

MOLEKULOVÉ FORMY CHOLÍNESTERÁZ A ICH KOTVIACE PROTEÍNY

MATEJ KUČERA a ANNA HRABOVSKÁ

*Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Odbojárrov 10, 832 32 Bratislava
kucera@fpharm.uniba.sk*

Došlo 19.10.12, prijaté 31.10.12.

Kľúčové slová: acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, kotviace proteíny, kolagén Q, membránová kotva bohatá na prolín, molekulové formy cholinesteráz

Obsah

1. Úvod
2. Cholinesterázy
 - 2.1. Gény kódujúce cholinesterázy
 - 2.2. Typy cholinesteráz
 - 2.2.1. AChE_S
 - 2.2.2. AChE_H
 - 2.2.3. AChE_R
 - 2.2.4. AChE_T
 - 2.2.5. BChE_T
3. Interakcie cholinesteráz s kotviacimi proteínmi
4. Kotviace proteíny cholinesteráz
 - 4.1. ColQ
 - 4.2. PRiMA
5. Záver

1. Úvod

Cholinesterázy sú malou skupinou enzýmov, ktoré patria medzi serínové hydrolázy. U stavovcov, a teda aj u človeka, rozoznávame dva typy cholinesteráz a to acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BChE). Sú to dva rozdielne enzýmy kódované samostatnými génmi. AChE a BChE sa líšia predovšetkým v štruktúre a substrátovej špecifite. Ich rozdielnosť možno demonštrovať aj existenciou špecifických inhibítorov, ktoré inhibujú buď AChE alebo BChE. Čo sa týka substrátovej špecifity, tak cholinesterázy štiepia predovšetkým estery cholínu, pričom obe štiepia neuromediátor acetylcholínu (ACh). Kým AChE štiepi takmer výlučne iba estery s malým acylovým zvyškom ako je spomínaný ACh, tak BChE prednostne štiepi estery s väčším acylovým zvyškom ako je napríklad butyrylcholínu, benzoylcholínu alebo propionylcholínu¹. AChE patrí medzi najdôležitejšie enzýmy v organizme nakoľko zohráva kľúčovú úlohu

v cholinergnej transmisii, či už na synapsách nervového systému alebo na nervovo-svalovej platničke a jej prípadná inhibícia má pre organizmus závažné následky. Tým, že hydrolyzuje ACh chráni postsynaptické receptory pred nadmernou stimuláciou a tak zabraňuje neprimeranej cholinergnej neurotransmisii. Na rozdiel od AChE, funkcia BChE nie je do dnešných dní uspokojivo vysvetlená nakoľko nepoznáme jej fyziologický substrát a jej absencia sa za fyziologických podmienok neprejavuje žiadnymi zmenami. Jednou z možných úloh BChE je znižovanie toxicity rôznych látok (xenobiotík), s ktorými prichádza organizmus do kontaktu^{2,3}. Medzi látky, ktoré sú hydrolyzované BChE, patria rôzne liečivá⁴, poprípade rezidua pesticídov v potrave⁵. Okrem toho sú zmeny hladiny BChE spájané s rôznymi patológiami, ako je Alzheimerova choroba⁶, dyslipidémia, diabetes mellitus⁷ a iné.

2. Cholinesterázy

2.1. Gény kódujúce cholinesterázy

Ako bolo spomenuté v úvode, AChE a BChE sú kódované samostatnými génmi^{1,2}. Gén pre AChE je u človeka lokalizovaný na dlhom ramene siedmeho chromozómu v pozícii q22 (cit.⁸). Skladá sa zo šiestich exónov. Exóny 2, 3 a 4 kódujú katalytickú doménu AChE, zatiaľ čo exóny 5 a 6 kódujú C-terminálne peptidy AChE. Exóny 5 a 6 sa nazývajú aj alternatívne exóny. To znamená, že AChE gén podlieha v priebehu transkripcie alternatívnemu zostrihu práve v mieste exónu 5 alebo 6 (cit.^{2,9}). Tento alternatívny zostrih má za následok tvorbu rôznych transkripčných variantov, z ktorých vznikajú rozdielne podjednotky AChE. Jednotlivé podjednotky AChE majú rovnakú katalytickú doménu, ale rozdielnú C-terminálnu doménu (C-terminály peptid). U stavovcov sa vyskytujú štyri rozličné typy podjednotiek (zostrihovných variantov) AChE: AChE_S, AChE_R, AChE_H a AChE_T. U človeka ani u iných cicavcov sa AChE_S podjednotky nevyskytujú^{2,3}.

Gén kódujúci ľudskú BChE je dlhý 73 kb a pozostáva zo štyroch exónov. Exón 1 obsahuje oblasť, ktorá nepodlieha translácii. Exón 2 je zodpovedný za kódovanie 83 % sekvencie aminokyselín dospelého proteínu vrátane väčšej časti katalytickej domény. Exón 3 kóduje menšiu časť katalytickej podjednotky a posledný exón 4 kóduje C-terminálny peptid a oblasť, ktorá nepodlieha translácii. BChE, na rozdiel od AChE, existuje iba v jednom transkripčnom variante, ktorý následne vytvára iba jeden typ podjednotiek¹⁰. Podjednotky BChE sú podobné s AChE_T podjednotkami vďaka rovnakému C-terminálnemu peptidu, ktorý je zodpovedný za ich vlastnosti². Samotná BChE pozostáva z 574 aminokyselín. BChE sa nachádza v ľudskom sére vo forme tetraméru, čiže je zložená zo

štyroch identických katalytických podjednotiek. BChE je na 53,8 % identická s AChE pochádzajúcou z raje *Torpedo californica*¹¹.

