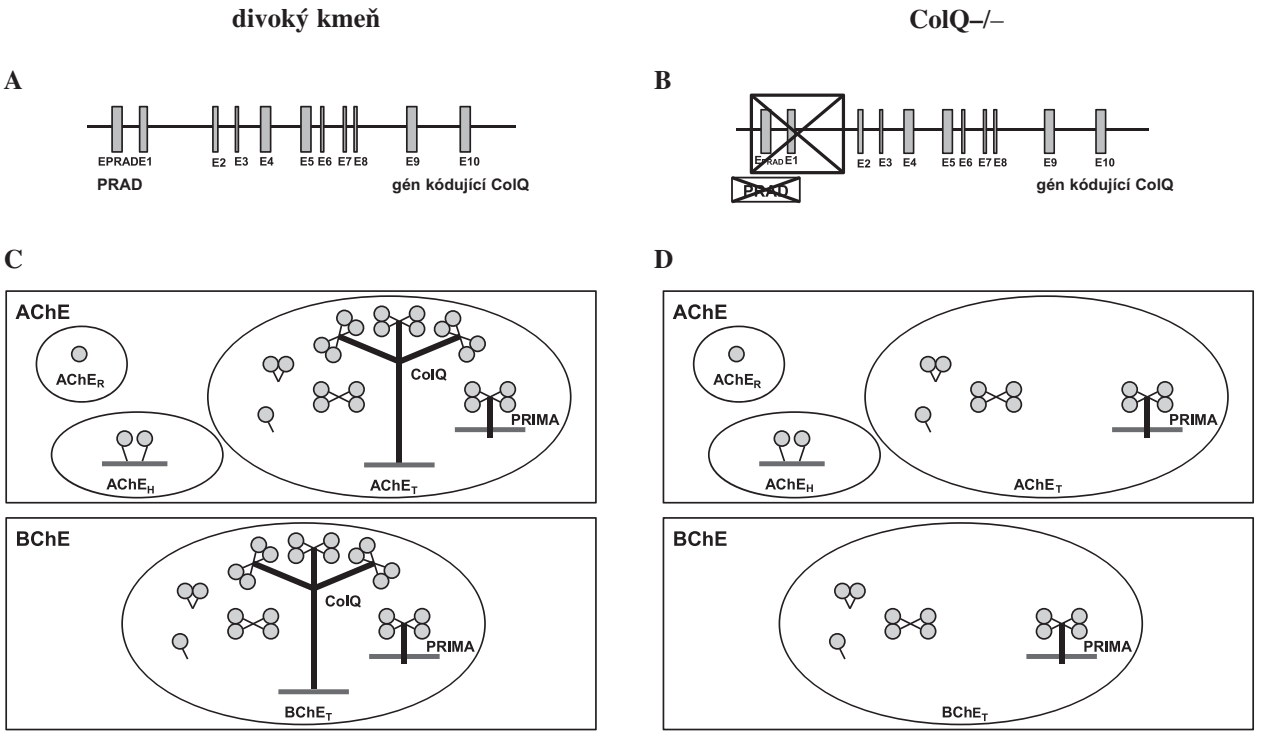
Myši s mutáciou v génoch kódujúcich kotviace proteíny

ColQ–/–

Myši s absenciou molekulových foriem cholínesteráz kotvených ColQ (ColQ–/–) boli pripravené vymazaním sekvencie kódujúcej doménu PRAD v géne pre ColQ[28]. Ako bolo spomenuté v úvode, doména PRAD je kľúčová pre vznik hydrofóbnych interakcií medzi kotviacim proteínom ColQ a štyrmi katalytickými podjednotkami cholínesteráz[36]. Z toho dôvodu má odstránenie domény PRAD za následok vyššie spomínanú absenciu AChE a BChE kotvenej prostredníctvom ColQ (obr. 5). Vzhľadom k tomu, že cholínesterázy kotvené pomocou ColQ sú predominantné v kostrových svaloch[28], ColQ–/– myši nemajú na nervovo-svalovej platničke takmer žiadnu cholínesterázovú aktivitu. Tie cholínesterázy, ktoré ostávajú v kostrovom svale prítomné aj napriek delécii ColQ, majú svoj pôvod v motorickom neuróne a sú kotvené prostredníctvom proteínu PRiMA[80].

