

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Fyziologický ústav Akademie věd České republiky – oddělení neurochemie**

Bakalářská práce oboru Molekulární biologie a biochemie organismů

Expresa cholinergních proteinů



Vypracoval: Pavel Zimčík

Školitel: MUDr. Vladimír Doležal, DrSc.

Praha 2008

Poděkování:

Úvodním odstavcem bych rád poděkoval mému školiteli MUDr. Vladimíru Doležalovi, DrSc. za vedení při zpracování této práce a celému oddělení neurochemie Fyziologického ústavu AV ČR za rady a připomínky.

Obsah:

Poděkování

Obsah

Seznam zkratk

Abstrakt

1. Úvod

2. Charakterizace proteinů cholinergního genového lokusu

2.1. Váčkový přenašeč pro acetylcholin

2.2. Cholin acetyltransferáza

3. Genové uspořádání

4. Regulace exprese

5. Patofyziologie cholinergních neuronů a neurotransmise

5.1. Alzheimerova choroba

6. Závěr

Použitá literatura

Seznam zkratek:

AD	Alzheimerova nemoc (Alzheimer disease)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AK	aminokyselina
A β	β -amyloid
CNS	centrální nervová soustava
ChAT	cholin acetyltransferáza
PNS	periferní nervová soustava
TM doména	transmembránová doména
VACht	váčkový přenašeč pro acetylcholin (vesicular acetylcholine transporter)
VMAT	váčkový přenašeč pro monoaminy (vesicular monoamine transporter)

Abstrakt:

Cholinergní fenotyp nervové buňky je určen expresí váčkového přenašeče pro acetylcholin (VACHT) a cholin acetyltransferázy (ChAT). ChAT syntetizuje acetylcholin z cholinu a acetyl koenzymu A a VACHT transportuje acetylcholin do synaptických váčků. Oba zmíněné proteiny sdílejí stejné genové místo označované jako cholinergní genový lokus, který leží na chromozomu 10q11.2. Uspořádání genů a jejich regulačních míst umožňuje koexpresi nebo oddělenou expresi cholinergních markerů VACHT a ChAT. Četné experimenty ukázaly přítomnost odlišných mRNA, které kódují proteiny cholinergního genového lokusu. To naznačuje, že pre-mRNA prochází alternativním splicingem. Stárnutí a řada neurodegenerativních nemocí jako Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza nebo schizofrenie jsou propojeny se snižováním aktivity mozkové cholinergní transmise. Porozumění základním principům genové exprese a studium zachování cholinergního fenotypu je důležitým krokem při objevování nových léčebných postupů pro tyto nemoci.

Klíčová slova: acetylcholin, cholinergní genový lokus, váčkový přenašeč pro acetylcholin, cholin acetyltransferáza, neurodegenerativní onemocnění, Alzheimerova choroba.

Cholinergic phenotype of the neuronal cells is determined by the expression of vesicular acetylcholine transporter (VACHT) and choline acetyltransferase (ChAT). ChAT synthesizes acetylcholine from acetyl-coenzyme A and choline and VACHT transports acetylcholine to synaptic vesicles. Genes for these proteins share common gene position known as cholinergic gene locus localized to chromosome 10q11.2. The collocation of genes and their regulation sites allows coexpression as well as separate expression of cholinergic markers VACHT and ChAT. Extensive experiments showed presence of various mRNAs for proteins encoded in cholinergic gene locus. It suggests that the pre-mRNA is spliced alternatively. Natural aging and various neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, or schizophrenia are connected with decline of brain cholinergic transmission. Understanding of basic principles of gene expression and maintenance of cholinergic phenotype thus important for discovering new treatments for these diseases.