2.2. Typy cholinesteráz

2.2.1. AChE_S

S transkripty (z angl. snake alebo soluble) tvoria podjednotky AChE_S, ktoré majú štruktúru solubilných neamfifilných monomérov. C-terminálna oblasť AChE_S je kódovaná alternatívnym exónom nazývaným aj exón S (cit.¹²). AChE_S podjednotky sú produkované jedovými žľazami niektorých druhov hadov. Konkrétne sa jedná o jedince rodov *Bungarus*, *Haemachatus*, *Naja* a *Ophiophagus* z čeľade *Elaphidae*. Bolo zistené, že AChE_S podjednotky neovplyvňujú toxicitu jedu a ani nezosilňujú účinok toxických látok obsiahnutých v jede¹³. Okrem jedových žliaz sa AChE_S spolu s AChE_T nachádza aj v iných tkanivách týchto hadov, ako je napríklad pečeň alebo kostrový sval¹².

2.2.2. AChE_H

H transkripty (z angl. hydrophobic) tvoria podjednotky AChE_H, ktoré sa viažu s glykofosfatidylinozitolom (GPI). GPI ukotvuje AChE_H vo forme monomérov alebo dimérov na bunkovom povrchu. Takéto monoméry a diméry AChE_H kotvené prostredníctvom GPI sa nachádzajú prevažne na povrchu kmeňových buniek erytroleukemickej bunkovej línie a na krvných bunkách cicavcov, ako sú napríklad erytrocyty¹⁴. Okrem toho sa táto forma AChE vyskytuje vo svaloch a elektrických orgánoch raij rodu *Torpedo*. GPI kotvená AChE_H je amfifilná a solubilná. C-terminálny peptid AChE_H je výsledkom transkripcie a translácie exónu 5, ktorý podlieha alternatívnemu zostrihu¹⁵. Pred nedávnom bolo zistené, že ryba *Oryzias latipes* obsahuje vo svojich tkanivách doposiaľ neznámy typ BChE. Konkrétne sa jedná o atypický druh BChE, ktorý existuje vo forme amfifilných dimérov kotvených prostredníctvom GPI (cit.¹⁶). Experimenty na svaloch ukázali, že časť aktivity AChE v kostrovom svali je lokalizovaná nielen na nervovo-svalovej platničke, ale aj v mikrodoménach nazývaných lipidové rafty. Práve táto aktivita je tvorená AChE_H kotvenou prostredníctvom GPI. Za expresiu AChE_H vo svali sú zodpovedné bunky kostrového svalu¹⁷. Ďalším miestom výskytu AChE_H v organizme je hrubé črevo, kde tvorí hlavnú molekulovú formu AChE. Prítomnosť AChE_H bola preukázaná v sigmoideu – esovitej slučke hrubého čreva a v rekte. AChE v čreve je s najväčšou pravdepodobnosťou produkovaná črevnou mukózou a inými epiteliálnymi štruktúrami, čomu nasvedčujú mnohé dôkazy¹⁸.

2.2.3. AChE_R

R transkripty (z angl. readthrough) tvoria podjednotky AChE_R. Tieto podjednotky existujú vo forme neamfifilných, solubilných monomérov. Vyskytujú sa v rajách rodu *Torpedo*, u človeka a hlodavcov. AChE_R sa v porovnaní s AChE_H a AChE_T vyskytuje v organizme v relatívne malých množstvách¹⁵. Skladá sa z katalytickej podjednotky

a C-terminálneho peptidu¹⁹. AChE_R nevzniká na základe alternatívneho zostrihu ako ostatné podjednotky AChE, ale transkripcia pokračuje kontinuálne až na intrón 4. Práve prepis časti intrónu 4 je zodpovedný za tvorbu C-terminálneho peptidu AChE_R. C-terminálny peptid AChE_R sa nazýva ARP [z angl. AChE related (readthrough) peptide]. Je dlhý 26 aminokyselín. Pri experimentoch na syntetickom ARP peptide bolo zistené, že v podmienkach *in vitro* uľahčuje proliferáciu hematopoetických progenitorových buniek a je zahrnutý aj v proliferácii a diferenciácii mezenchymálnych a epiteliálnych buniek²⁰. Výskyt AChE_R bol preukázaný na embryonálnych a tumorových bunkách, čo spolu s poznatkami o ARP môže naznačovať jej prípadnú úlohu v embryogenéze^{21,22}. Okrem toho existujú dôkazy, ktoré naznačujú úlohu AChE_R v regulácii stresu, nakoľko pri akútnom strese, tepelnom šoku alebo otrave organofosfátmi dochádza ku zvýšeniu hladín jej mRNA²³. Takisto pri imobilizačnom strese dochádza v myšacom mozgu až ku 3,7násobnému zvýšeniu hladín mRNA AChE_R, ale prekvapujúco nedochádza ku zmenám hladín samotnej AChE. Podobne je tomu aj pri otrave organofosfátmi (somanom), kedy sa v striate zvyšujú hladiny mRNA AChE_R, ale nedochádza ku zmenám hladín AChE (cit.²⁴). Naproti tomu pri oxidačnom strese dochádza okrem nárastu hladín mRNA AChE_R aj k šesťnásobnému nárastu hladín samotného proteínu AChE_R. Navyše sa zvýšená hladina AChE_R spája s procesmi apoptózy^{25,26}, Alzheimerovou chorobou²⁷, neuronálnym vývojom²⁸ a neuropatiami spojenými so zápalom²⁹.