ColQ–/– myši sa vyznačujú podobnými, výraznými zmenami vo fenotype ako AChE–/– myši[45], Del

proLékaře.cz | 1.7.2025



Obr. 5. Delécia sekvencie v géne ColQ kódujúcej doménu PRAD (A (divoký kmeň) vs. B (ColQ–/–)), ktorá viedla ku príprave myší s absenciou AChE$_T$ a BChE$_T$ kotvenej pomocou ColQ (C (divoký kmeň) vs. D (ColQ–/–))[11, 27, 28]

E5+6–/– myši poprípade Del E6–/– myši[60, 73]. V porovnaní s myšami divokého kmeňa rastú pomalšie, sú oveľa menšie a vyznačujú sa trasom počas pohybu[27]. Na rozdiel od AChE–/– myší[45] sú schopné samostatne prijímať potravu. Vyznačujú sa rovnakými zvukovými prejavmi[27], aké je možné pozorovať u AChE–/– myší[45] a Del E5+6–/– myší[60].

Najvýraznejšie rozdiely oproti myšiam divokého kmeňa sa nachádzajú na nervovo-svalovej platničke[27]. Absencia cholínesteráz tu prekvapujúco spôsobuje zvýšené uvoľňovanie ACh z motorického neurónu, čo popri absencii jeho degradácie má za následok ešte výraznejšie zvýšenie hladín tohto neuromediátora[81]. Vysoké hladiny ACh následne spôsobujú poškodenie až 60 % nervovo-svalových platničiek, ktoré sú buď fragmentované, alebo vykazujú známky nedostatočného vývoja. Na subcelulárnej úrovni je možné pozorovať degeneračné zmeny vykazujúce znaky subsynaptickej nekrózy. Okrem toho sú Schwanove bunky vsunuté do synaptickej štrbiny, čo podľa autorov štúdie pravdepodobne chráni postsynaptickú svalovú bunku pred vysokými koncentráciami ACh[27]. Popri anatomických adaptačných zmenách je možné pozorovať aj zmeny na úrovni NR. Konkrétne zhluky NR zaberajú v ColQ deficientných svaloch omnoho menšiu plochu ako v prípade svalu divokého kmeňa[82]. Napriek menšej ploche sú NR v týchto zhlukoch hustejšie usporiadané[30].

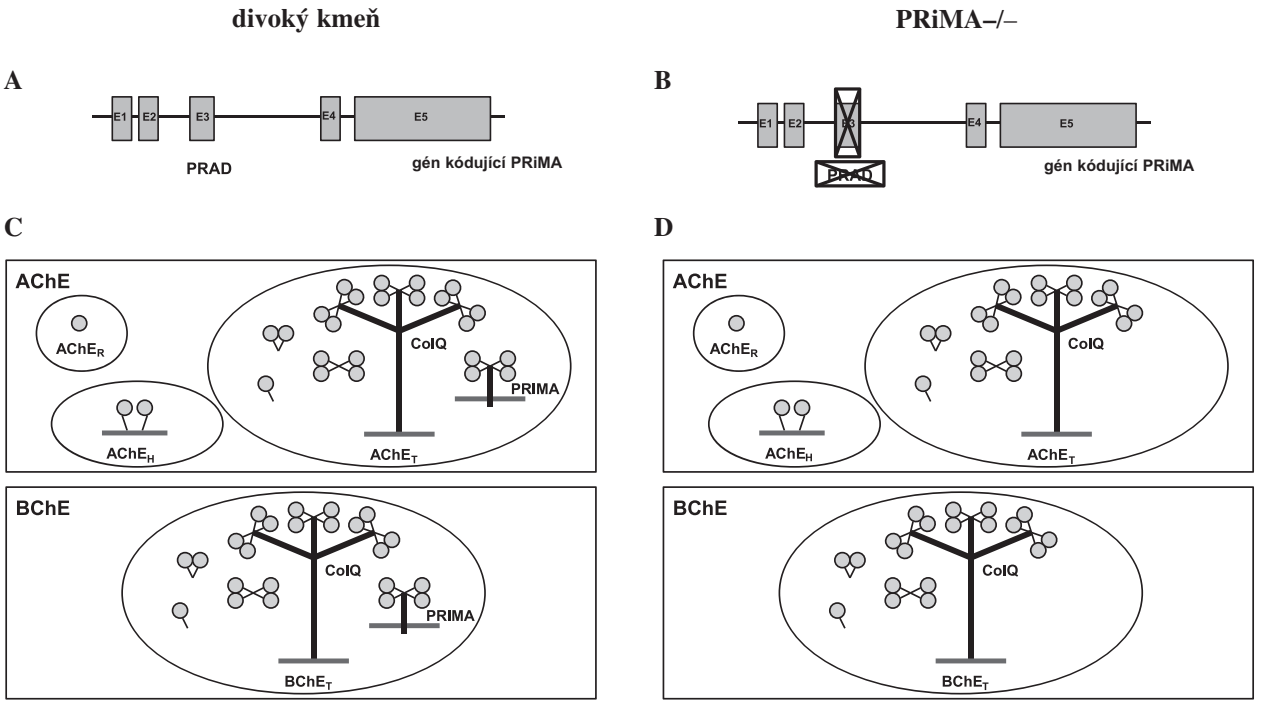
Kongenitálny myastenický syndróm je ochorenie, pri ktorom sa vyskytujú mutácie niektorých proteínov participujúcich na prenose vzruchov z motorického neurónu na kostrový sval. Tieto mutácie spôsobujú patologickú slabosť a únavu kostrových svalov[31]. Jedna z foriem kongenitálneho myastenického syndrómu sa vyznačuje absenciou AChE na nervovo-svalovej platničke. Je spôsobená mutáciou časti génu ColQ, ktorá kóduje doménu PRAD. Tým pádom, rovnako ako u ColQ–/– myší, nedochádza ani u pacientov trpiacich touto formou kongenitálneho myastenického syndrómu k interakciám medzi doménou PRAD ColQ a C-terminálnym T-peptidom cholínesteráz[83, 84]. Vzhľadom na túto podobnosť slúžia ColQ–/– myši na hľadanie nových postupov pri terapii kongenitálneho myastenického syndrómu[85].