1. Úvod

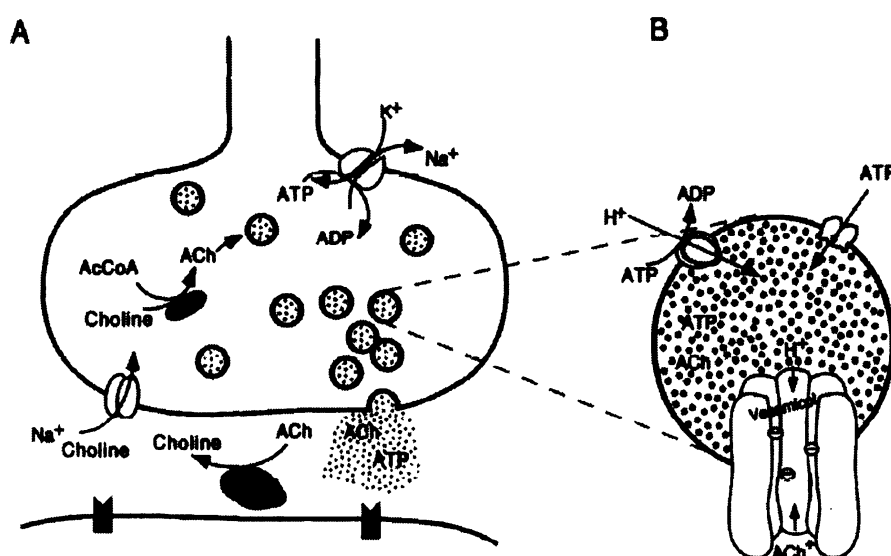
Acetylcholin (ACh) byl první látkou identifikovanou jako neurotransmitter a řadí se mezi nejdůležitější nervové přenašeče v živočišném těle. Fyziologické účinky ACh byly popsány ve dvacátých letech 19. stol. Otto Loewim, jeho syntéza a degradace asi o 20 let později.

Jako neurotransmitter se ACh uplatňuje jak v centrální, tak i v periferní nervové soustavě, např. na nervosvalových ploténkách příčně pruhovaných svalů, na synapsích parasymptického nervového systému u hladkých svalů včetně srdce (nervus vagus), na synapsích ganglií sympatického i parasymptického nervového systému a na mnoha místech uvnitř centrální nervové soustavy, kde cholinergní síť hraje důležitou roli např. při učení, paměti, spánku a pohybu.

Cholinergním neuronem označujeme buňku, která syntetizuje ACh, transportuje ho do presynaptických váčků a po příchodu akčního potenciálu ho uvolňuje do synaptické štěrbině. Cholinergní fenotyp těchto neuronů je charakterizován přítomností enzymu právě pro syntézu ACh (cholin acetyltransferáza - ChAT) a váčkového transportéru pro ACh (váčkový acetylcholinový přenašeč - VACHT). V oblasti cholinergní synapse jsou přítomny další proteiny související s metabolismem ACh. Jedná se především o vysokoafinitní cholinový přenašeč (ChT1), který je umístěn v presynaptické membráně a slouží k dopravě cholinu do buňky (Okuda a Haga, 2000). Tento přenašeč je rovněž charakteristický pro cholinergní neurony. Další proteiny charakteristické pro cholinergní neuron jsou acetylcholinesteráza (AChE; synaptická štěrbině), která inaktivuje uvolněný ACh, a receptory pro ACh, které zprostředkovávají přenos signálu do buněk (presynaptická i postsynaptická membrána).

ACh je syntetizován v cytoplazmě nervových zakončení cholinergních neuronů z cholinu a acetyl koenzymu A za přispění ChAT. Cholin je do buňky transportován z extracelulárního prostoru za přispění vysokoafinitního Na^+ -dependetního cholinového transportéru ChT1. Acetyl koenzym A vzniká v nervovém zakončení při oxidativním metabolismu glukózy. Váčkový přenašeč VACHT poté transportuje ACh z cytoplazmy do synaptických váčků. V membráně váčků se nachází také elektrogenní H^+ -ATPáza typu V, která vytváří na membráně protonový gradient. VACHT užívá tento gradient a funguje tedy jako H^+ /ACh antiporter. Koncentrace ACh ve váčcích je asi stonásobně vyšší než v cytoplazmě. Synaptické váčky naplněné ACh a připravené pro uvolnění jsou ukotveny do aktivních zón na presynaptickém elementu a po příchodu akčního potenciálu je ACh uvolňován do synaptické štěrbině. Uvolněný ACh předává signál na sousední buňku, a to prostřednictvím ionotropních (nikotinových) nebo metabotropních (muskarinových) acetylcholinových receptorů. Pokud

jsou tyto receptory umístěny také na presynaptické membráně, mohou zpětnovazebně regulovat uvolňování ACh. Pro správnou funkčnost přenosu je nutné, aby byl ACh přítomen v synaptické štěrbině jen na velmi krátkou dobu. Proto je zde přítomen enzym AChE, která ukončuje účinek ACh tím, že štěpí uvolněný ACh na cholin a acetát. AChE je jedním z nejprocesivnějších enzymů v živočišném organismu. Cholin vzniklý rozštěpením ACh je vychytáván zpět do presynaptického zakončení a slouží opět jako substrát pro syntézu ACh (obr. 1).