2.2.4. AChE_T

U cicavcov sú najviac zastúpené T (z angl. tailed) transkripty, ktoré produkujú AChE_T podjednotky a sú zodpovedné za hydrolýzu ACh v synapsách. AChE_T je charakteristická prítomnosťou takzvaného C-terminálneho T peptidu. T peptid je dlhý 40 aminokyselín a je zodpovedný za schopnosť vytvárať širokú škálu molekulových foriem. Jednotlivé molekulové formy AChE_T rozdeľujeme na dve základné skupiny, a to na homo-oligomérne formy a na hetero-oligomérne formy. Medzi homo-oligomérne formy patria solubilné amfifilné monoméry (G1a), diméry (G2a), tetraméry (G4a), neamfifilné tetraméry (G4na) a nestabilné vyššie oligoméry. Hetero-oligomérne formy sú funkčnou formou AChE na nervovo-svalovej platničke a na cholinergných synapsách. Poznáme dve hetero-oligomérne formy^{2,3,15}. Prvou z nich je asymetrická forma, ktorá sa skladá z kotviaceho proteínu kolagénu Q (ColQ), ktorý môže kotviť 4 (A4), 8 (A8), alebo 12 (A12) katalytických podjednotiek AChE_T vo forme tetramérov. Tento typ molekulovej formy je predominantný na nervovo-svalovej platničke³⁰. Druhým typom hetero-oligomérne formy je amfifilný tetramér (G4a) katalytických podjednotiek AChE_T kotvený malým transmembránovým proteínom nazývaným PRiMA (z angl. proline-rich membrane anchor). Tento typ molekulovej formy je predominantný v nervovej sústave. Názov proteínu PRiMA bol vytvorený na základe neobvykle vysokého množstva prolínov vo

svojej štruktúre³¹.

Spoločná expresia kotviacich proteínov a AChE_T v bunke vyúsťuje do tvorby hetero-oligomérnych foriem a následné spájanie kotviacich proteínov s katalytickými podjednotkami uľahčuje transport AChE_T na bunkový povrch³². Tým, že sa AChE_T podieľa na hydrolyze ACh v synaptickej štrbine, zabraňuje neadekvátnej cholinergnej neurotransmisii. V prípade absencie AChE poprípade jej funkčných molekulových foriem dochádza k niekoľkonásobnému zvýšeniu hladín ACh v tkanivách. Avšak toto zvýšenie nie je spôsobené iba absenciou AChE, ale prekvapujúco dochádza pri absencii AChE aj ku zvýšenému uvoľňovaniu ACh z presynaptických neurónov³³. Len pre zaujímavosť, takéto zvýšené uvoľňovanie ACh je pozorované aj pri celkovej inhibícii AChE a je sprostredkované muskarínovými ACh receptormi. Naopak inhibícia BChE znižuje uvoľňovanie ACh, pričom tento mechanizmus nie je sprostredkovaný muskarínovými receptormi³⁴.

2.2.5. BChE_T

Ako bolo spomenuté vyššie, z génu pre BChE sa vytvára len jeden typ katalytických podjednotiek a to BChE_T. BChE_T má rovnaké vlastnosti ako AChE_T a tým pádom má rovnaké správanie a vytvára aj rovnaké molekulové formy, ktoré sú popísané v predchádzajúcej podkapitole.

3. Interakcie cholinesteráz s kotviacimi proteínmi

Ako bolo spomenuté vyššie, hetero-oligoméne formy cholinesteráz vznikajú na základe interakcií medzi katalytickými podjednotkami a kotviacimi proteínmi. Za tieto interakcie je v prípade AChE_T a BChE_T zodpovedný C-terminálny T peptid. Ten vo svojej štruktúre obsahuje oblasť, ktorá sa vyznačuje väčším množstvom tryptofánov a nazýva sa tryptofánová amfifilná tetramerizačná doména (WAT z angl. tryptophan (W) amphiphilic tetramerization domain)³⁵. Okrem spomínanej WAT domény prispieva ku vlastnostiam C-terminálneho T peptidu cystein v polohe 37 od C-konca polypeptidového reťazca AChE_T (cit.³⁶). Kým v prípade AChE a BChE zodpovedá za tvorbu hetero-oligomérnych foriem WAT doména, tak v prípade kotviacich proteínov ColQ a PRiMA je to oblasť v blízkosti N-terminálneho konca polypeptidového reťazca. Táto oblasť obsahuje sériu po sebe nasledujúcich prolínov. Vďaka tomu sa nazýva doména PRAD (z angl. proline-rich attachment domain). Na základe interakcií medzi WAT doménami cholinesteráz (BChE_T a AChE_T) a PRAD doménami kotviacich proteínov (ColQ a PRiMA) vznikajú hetero-oligoméne formy cholinesteráz. Presnejšie povedané, dochádza ku interakcii medzi jednou doménou PRAD s tetramérom katalytických podjednotiek cholinesteráz, ktorý obsahuje štyri domény WAT (cit.³⁷). Kotviace proteíny sa teoreticky môžu spájať aj s inými proteínmi v prípade, že obsahujú doménu WAT a tak by mohli nahradiť cholinesterázy v hetero-oligomérnych komplexoch³⁵. Asociácia tetramérov cholinesteráz s kotviacim proteínom sa líši medzi ColQ a PRiMA. Tento rozdiel