PRiMA–/–

Myši s absenciou cholínesteráz kotvených pomocou proteínu PRiMA (PRiMA–/–) boli pripravené pomocou rovnakého princípu ako ColQ–/– myši[27]. V géne kódujúcom proteín PRiMA bola vymazaná sekvencia kódujúca doménu PRAD. To následne zamedzí interakcii kotviaceho proteínu PRiMA s katalytickými podjednotkami cholínesteráz (obr. 6)[34]. Keďže cholínesterázy kotvené prostredníctvom PRiMA sú predominantné v nervovej sústave[32], PRiMA–/– myši nemajú v mozgu takmer žiadnu cholínesterázovú aktivitu. V striate PRiMA–/– myší sa nachádzajú iba 2–3 % aktivity cholínesteráz divokého kmeňa. Navyše táto aktivita je lokalizovaná iba intracelulárne, konkrétne v endoplazmatickom retikule[34].

Napriek absencii cholínesteráz v mozgu sa PRiMA–/– myši prekvapujúco vôbec nelíšia od myší divokého kmeňa[34, 76]. AChE–/– myši a Del E 5+6–/– myši, ktorým rovnako ako PRiMA–/– myšiam chýba AChE v mozgu, sa už na prvý pohľad vyznačujú výraznými zmenami vo fenotype – ako napríklad menší vzrast, tras počas pohybu alebo slabosť kostrových svalov[34, 44, 45, 60, 73, 74]. Na základe fenotypu PRiMA–/– myší však možno predpokladať, že tieto zmeny vo fenotype sú pravdepodobne spôsobené absenciou AChE na periférii, respektíve v kostrových svaloch. Vzhľadom k tomu, že

proLékaře.cz | 1.7.2025



Obr. 6. Delécia sekvencie v géne PRiMA kódujúcej doménu PRAD (A (divoký kmeň) vs. B (PRiMA–/–)), ktorá viedla ku príprave myší s absenciou AChE$_T$ a BChE$_T$ kotvenej pomocou PRiMA (C (divoký kmeň) vs. D (PRiMA–/–))[11, 32, 34]

v kostrových svaloch je AChE kotvená predominantne prostredníctvom proteínu ColQ, PRiMA–/– myši nemajú zmenené hladiny AChE v kostrovom svale[3, 80].