Obrázek 1: Schéma hospodaření s ACh v nervovém zakončení (A), synaptický váček (B) (podle Usdin a kol., 1995)

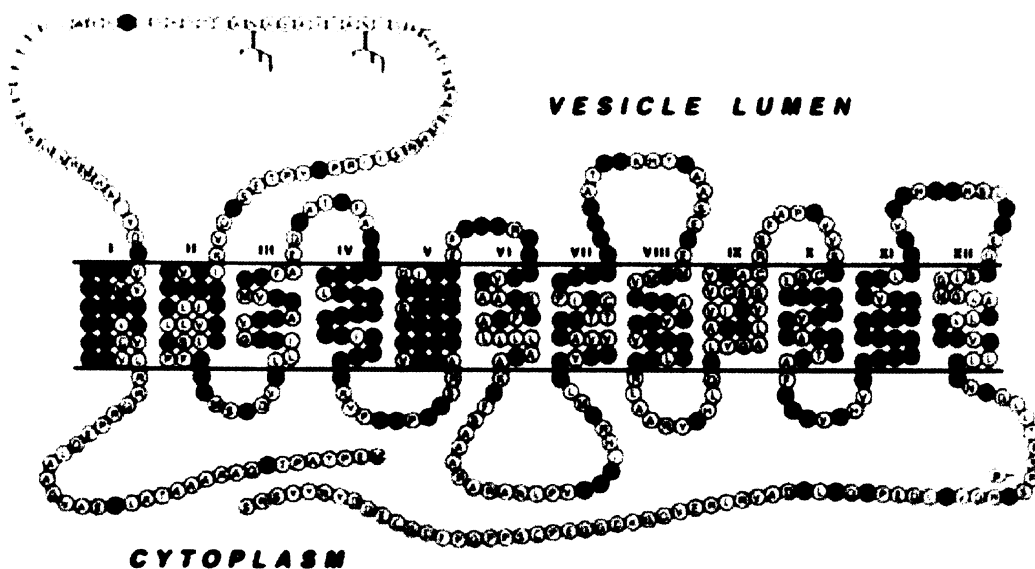
Cholinergní fenotyp neuronu je determinován expresí tzv. cholinergního genového lokusu. Locus o délce asi 80kb je situován na lidském chromozomu 10q11.2. a nese geny pro proteiny ChAT a V_{AChT} a regulační sekvence pro jejich expresi. Geny jsou zde lokalizovány tak, že gen pro V_{AChT} je obsažen v prvním intronu genu pro ChAT. Je důležité zmínit, že oba geny leží ve stejné transkripční orientaci.

Moje práce se zabývá popisem cholinergního genového lokusu, zde kódovaných proteinů, regulací proteinové exprese a v neposlední řadě patogenními vlivy na regulaci cholinergního místa.

2. Charakterizace proteinů cholinergního genového lokusu

2.1. Váčekový přenašeč pro acetylcholin

Vesikulární acetylcholinový transportér je transmembránový protein o délce 500-600 aminokyselin (v závislosti na živočišném druhu). Po sekvenaci mRNA, zhodnocením indexu hydrofobicity a predikcí sekundární struktury bylo zjištěno, že VACHT obsahuje celkem 12 transmembránových domén (TM). Oba proteinové konce jsou umístěny extravesikulárně a mají hydrofilní charakter. Mezi 1. a 2. TM doménou se nachází dlouhá intravesikulární glykozylovaná smyčka (obr. 2).



Obrázek 2: Předpokládaná sekvence aminokyselin, rozložení TM domén a glykozylačních míst u VACHT (podle Erickson a kol., 1994)

Tyto popsané charakteristiky řadí VACHT do rodiny transportních proteinů, kam lze zařadit unc-1 (předpokládaný gen pro vesikulární transportér u *Caenorhabditis elegans*) a přenašeče pro další neurotransmitery (dopamin, serotonin, noradrenalin) označované jako VMATs (vesicular monoamine transporters). Tyto proteiny jsou mezi sebou více či méně sekvenčně homologní a mají pravděpodobně společný původ v proteinech označovaných jako TEXANs (toxin exporting and proton exchanging antiporters), které se vyskytují jak u bakterií tak i eukaryot (Eiden, 1998; Usdin a kol., 1995).