spočíva v rozdielnej dĺžke domén PRAD v ColQ a PRiMA, rozdielnym reťazcom nasledujúcim po doméne PRAD a v počte cysteínov. To má za následok, že doména PRAD ColQ sa efektívnejšie spája s tetramérom cholinesteráz ako doména PRAD PRiMA. Efektívnejšie spájanie je zapríčinené dlhšou doménou PRAD ColQ, ktorá spôsobí, že helixy domény WAT sú viac rozložené a tvoria dlhšiu špirálu³⁸. Pri spájaní ColQ s tetramérom cholinesteráz dochádza ku vzniku komplexu štyroch domén WAT s jednou doménou PRAD ([WAT]₄-PRAD). Tento komplex pozostáva z jedného antiparalelného helixu domény PRAD, okolo ktorého sú obtočené štyri paralelné helixy domény WAT. Štyri antiparalelné helixy vytvárajú jednu veľkú superzávitnicu, ktorá má spoločnú os s osou helixu PRAD. Interakcie medzi doménami WAT a PRAD sú hydrofóbného a polárneho charakteru. Hydrofóbné interakcie vznikajú medzi indolovými kruhmi tryptofánov a pyrrolidínovými štruktúrami prolínov. Polárne interakcie zahŕňajú vodíkové väzby. Interakcie medzi doménami WAT a PRAD sú zosilňované aj inými hydrofóbnymi interakciami a interakciami medzi aromatickými kruhmi³⁹.

Čo sa týka BChE, tak spájanie katalytických podjednotiek s kotviacim proteínom prebieha podobne ako v prípade AChE. Takisto dochádza ku vzniku superhelixu zo štyroch helixov jednotlivých domén WAT, ktoré sú obtočené okolo jedného antiparalelného helixu domény PRAD. V komplexe [WAT]₄-PRAD dochádza ku vzniku rovnakých hydrofóbných interakcií medzi tryptofánmi domény WAT a prolínmi domény PRAD ako v prípade AChE_T. Popri tom dochádza ku vzniku až dvanástich vodíkových väzieb medzi doménou WAT BChE a doménou PRAD (cit.⁴⁰).

Okrem spomínaných hydrofóbných interakcií a tvorbe vodíkových väzieb dochádza ku stabilizácii celého komplexu vytvorením disulfidických medzireťazcových väzieb. Konkrétne dochádza ku dvom disulfidickým väzbám medzi katalytickými podjednotkami s kotviacim proteínom za vzniku takzvaného ťažkého diméru. Ďalšie disulfidické väzby vznikajú medzi ostatnými dvoma katalytickými podjednotkami tvorbou takzvaného ľahkého diméru³⁵. Ku spájaniu kotviacich proteínov s tetramérom cholinesteráz dochádza v endoplazmatickom retikule^{41,42}. Takto vzniknuté komplexy sa následne transportujú sekrečnou cestou na povrch bunky^{37,42}. Cholinesterázy zahrnuté do komplexu s kotviacimi proteínmi sú stabilnejšie, respektíve odolnejšie voči degradácii ako samostatné katalytické podjednotky⁴³. To je zapríčinené tým, že aromatické aminokyseliny, ktoré sa nachádzajú v C-terminálnom T peptide majú vlastnosti degradačného signálu. Znamená to, že sú schopné indukovať degradáciu katalytických podjednotiek v podmienkach *in vitro*. Jedná sa o tie isté aromatické aminokyseliny, ktoré sú zahrnuté v hydrofóbných interakciách s doménou PRAD. V prípade, že sú katalytické podjednotky zahrnuté do komplexu s kotviacimi proteínmi, tak dochádza k maskovaniu, respektíve tieneniu, týchto aromatických aminokyselín, čo spôsobí, že nedochádza k degradácii katalytických podjednotiek cholinesteráz⁴¹.