V prípade absencie AChE aj BChE u PRiMA–/– myší je možné v striate pozorovať 200–300-násobne vyššie hladiny ACh[34]. Je prekvapujúce, že takéto extrémne vysoké hladiny ACh spôsobujú u PRiMA–/– myší len minimálne zmeny v behaviorálnych štúdiách oproti myšiam divokého kmeňa. Nie je u nich ovplyvnená priestorová pamäť ani pohybová aktivita, avšak skúmanie motorických funkcií pomocou rotarod testu a CatWalk testu preukázalo, že PRiMA–/– myši majú v porovnaní s myšami divokého kmeňa mierne oslabené koordinačné schopnosti[3, 59]. Ako bolo spomenuté vyššie, za bežných okolností je nemožné odlíšiť od seba tieto dva genotypy (PRiMA–/– a myši divokého kmeňa)[34]. Tento stav je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobený adaptačnými zmenami na úrovni receptorov v centrálnej nervovej sústave[3, 59]. Podrobný výskum preukázal, že podobne ako v prípade AChE–/– myší tak aj u PRiMA–/– myší dochádza v mozgu k výraznému, miestami až 60% úbytku MR. Okrem zníženia hladín samotných MR je možné pozorovať aj pokles ich funkčnosti[59]. Takéto adaptačné zníženie množstva MR prebieha počas prvých 30 dní života PRiMA–/– myší[86]. Na rozdiel od AChE–/– myší[56, 57] nedochádza v mozgu PRiMA–/– myší k výrazným zmenám v hladinách NR ani dopaminergických receptorov[59], čo môže vyplývať z rôzneho genetického pozadia mutantných kmeňov myší.

Stret záujmov: žiadny.

Literatúra

1. **Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F. M.** Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog. Neurobiol. 1993; 41(1), 31–91.
2. **Hrabovská A.** Localization, processing and function of cholinesterases in striatum. In: Striatum: anatomy, functions and role in disease. 1. vydanie. New York: Nova Sciene Publishers 2012; 1–36.
3. **Hrabovská A. Krejci E.** Reassessment of the role of the central cholinergic system. J. Mol. Neurosci. 2014; 53(3), 352–358.
4. **Masson P., Lockridge O.** Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. Arch. Biochem. Biophys. 2010; 494(2), 107–120.
5. **Hrabovská A., Debouzy J. C., Froment M. T., Devínsky F., Pauliková I., Masson P.** Rat butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of N-alkyl homologues of benzoylcholine. FEBS J. 2006; 273(6), 1185–1197.
6. **Appleyard M. E., McDonald B.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of Alzheimer type. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1992; 55(11), 1074–1078.
7. **Kálmán J., Juhász A., Janka Z., Rakonczay Z., Abrahám G., Boda K., Farkas T., Penke B.** Serum butyrylcholinesterase activity in hyperlipidaemia. Atheroslerosis 2004; 173(1), 145–146.
8. **Manoharan I., Boopathy R., Darvesh S., Lockridge O.** A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. Clin. Chim. Acta. 2007; 378(1–2), 128–135.
9. **Getman G. T., Eubanks J. H., Camp S., Evans G. A., Taylor P.** The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. Am. J. Hum. Genet. 1992; 51(1), 170–177.
10. **Arpagaus M., Kott M., Vatsis K. P., Bartels C. F., La Du B. N., Lockridge O.** Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. Biochemistry 1990; 29(1), 124–131.
11. **Massoulié J.** The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. Neurosignals 2002; 11, 130–143.
12. **Grisaru D., Deutsch V., Shapira M., Pick M., Sternfeld M., Melamed-Book N., Galyam N., Gait M. J., Owen D., Lessing J. B., Eldor A., Soreq H.** ARP, a peptide derived from the stress-associated acetylcholinesterase variant, has hematopoietic growth promoting activities. Mol. Med. 2006; 7(2), 93–105.