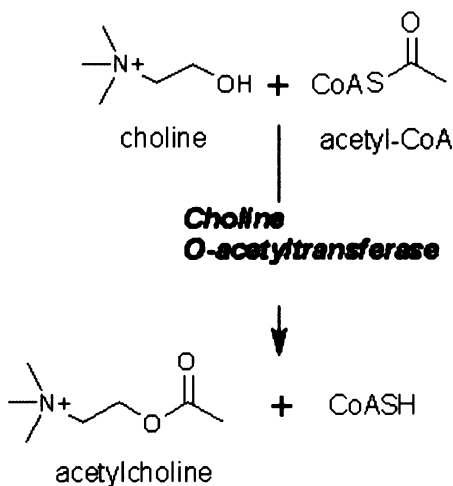
Transport ACh z cytoplazmy do vesikulů je poháněn protonovým elektrochemickým gradientem. Gradient je produkován ATPázou, která transportuje protony do váčku za

současného rozkladu ATP. Tím produkuje jak chemický (uvnitř kyselý), tak elektrický (uvnitř kladný) gradient. Gradient je využíván proteinem VAcHT, který transportuje ACh do váčků. Poměr přenosu ACh/H⁺ byl stanoven na 1:2 (Nguyen a kol., 1998).

Specifickým blokátorem VAcHT je nervosvalový blokátor vezamikol. Na rozdíl od nervosvalových blokátorů, které blokují postsynaptické nikotinové receptory, se vezamikol váže na VAcHT a blokuje ACh transport do váčků a tím i jeho uvolňování. VAcHT byl u myši (*Mus musculus*) a u parejnoka (*Torpedo marmorata*) identifikován právě použitím vezamikolu, a proto se také označoval jako vezamikol-vážící (senzitivní) transportér. Inhibitory dalších členů proteinové rodiny VMAT jsou například rezerpin nebo tetrabenazin (Erickson a kol., 1994).

2.2. Cholin acetyltransferáza

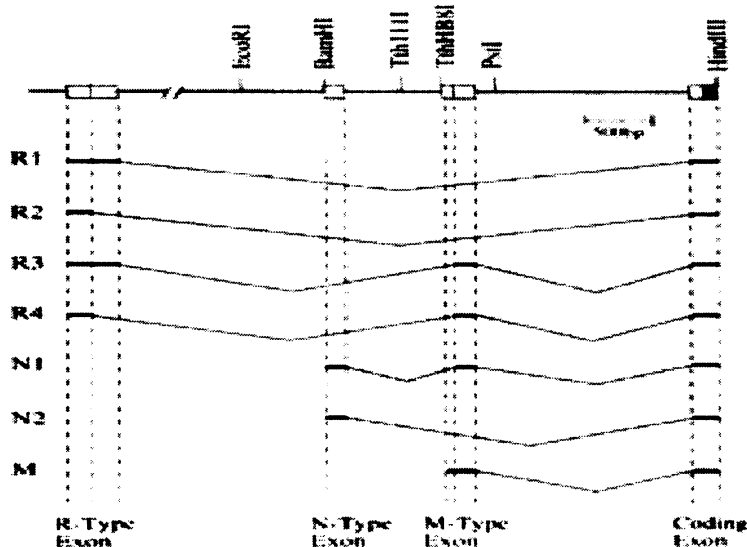
Choline acetyltransferáza (choline-O-acetyltransferáza, EC 2.3.1.6) je zodpovědná za syntézu ACh v nervovém zakončení cholinergního neuronu, substrátem je jí cholin a acetyl koenzym A. V případě ACh se jedná pouze o jedнокrokovou syntézu a je tedy méně energeticky a enzymaticky náročná v porovnání se syntézou jiných neurotransmiterů (obr. 3).