4. Kotviace proteíny cholínesteráz

4.1. ColQ

Ako bolo spomenuté vyššie, jednou z hetero-oligomérnych molekulových foriem cholínesteráz je asymetrická forma zložená z kotviaceho proteínu ColQ a štyroch až dvanástich katalytických podjednotiek cholínesteráz. Táto molekulová forma sa nachádza nielen v kostrovom svalu, ale aj v iných tkanivách, ako je srdce, obličky a iné⁴⁴. ColQ nemusí byť výhradne spojený s cholínesterázami, ale môže byť samostatnou súčasťou extracelulárneho matrixu³⁰. ColQ je zložený z troch navzájom poprepletaných vlákien polypeptidového reťazca a je kódovaný samostatným génom⁴⁴, z ktorého sa môžu vytvárať dva rôzne transkripty ColQ1 a ColQ1a. Tieto dva transkripty sa navzájom líšia v prvom exóne. Kým v transkripte ColQ1 prvý exón kóduje 13 aminokyselín, v transkripte 1a je to iba 6 aminokyselín. Prvý exón či už exón 1 alebo exón 1a kóduje oblasť, ktorá predchádza doméne PRAD, tá je kódovaná exónom 2 (cit.⁴⁵). Exóny, ktoré kódujú kolagénovú doménu ColQ, majú rovnaké usporiadanie ako exóny v génoch pravých kolagénov. Napriek tomu kolagén vyskytujúci sa v molekule ColQ je odlišný od pravých kolagénov³⁰. Polypeptidový reťazec ColQ sa skladá z troch základných častí, a to z *N*-terminálnej domény, kolagénovej domény a z *C*-terminálnej domény. *N*- a *C*-terminálne domény sa vyznačujú vyšším podielom prolínov v porovnaní s kolagénovou doménou. *N*-terminálna doména obsahuje vo svojej štruktúre až 11 prolínov z celkového počtu 117 aminokyselín. Táto oblasť sa vyznačuje hydrofóbnym charakterom. Centrálna kolagénová doména je charakteristická tým, že každá tretia aminokyselina je glycín a to ju predurčuje k zaujatiu trojitej kolagénovej štruktúry. Na obidvoch koncoch kolagénovej domény sa nachádzajú cysteíny, ktoré participujú na disulfidických väzbách medzi tromi kolagénovými vláknami. Kým prvá polovica *C*-terminálnej domény obsahuje 9 prolínov, druhá polovica tejto domény obsahuje 10 cysteínov⁴⁶. Za interakciu ColQ s katalytickými podjednotkami cholínesteráz je zodpovedná *N*-terminálna doména⁴⁷, ktorej súčasťou je aj spomínaná doména PRAD. *N*-terminálna doména obsahuje dva cysteíny v polohe 70 a 71, ktoré sú schopné sa viazať s cysteínom domény WAT v polohe 37 a tak tvoriť spomínaný ťažký dimér³⁹. ColQ sa viaže na plazmatickú membránu interakciou so svalovo-špecifickou kinázou (MuSK) prostredníctvom *C*-terminálnej domény. Okrem MuSK sa na interakcii ColQ s plazmatickou membránou podieľajú aj perlekan a alfa- a beta-dystroglykán⁴⁸. Bolo zistené, že súčasťou cholinergnej transmisie sa môžu líšiť medzi jednotlivými typmi svalových vlákien. Pomalý sval ako je napríklad *m. soleus* exprimuje ColQ1 a ColQ1a transkripty. Na druhej strane rýchly sval, ako je napríklad *m. sternomastoides*, obsahuje iba ColQ1a transkripty. S rozdielnou lokalizáciou ColQ transkriptov súvisí aj rozdielna lokalizácia asymetrických foriem cholínesteráz. Zatiaľ čo rýchly sval obsahuje takmer výlučne A12 formu, tak pomalý sval ob-

sahuje okrem A12 formy aj A8 a A4. To nasvedčuje tomu, že ColQ1a viaže predovšetkým tri tetraméry katalytických podjednotiek (A12) a ColQ1 viaže prevažne jeden alebo dva tetraméry katalytických podjednotiek (A4 a A8)⁴⁵.

V kostrovom svalu sa okrem predominantnej AChE kotvovej prostredníctvom ColQ nachádzajú aj iné molekulové formy cholínesteráz, ako sú diméry AChE_H kotvené GPI a tetramér AChE_T kotvený proteínom PRiMA, ktorý má pôvod v neurónoch. Koľko AChE má pôvod v svalových bunkách a koľko v neurónoch závisí od mnohých faktorov, ako je napríklad svalová aktivita alebo vývojová fáza organizmu⁴⁹. AChE lokalizovaná na nervovo-svalovej platničke sa nachádza jednak v primárnej štrbine nervovo-svalovej platničky v blízkosti presynaptického nervového zakončenia, ale aj v sekundárnych záhyboch postsynaptickej membrány svalovej bunky. Kým hlavný podiel AChE je lokalizovaný pozdĺž presynaptickej membrány, tak nikotínové acetylcholinové receptory sa nachádzajú predovšetkým na opačnej strane synaptickej štrbiny, teda na postsynaptickej membráne. AChE kotvená prostredníctvom ColQ má svoj pôvod vo svalu a to aj v prípade, že je lokalizovaná presynapticky. Na druhej strane AChE kotvená pomocou PRiMA má svoj pôvod v motorickom neuróne⁵⁰.