proLékaře.cz | 1.7.2025

13. **Zimmerman G., Soreq H.** Readthrough acetylcholinesterase: a multifaceted inducer of stress reactions. J. Mol. Neurosci. 2006; 30(1–2), 197–200.
14. **Härtl R., Gleinich A., Zimmerman M.** Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. J. Neurochem. 2011; 116(6), 1088–1096.
15. **Dori A., Ifergane G., Saar-Levy T., Bersudsky M., Mor I., Soreq H., Wirguin I.** Readthrough acetylcholinesterase in inflammation-associated neuropathies. Life Sci. 2007; 80(24–25), 2369–2374.
16. **García-Ayllón M. S., Millán C., Serra-Basante C., Bataller R., Sáez-Valero J.** Readthrough acetylcholinesterase is increased in human liver cirhosis. PLoS One 2012; 7(9), e44598.
17. **Pegan K., Matkovic U., Mars T., Mis K., Pirkmajer S., Brecelj J., Grubic Z.** Acetylcholinesterase is involved in apoptosis in the precursors of human muscle regeneration. Chem. Biol. Interact. 2010; 187(1–3), 96–100.
18. **Berson A., Knobloch M., Hanan M., Diamant S., Sharoni M., Schippli D., Geyer B. C., Ravid R., Mor T. S:, Nitsch R. M., Soreq H.** Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. Brain 2008; 131(Pt 1), 109–119.
19. **Li Y., Camp S., Rachinsky T. L., Getman D., Taylor P.** Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. J. Biol. Chem. 1991; 266(34), 23083–23090.
20. **Montenegro M. F., Ruiz-Espejo F., Campoy F. J., Munoz-Delgado E., de la Cadena M. P., Rodríguez-Berrocal F. J., Vidal C J.** Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. Cell. Mol. Life Sci. 2006; 63(18), 2175–2182.
21. **Montenegro M. F., Nieto-Cerón S., Cabezas-Herrera J., Munoz-Delgado E., Campoy F. J., Vidal C. J.** Most acetylcholinesterase activity of non-nervous tissues and cells arises from the AChE-H transcript. J. Mol. Neurosci. 2014; 53(3), 429–435.
22. **Moral-Naranjo M. T., Montenegro M. F., Munoz-Delgado E., Campoy F. J., Vidal C.** The levels of both lipid rafts and raft-located acetylcholinesterase dimers increase in muscle of mice with muscular dystrophy by merosin deficiency. Biochim. Biophys. Acta. 2010; 1802(9), 754–764.
23. **Rosenberry T. L., Roberts W. L., Haas R.** Glycolipid membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. Fed. Proc. 1986; 45(13), 2970–2975.
24. **Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., Simon S.** Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. J. Physiol. Paris. 1998; 92(3–4), 183–190.
25. **Massoulié J., Bon S., Perrier N., Falasca C.** The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. Chem. Biol. Interact. 2005; 157–158, 3–14.
26. **Kučera M., Hrabovská A.** Molekulové formy cholínesteráz a ich kotviace proteíny. Chemické listy 2013; 107, 695–700.
27. **Feng G., Krejci E., Molgo J., Cunningham j. M., Massoulié J., Sanes J. R.** Genetic Analysis of Collagen Q: Roles in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Assembly and in Synaptic Structure and Function. J. Cell Biol. 1999; 114(6), 1349–1360.
28. **Krejci E., Thomine S., Boschetti N., Legay C., Sketelj J., Massoulié J.** The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. J. Biol. Chem. 1997; 272(36), 22840–22847.
29. **Krejci E., Legay C., Thomine S., Sketelj J., Massoulié J.** Differences in expression of acetylcholinesterase and collagen Q control the distribution and oligomerization of the collagen-tailed forms in fast and slow muscles. J. Neurosci. 1999; 19(24), 10672–10679.
30. **Sigoillot S.M., Bourgeosis F., Lambergeon M., Strochlic L., Legay C.** ColQ controls postsynaptic differenciation at the neuromuscular junction. J. Neurosci. 2010; 30(1), 13–23.
31. **Engel A.G., Shen X. M., Selcen D., Sine S. M.** What have we learned from the congenital myasthenic syndromes. J. Mol. Neurosci. 2010; 40(1–2), 143–153.