Obrázek 3: Syntéza ACh

Syntéza ChAT probíhá v těle neuronu a do nervového zakončení je transportována pomalým i rychlým axoplazmatickým tokem. Z cholinergních buněk bylo izolováno více typů mRNA pro ChAT, které se sekvenčně liší. Tento jev je zapříčiněn prepisem ChAT genu z více promotorů a různým způsobem sestřihu primárních transkriptů. Tyto transkripty se označují podle svého prvního exonu: R-, N- a M-typ, přičemž M forma je v neuronu

nejzastoupenější. Transkripty se liší na své nepřekládané oblasti na 5' konci (obr. 4) (Misawa a kol., 1992).



Obrázek 4: Uspořádání exonů genu ChAT na cholinergním genovém lokusu (podle Misawa a kol., 1992).

U hlodavců vzniká translací všech typů mRNA stejný enzym. U člověka M-typ kóduje malou i velkou formu enzymu, zatímco R- a N-typ pouze malou formu ChAT, která odpovídá ChAT u hlodavců (Oda, 1999).

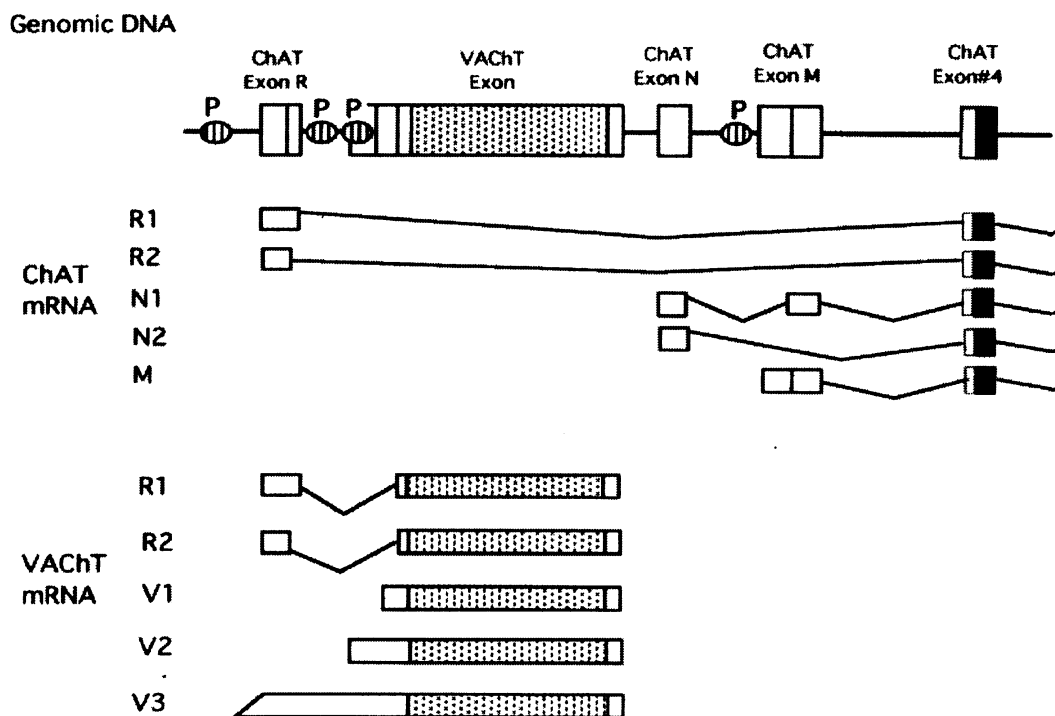
Další zajímavostí tohoto enzymu je jeho výskyt v nervovém zakončení ve volné (soluble) a membránově vázané (membrane-bound) formě. Studium na octomilce (*Drosophila*) dokázalo, že obě tyto formy mají stejnou molekulovou váhu (75kDa). Solubilní formy se v buňce vyskytuje 80-90% a 10-20% připadá na membránově vázanou formu. U octomilky se vázaná forma ChAT nachází asociována pouze s plazmatickou membránou (Pahud a kol., 1998), kdežto v hypokampální tkáni potkana byla zjištěna přítomnost ChAT vázané i na synaptické váčky (Carroll, 1994).

V závislosti na druhu se délka řetězce ChAT pohybuje mezi 640-720 aminokyselinami. U člověka může probíhat translace mRNA M-typu ze dvou různých iniciačních kodónů a dát tak vzniku malé (630 AK) a velké (748 AK) formě ChAT. Experimentálně bylo dokázáno, že malá i velká forma se v míře své aktivity neliší (Oda a kol., 1996).