4.2. PRiMA

Druhou z hetero-oligomérnych foriem je AChE_T a BChE_T kotvená prostredníctvom malého transmembránového proteínu PRiMA. PRiMA ukotvuje cholínesterázy hlavne na cholinergných synapsách v nervovej sústave. PRiMA je nevyhnutná pre lokalizáciu AChE na povrchu neurónov³¹. Na cholinergných neurónoch sa AChE kotvená pomocou PRiMA nachádza nielen na axóne, ale aj na dendritoch a tele neurónu⁵¹. Okrem nervovej sústavy sa PRiMA nachádza aj v iných tkanivách, ako je napríklad srdce, pľúca, obličky ale aj kostrový sval. Gén kódujúci PRiMA je dlhý 70 kb, nachádza sa na štrnástom chromozóme (14q32.12) v polohe 93,3 Mb od centroméry. Skladá sa z piatich exónov, ktoré sú oddelené štyrmi intrónmi. Proteín PRiMA sa skladá zo 136 aminokyselín a je dlhý približne 18–20 kDa (cit.³¹). Vzhľadom k tomu, že sa jedná o transmembránový proteín, tak je zřejmé, že jednotlivé časti polypeptidového reťazca budú vykazovať rôzny stupeň lipofility, resp. hydrofility. Rovnako ako v prípade ColQ, aj v blízkosti *N*-terminálneho konca PRiMA proteínu sa nachádzajú cysteíny, ktoré vytvárajú ťažký, popri prípade ľahký dimér⁵². PRiMA sa skladá zo štyroch častí: signálneho peptidu, *N*-terminálnej domény, transmembránovej domény a *C*-terminálnej domény. *N*-terminálna doména je spolu so signálnym peptidom lokalizovaná extracelulárne. V extracelulárnej *N*-terminálnej doméne sa nachádza v polohe 56–70 polypeptidového reťazca doména PRAD. Tá sa skladá z dvoch oblastí, pričom prvá oblasť obsahuje 4 prolíny a druhá 10 prolínov. Tieto oblasti sú nasledované dvoma leucínmi. Transmembránová doména je lipofilná a prechádza cez cytoplazmatickú membránu. Nachádza sa v polohe 92–113 polypeptidového reťazca. Táto doména je

spolu s extracelulárnou doménou plne postačujúca pre ukotvenie PRiMA do membrány. C-terminálny intracelulárny koniec nie je pre kotvenie nevyhnutný³¹. Aminokyseliny, ktoré sa nachádzajú pred doménou PRAD z N-terminálneho konca polypeptidového reťazca, nemajú vplyv na tvorbu a sekréciu komplexov AChE_T s PRiMA. V prípade skrátenia domény PRAD v proteíne PRiMA dochádza k zníženiu tvorby a zvýšeniu degradácie podjednotiek AChE (cit.⁵³). Ku spájaniu AChE_T s kotviacim proteínom PRiMA dochádza v endoplazmatickom retikule, kde nastáva interakcia domény PRAD proteínu PRiMA so štyrmi doménami WAT katalytických podjednotiek AChE_T. Komplex tetraméru katalytických podjednotiek s kotviacim proteínom prechádza do Golgiho aparátu a následne putuje na bunkový povrch, kde dochádza k ukotveniu tohto komplexu do cytoplazmatickej membrány. V prípade absencie proteínu PRiMA ostáva AChE v endoplazmatickom retikule, kde je následne degradovaná. To je dôkazom toho, že PRiMA nemá len funkciu kotviaceho proteínu, ale zohráva dôležitú úlohu aj v stabilizácii katalytických podjednotiek, v ich bunkovom transporte a finálnej lokalizácii⁴².

PRiMA podobne ako ColQ existuje v dvoch zosťrihových variantoch s tým rozdielom, že kým zosťrihové varianty ColQ sa líšia v N-terminálnej extracelulárnej doméne polypeptidového reťazca, zosťrihové varianty PRiMA sa líšia v C-terminálnej intracelulárnej doméne. Transmembránová doména a nasledujúcich 7 aminokyselín sú rovnaké vo variante I aj II. PRiMA I obsahuje 33 aminokyselín kódovaných exónom 5. PRiMA II obsahuje iba 4 aminokyseliny, ktoré sú kódované alternatívnym exónom 4b, zatiaľ čo exón 5 je v tomto variante nekódujúci. Čo sa týka lokalizácie jednotlivých foriem PRiMA, tak variant II sa vyskytuje pravdepodobne iba v mozochku, zatiaľ čo variant I je prítomný v celom organizme⁵⁴. Ako už bolo spomenuté, AChE_T kotvená prostredníctvom PRiMA, ktorá sa nachádza v kostrovom svalе na nervovo-svalovej platničke, má pôvod v motorickom neuróne. Podiel AChE_T kotvanej proteínom PRiMA je v kostrovom svalе malý⁵⁰. Existujú dôkazy, ktoré naznačujú, že časť takto kotvanej AChE je produkovaná aj samotnými svalovými bunkami. Jedným z takýchto dôkazov je fakt, že v prípade denervácie kostrového svalu dochádza k výraznému poklesu hladín AChE kotvanej proteínom PRiMA, avšak časť takejto AChE zostáva zachovaná⁵⁵.