32. **Perrier A. L., Massoulié J., Krejci E.** PRiMA: The Membrane Anchor of Acetycholinesterses in the Brain. Neuron. 2002; 33, 275–285.
33. **Chen V. P., Xie H. Q., Chan W. K., Leung K. W., Chan G. K., Choi R. C., Bon S., Massoulié J., Tsim K W.** The PRiMA-linked tetramers are assembled from homodimers: hybrid molecules composed of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase dimers are up-regulated during development of chicken brain. J. Biol. Chem. 2010; 285(35), 27265–27278.
34. **Dobbertin A., Hrabovská A., Dembele K., Camp S., Taylor P., Krejci E., Bernard V.** Targeting of acetylcholinesterase in neurons *in vivo*: A dual processing function for the Proline-Rich Membrane Anchor subunit and the attachment domain on the catalytic subunit. J. Neurosci. 2009; 18729(14), 4519–4530.
35. **García-Ayllón M. S., Campanari M. L., Montenegro M. F., Cuchillo Ibánez I., Belbin O., Lleó A., Tsim K., Vidal C. J., Sáez-Valero J.** Presenilin-1 influences processing of the acetylcholinesterase membrane anchor PRiMA. Neurobiol. Aging. 2014; 35(7), 1526–1536.
36. **Dvir H., Harel M., Bon S., Liu W. Q., Vidal M., Barbay C., Sussman J. l., Massoulié J. Silman I.** The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. EMBO J. 2004; 23(22), 4394–4405.
37. **Simon S.,Krejci E., Massoulié J.** A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. EMBO J. 1988; 7(10), 2983–2993.
38. **Xie W., Wilder P. J., Stribley J. A., Chatonnet A., Rizzino A., Taylor P., Hinrichs S. H., Lockridge O.** Knockout of the acetylcholinesterase allele in the mouse. Chem. Biol. Interact. 1999; 119-120, 289–299.
39. **Xie W., Stribley J. A., Chatonnet A., Wilder P. J., Rizzino A., McComb R. D., Taylor P., Hinrichs S. H., Lockridge O.** Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000; 293(3), 896–902.
40. **Sun M., Lee C. J., Shin H. S.** Reduced nicotinic receptor function in sympathetic ganglia is responsible for hypothermia in the acetylcholinesterase knockout mouse. J. Physiol. 2007; 578(Pt 3), 751–764.
41. **Li B., Stribley J. A., Ticu A., Xie W., Schopfer L. M., Hammond P., Brimijoin S., Hinrichs S. H., Lockridge O.** Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. J. Neurochem. 2000; 75(3), 1320–1231.
42. **Adler M., Manley H. A., Purcell A. L., Deshpande S. S., Hamilton T. A., Kan R. K., Oyler G. Lockridge O., Duysen E. G., Sheridan R. E.** Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice. Muscle nerve. 2004; 30(3), 317–327.
43. **Hartmann J., Kiewert C., Duysen E. G., Lockridge O., Greig N. H., Klein J.** Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. J. Neurochem. 2007; 100(5), 1421–1429.
44. **Duysen E.G., Li B., Xie W., Schopfer L. M., Anderson R. S., Broomfield C. A., Lockridge O.** Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase konckout mouse to VX lethality. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001; 299(2), 528–535.
45. **Duysen E.G., Stribley J. A., Fry D. L., Hinrichs S. H., Lockridge O.** Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. Brain Res. Dev. Brain Res. 2002; 137(1), 43–54.
46. **Gupta R. C., Patterson G. T., Dettbarn W. D.** Mechanizms of toxicity and tolerance to diisopropylphosphorofluoridate at the neuromuscular junction of the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986; 84(3), 541–550.
47. **Girard E., Bernard V., Camp S., Taylor P., Krejci E., Molgó J.** Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. J. Mol. Neurosci. 2006; 30(1-2), 99–100.
48. **Blondet B., Carpentier G., Ferry A., Chatonnet A., Courty J.** Localization fo butyrylcholinesterase at the neuromuscular junction of normal and acetylcholinesterase knockout mice. J. Histochem. Cytochem. 2010; 58(12), 1075–1082.

proLékaře.cz | 1.7.2025

49. **Hrabovská A., Duysen E. G., Sanders J. D., Murrin L. C., Lockridge O.** Delivery of human acetylcholinesterase by adeno-associated virus to the acetylcholinesterase knockout mouse. Chem. Biol. Interact. 2005; 157–158, 71–78.
50. **Mesulam M.M., Guillozet A., Shaw p., Levey A., Duysen E. G., Lockridge O.** Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neuroscience 2002; 110(4), 627–639.
51. **Rice S. G., Nowak L., Duysen E. G., Lockridge O., Lahiri D. K., Reyes P. F.** Neuropathological and immunochemical studies of brain parenchyma in acetylcholinesterase knockout mice: implications in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 2007; 11(4), 481–489.
52. **Volpicelli-Daley L. A., Duysen E. G., Lockridge O., Levey A. I.** Altered hippocampal muscarinic receptors on acetylcholinesterase-deficient mice. Ann. Neurol. 2003; 53(6), 788–796.
53. **Volpicelli-Daley L. A., Hrabovská A., Duysen E. G., Ferguson S. M., Blakely R. D., Lockridge O., Levey A. I.** Altered striatal function and muscarinic cholinergic receptors in acetylcholinesterase knockout mice. Mol. Pharmacol. 2003; 64(6), 1309–1316.
54. **Bernard V., Brana C., Liste I., Lockridge O., Bloch B.** Dramatic depletion of cell surface m2 muscarinic receptor due to limited delivery from intracytoplasmic stores in neurons of acetylcholinesterase-deficient mice. Mol. Cell Neurosci. 2003; 23(1), 121–133.
55. **Li B., Duysen E. G., Volpicelli-Daley L. A., Levey A. I. Lockridge O.** Regulation of muscarinic acetylcholine receptor function in acetylcholinesterase knockout mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 2003; 74(4), 977–986.
56. **Chatonnet F., Boudinot E., Chatonnet A., Taysse L., Daulon S., Champagnat J., Foutz A. S.** Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. Eur. J. Neurosci. 2003; 18(6), 1419–1427.
57. **Hrabovská A., Farár V., Bernard V., Duysen E. G., Brabec J., Lockridge O., Mysliveček J.** Drastic decrease in dopaminergic receptor levels in the striatum of acetylcholinesterase knock-out mouse. Chem. Biol. Interact. 2010; 183, 1, 194–201.
58. **Mysliveček J., Duysen E. G., Lockridge O.** Adaptation to excess acetylcholine by downregulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in lungs of acetylcholinesterase knockout mice. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2007; 376(1–2), 83–92.
59. **Farar V., Mohr F., Legrand M., Lamotte dęInchamps B., Leroy J., Abitbol M., Bernard V., Baud F., Fournet V., Houze P., Klein J., Plaud B., Tuma J., Zimmermann M., Acher P., Hrabovská A., Mysliveček J., Krejci E.** Near-complete adaptation of the PRiMA knockout to the lack of central acetylcholinesterase. J. Neurochem. 2012; 122(5), 1065–1080.
60. **Camp S., Zhang L., Marquez M., de la Torre B., Long J. M., Bucht G., Taylor P.** Acetylcholinesterase (AChE) gene modification in transgenic animals: functional consequences of selected exon and regulatory region deletion. Chem. Biol. Interact. 2005; 157–158, 79–86.
61. **Li B., Duysen E. G., Saunders T. L., Lockridge O.** Production of the butyrylcholinesterase knockout mouse. J. Mol. Neurosci. 2006; 30(1–2), 193–195.
62. **Duysen E. G., Li B., Darvesh S., Lockridge O.** Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggest humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimeręs disease drugs and indicates butyrylcholnesterase function in neurotransmission. Toxicology 2007; 233(1–2), 60–69.
63. **Li B., Duysen E. G., Carlson M., Lockridge O.** The butyrylcholinesterase knockout mouse as a model for human butyrylcholinesterase deficiency. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008; 324(3), 1146–1154.
64. **Li B., Duysen E. G., Lockridge O.** The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. Chem. Biol. Interact. 2008; 175(1–3), 88–91.
65. **Rahimi Z., Ahmadi R., Vaisi-Raygani A., Rahimi Z., Bahrehmand F., Parsian A.** Butyrylcholinesterase (BChE) activity is associated with the risk of preeclampsia: influence on lipid and lipoprotein metabolism and oxidative stress. J. Matern. Fetal Neonatal Med. 2013; 26(16), 1590–1594.
66. **Vallianou N. G., Evangelopoulos A. A., Bountziouka V., Bonou M. S., Katsagoni C., Vogiatzakis E. D., Avgerinos P. C., Barbetseas J., Panagiotakos D. B.** Association of butyrylcholinesterase with cardiometabolic risk factors among apparently healthy adults. J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown, Md.). 2014; 15(5), 377–383.