5. Záver

Cholinesterázy vytvárajú širokú škálu molekulových foriem. Z nich sú z funkčného hľadiska dôležité najmä kotvené hetero-oligomérmé formy AChE_T a BChE_T, ktoré sú zodpovedné za hydrolyzu neurotransmitera ACh. Vznikajú na základe interakcií medzi doménou WAT podjednotiek AChE_T a BChE_T a doménou PRAD kotviacich proteínov ColQ a PRiMA. Až vznik komplexov medzi cholinesterázami a kotviacimi proteínmi umožní transport katalytických podjednotiek a ich ukotvenie na bunkový povrch v cholinergných tkanivách. To znamená, že okrem štruktú-

rálnej úlohy majú kotviace proteíny dôležitú úlohu v bunkovom transporte a finálnej lokalizácii katalytických podjednotiek cholinesteráz v tkanivách. V posledných rokoch sú cholinesterázy spájané s mnohými fyziologickými dejmi a patológiami, ako je napríklad vývoj organizmu a diferenciácia buniek v cholinergných tkanivách, Alzheimerova choroba, obezita, stres, a mnohé iné. Napriek množstvu dôležitých poznatkov z oblasti cholinesteráz a cholinergného systému zostáva ešte veľa otázok nezodpovedaných.

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied grantom VEGA 1/1139/12 2012-2014.

LITERATÚRA

1. Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F. M.: *Prog. Neurobiol.* 41, 31 (1993).
2. Massoulié J.: *Neurosignals* 11, 130 (2002).
3. Massoulié J., Bon S., Perrier N., Falasca C.: *Chem. Biol. Interact.* 157-158, 3 (2005).
4. Lynch J. T., Mattes E. C., Singh A., Bradley M. R., Brady O. R., Dretchen L. K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 363 (1997).
5. Lockridge O., Masson P.: *Neurotoxicology* 21, 113 (2000).
6. Appleyard E. M., McDonald B.: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 1074 (1992).
7. Abbott C. A., Mackness M. I., Kumar S., Olukoga A. O., Arrol S., Bhatnagar D., Boulton A. J., Durrington P. N.: *Clin. Sci.* 85, 77 (1993).
8. Getman K. D., Eubanks H. J., Camp S., Evans A. G., Taylor P.: *Am. J. Hum. Genet.* 51, 170 (1992).
9. Sikorav J. L., Duval N., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Osterlund M., Reimund B., Massoulié J.: *EMBO J.* 7, 2983 (1988).
10. Arpagaus M., Kott M., Vatsis K. P., Bartels C. F., La Du B. N., Lockridge O.: *Biochemistry* 29, 124 (1990).
11. Lockridge O., Bartels F. C., Vaughan A. T., Wong K. C., Norton E. S., Johnson L. L.: *J. Biol. Chem.* 262, 549 (1987).
12. Cousin X., Bon S., Massoulié J., Bon C.: *J. Biol. Chem.* 273, 9812 (1998).
13. Cousin X., Créminon C., Grassi J., Méflah K., Cornu G., Saliou B., Bon S., Massoulié J., Bon C.: *FEBS Lett.* 387, 196 (1996).
14. Li Y., Camp S., Rachinsky L. T., Getman D., Taylor P.: *J. Biol. Chem.* 266, 23083 (1991).
15. Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., Simon S.: *J. Physiology* 92, 183 (1998).
16. Pezzementi L., Nachon F., Chatonnet A.: *PLoS ONE* 6, e 17396 (2011).
17. Moral-Naranjo M. T., Montenegro M. F., Munoz-Delgado E., Campoy F. J., Vidal J. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 754 (2010).
18. Montenegro M. F., Ruiz-Espejo F., Campoy F. J., Munoz-Delgado E., Páez de la Cadena M., Rodríguez-Berrocal F. J., Vidal J. C.: *Cell. Mol. Life Sci.* 63,