67. **Abbott C. A., Mackness M. I., Kumar S., Olukoga A. O., Gordon C., Arrol S., Bhatnagar D., Boulton A. J., Durrington P. N.** Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. Clin. Sci. (Lond.) 1993; 85(1), 77–81.
68. **Johnson G., Moore S. W.** Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. Neurochem. Int. 2012; 61(5), 783–797.
69. **Lockridge O.** Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. Pharmacol. Ther. 1990; 47(1), 35–60.
70. **Hoffman R. S., Henry G. C., Wax P. M., Weisman R. S., Howland M. A., Goldfrank L. R.** Decreased plasma cholinesterase activity enhances cocaine toxicity in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 263(2), 698–702.
71. **Duysen E. G., Li B., Carlson M., Li Y. F., Wieseler S., Hinrichs S. H., Lockridge O.** Increased hepatotoxicity and cardiac fibrosis in cocaine treated butyrylcholinesterase knockout mice. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2008; 103(6), 514–521.
72. **Duysen E. G., Lockridge O.** Prolonged toxic effects after cocaine challenge in butyrylcholinesterase/plasma carboxylesterase double knockout mice: a model for butyrylcholinesterase-defficent humans. Drug Metab. Dispos. 2011; 39(8), 1321–1323.
73. **Camp S., Zhang L., Krejci E., Dobbertin A., Bernard V., Girard E., Duysen E. G., Lockridge O., De Jaco A., Taylor P.** Contributions of selective knockout studies to understanding cholinesterase disposition and function. Chem. Biol. Interact. 2010; 187(1–3), 72–77.
74. **Camp S., De Jaco A., Zhang L., Marquez M., De la Torre B., Taylor P.** Acetylcholinesterase expression in muscle is specifically controlled by a promoter-selective enhancesome in the first intron. J. Neurosci. 2008; 28(10), 2459–2470.
75. **Girard E., Bernard V., Camp S., Taylor P., Krejci E., Molgó J.** Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. J. Mol. Neurosci. 2006; 30(1–2), 99–100.
76. **Boudinot E., Bernard V., Camp S., Taylor P., Champagnat J., Krejci E., Foutaz A. S.** Influence of differential expression of acetylcholinesterase in brain and muscle on respiration. Respir. Physiol. Neurobiol. 2009; 165(1), 40–48.
77. **Fuentes M. E., Taylor P.** Control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. Neuron 1993; 10(4), 679–687.
78. **Boudreau-Lariviére C., Parry D. J., Jasmin B. J.** Myotubes originating from single fast and slow satellite cells display similar patterns of AChE expression. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000; 278(1), 140–148.
79. **Angus L. M., Chan R. Y., Jasmin B. J.** Role of intronic E- and N-box motifs in the transcriptional induction of the acetylcholinesterase gene during myogenic differentiation. J. Biol. Chem. 2001; 276(20), 17603–17609.
80. **Bernard V., Girard E., Hrabovská A., Camp S., Taylor P., Plaud B., Krejci E.** Distinct localization of collagen Q and PRiMA forms of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. Mol. Cell. Neurosci. 2011; 46(1), 272–281.
81. **Minic J., Molgó J., Karlsson E., Krejci E.** Regulation of acetylcholine released by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. Eur. J. Neurosci. 2002; 15(2), 439–448.
82. **Nguyen-Huu T., Dobbertin A., Barbier J., Minic J., Krejci E., DUvaldestin P., Molgó J.** Cholinesterases and the resistance of the mouse diaphragm to the effect of tubocurarine. Anesthesiology 2005; 103(4), 788–795.

proLékaře.cz | 1.7.2025

83. **Ohno K., Engel A. G., Brengman J. M., Shen X. M., Heidenreich F., Vincent A., Milone M., Tan E., Demirci M., Walsh P., Nakano S., Akiguchi I.** The spectrum of mutations causing endplate acetylcholinesterase deficiency. Ann. Neurol. 2000; 47(2), 162–170.
84. **Engel A. G., Ohno K., Shen X. M., Sine S. M.,** Congenital myasthenic syndromes: multiple molecular targets at the neuromuscular junction. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003; 998, 138–160.
85. **Ohno K., Ito M., Kawakami Y., Ohtsuka K.** Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. J. Mol. Neurosci. 2014; 53(3), 359–361.
86. **Farar V., Hrabovská A., Krejci E., Mysliveček J.** Developmental adaptation of central nervous system to extremely high acetylcholine levels. PLoS One. 2013; 8(7), e68265.