- 2175 (2006).
19. Legay C., Bon S., Massoulié J.: *FEBS Lett.* 315, 163 (1993).
 20. Grisaru D., Deutsch V., Shapira M., Pick M., Sternfeld M., Melamed-Book N., Kaufer D., Galyam N., Gait M. J., Owen D., Lessing J. B., Eldor A., Soreq H.: *Mol. Med.* 7, 93 (2001).
 21. Karpel R., Aziz-Aloya B. R., Sternfeld M., Ehrlich G., Ginzberg D., Tarroni P., Clementi F., Zakut H., Soreq H.: *Exp. Cell. Res.* 210, 268 (1994).
 22. Karpel R., Sternfeld M., Ginzberg D., Guhl E., Graessmann A., Soreq H.: *J. Neurochem.* 66, 114 (1996).
 23. Perrier N. A., Salani M., Falasca C., Bon S., Augusti-Tocco G., Massoulié J.: *J. Neurochem.* 94, 629 (2005).
 24. Perrier N. A., Salani M., Falasca C., Bon S., Augusti-Tocco G., Massoulié J.: *J. Mol. Neurosci.* 30, 75 (2006).
 25. Härtl R., Gleinich A., Zimmermann M.: *J. Neurochem.* 116, 1088 (2011).
 26. Pegan K., Matkovic U., Mars T., Mis K., Pirkmajer S., Breclj J., Grubic Z.: *Chem. Biol. Interact.* 187, 96 (2010).
 27. Berson A., Knobloch M., Hanan M., Diamant S., Sharoni M., Schuppli D., Geyer B. C., Ravid R., Mor T. S., Nitsch R. M., Soreq H.: *Brain* 131, 109 (2008).
 28. Dori A., Soreq H.: *J. Mol. Neurosci.* 28, 247 (2006).
 29. Dori A., Ifergane G., Saar-Levy T., Bersudsky M., Mor I., Soreq H., Wirguin I.: *Life Sci.* 80, 2369 (2007).
 30. Krejci E., Thomine S., Boschetti N., Legay C., Sketelj J., Massoulié J.: *J. Biol. Chem.* 272, 22840 (1997).
 31. Perrier A. L., Massoulié J., Krejci E.: *Neuron* 33, 275 (2002).
 32. Bon S., Massoulié J.: *J. Biol. Chem.* 272, 3007 (1997).
 33. Minic J., Molgó J., Karlsson E., Krejci E.: *Eur. J. Neurosci.* 15, 439 (2002).
 34. Minic J., Chatonnet A., Krejci E., Molgó J.: *Br. J. Pharmacol.* 138, 177 (2003).
 35. Simon S., Krejci E., Massoulié J.: *EMBO J.* 17, 6178 (1998).
 36. Belbeoch S., Falasca C., Leroy J., Ayon A., Massoulié J., Bon S.: *Eur. J. Biochem.* 271, 1476 (2004).
 37. Bon S., Coussen F., Massoulié J.: *J. Biol. Chem.* 272, 3016 (1997).
 38. Noureddine H., Carvalho S., Schmitt C., Massoulié J., Bon S.: *J. Biol. Chem.* 283, 20722 (2008).
 39. Dvir H., Harel M., Bon S., Liu W. Q., Vidal M., Garbay C., Sussmal J. L., Massoulié J., Silman I.: *EMBO J.* 23, 4394 (2004).
 40. Pan Y., Muzyka J. L., Zhan C. G.: *J. Phys. Chem.* 113, 6543 (2009).
 41. Belbeoch S., Massoulié J., Bon S.: *EMBO J.* 22, 3536 (2003).
 42. Dobbertin A., Hrabovska A., Dembele K., Camp S., Taylor P., Krejci E., Bernard V.: *J. Neurosci.* 29, 4519 (2009).
 43. Legay C., Mankal F. A., Massoulié J., Jasmin B. J.: *J. Neurosci.* 19, 8252 (1999).
 44. Feng G., Krejci E., Molgo J., Cunningham J. M., Massoulié J., Sanes J. R.: *J. Cell Biol.* 144, 1349 (1999).
 45. Krejci E., Legay C., Thomine S., Sketelj J., Massoulié J.: *J. Neurosci.* 19, 10672 (1999).
 46. Krejci E., Coussen F., Duval N., Chatel J. M., Legay C., Puype M., Vandekerckhove J., Cartaud J., Bon S., Massoulié J.: *EMBO J.* 10, 1285 (1991).
 47. Duval N., Krejci E., Grassi J., Coussen F., Massoulié J., Bon S.: *EMBO J.* 11, 3255 (1992).
 48. Cartaud A., Strohlic L., Guerra M., Blanchard B., Lambergeon M., Krejci E., Cartaud J., Legay C.: *J. Cell Biol.* 165, 505 (2004).
 49. Jevsek M., Mars T., Mis K., Grubic Z.: *Eur. J. Neurosci.* 20, 2865 (2004).
 50. Bernard V., Girard E., Hrabovska A., Camp S., Taylor P., Plaud B., Krejci E.: *Mol. Cell Neurosci.* 46, 272 (2011).
 51. Henderson Z., Matto N., John D., Nalivaeva N. N., Turner A. J.: *Brain Res.* 1344, 34 (2010).
 52. Navaratnam D. S., Fernando F. S., Priddle J. D., Giles K., Clegg S. M., Pappin D. J., Craig I., Smith A. D.: *J. Neurochem.* 74, 2146 (2000).
 53. Noureddine H., Schmitt C., Liu W., Garbay C., Massoulié J., Bon S.: *J. Biol. Chem.* 282, 3487 (2007).
 54. Perrier N. A., Khérif S., Perrier A. L., Dumas S., Mallet J., Massoulié J.: *Eur. J. Neurosci.* 18, 1837 (2003).
 55. Leung K. W., Xie H. Q., Chen V. P., Mok M. K., Chu G. K., Choi R. C., Tsim K. W.: *FEBS J.* 276, 3031 (2009).

M. Kučera and A. Hrabovská (*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Molecular Forms of Cholinesterases and Their Anchoring Proteins**

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are the two enzymes that predominantly break down choline esters. The AChE gene produces four types of subunits based on alternative splicing; the BChE gene just one. The tailed AChE and BChE subunits form soluble oligomers and anchored hetero-oligomers. Hetero-oligomers are functional forms of cholinesterases in cholinergic synapses and at neuromuscular junctions. The hetero-oligomers consist of anchoring proteins and catalytic subunits held together by hydrophobic interactions. Cholinesterases anchored by collagen Q predominate in skeletal muscle while cholinesterase assembled with proline-rich membrane anchor are predominant in the nervous system.