3. Genové uspořádání

Jak již bylo řečeno výše, celý gen pro VAcHT leží na prvním intronu genu pro ChAT. První pozorování bylo provedeno na hlístici (*Caenorhabditis elegans*), kde gen *cha-1* (kódující protein ChAT) nese ve svém prvním intronu gen *unc-17* (kódující protein VAcHT). Přepis celého úseku dá vzniknout primárnímu dlouhému transkriptu. mRNA pro ChAT a VAcHT je poté z tohoto úseku vyštěpena procesem alternativního splicingu. V případě nematod je finální mRNA pro VAcHT složena ze 4 od sebe oddělených exonů a mRNA pro ChAT je složena z 11 exonů, přičemž první exon je společný oběma genům. Předpokládá se, že každá mRNA je vystřižena z jednoho společného transkriptu, který je přepisován pouze od jednoho promotoru (Alfonso a kol., 1994). U savců nastává odlišná situace. Gen pro VAcHT je v intronu uložen celý a nepřerušovaný.

Transkripce cholinergního lokusu může vycházet z více možných promotorů a primární transkript poté prochází alternativním sestřihem. To má za následek, že v savcích cholinergních neuronech lze identifikovat více skupin mRNA pro VAcHT i ChAT. Podtypy mRNA pro oba proteiny jsou označeny podle své skladby, která se liší v obsahu tří exonů označených jako R, N a M (obr. 5) (Bejanin a kol., 1994; Misawa a kol., 1992).



Obrázek 5: Genové uspořádání cholinergního genového lokusu a typy transkribovaných mRNA. P - promotory (podle Oda, 1999)

Řada experimentů se snažila prokázat umístění promotorů na cholinergním lokusu a zjistit, zda existují promotory společné pro oba geny. Geny (VACHT i ChAT) označené jako R mají společný promotor, který je umístěn před R exonem a tedy může generovat mRNA pro oba proteiny. V tomto případě jsou ChAT i VACHT mRNA produkovány tehdy, pokud se transkripce nezastaví na sekvenci kódující polyadenylační konec VACHT mRNA. Pokud je zde transkripce přerušena, je generována VACHT mRNA typu V3 nebo její sestřihem upravené verze R1 a R2. Transkripcí celého úseku od R-exonu až po terminační úsek za genem pro ChAT vzniká dlouhá pre-mRNA, ze které je vystřižen celý úsek (7kb) VACHT genu. Tento proces vede ke vzniku R variant ChAT mRNA. VACHT mRNA označená jako V1 a V2 má promotory situované mezi exonem R a sekvencí kódující VACHT. mRNA varianty ChAT genu označované N a M mají promotory umístěné za kódující sekvencí VACHT genu (Cervini a kol., 1995; Mallet a kol., 1998).

4. Regulace exprese

Proteiny cholinergního lokusu mohou být exprimovány společně nebo každý zvlášť. Toto tvrzení se odvíjí od přítomnosti regulačních míst na lokusu, která jsou oběma genům společná a regulačních míst vlastních pouze jednomu z genů. Současné odborné práce se zabývají studiem těchto míst a hlavně látek, které mají vliv na zesílení či zeslabení exprese (enhancers, silencers).

Uspořádání genů v rámci cholinergního místa by se dalo připodobnit operonovému modelu, který se vyskytuje u prokaryot. Tento model popisuje uspořádání více genů (například enzymů pro syntézu určité aminokyseliny při jejím nedostatku) jdoucích sekvenčně za sebou. Celé sekvenci připadá pouze jedno regulační místo. V buňce je tedy přítomen buď celý enzymatický aparát nebo žádný z enzymů spadající do daného operonu. I cholinergní genový lokus má jedno nebo více společných regulačních míst. Exprese obou genů zároveň z jedné pre-mRNA vede pak k R-modelu popsaném výše. Tento model je ale zastoupen minoritně.

Častější je jiný případ koexprese. V rámci neuronu existují signální kaskády, které jsou spouštěny jednou signální molekulou, indukující expresi ChAT i VACHT proteinu, ale ne přes společný transkript. Mezi dané molekuly patří např. cholinergní diferenciací faktor/leukémii inhibující faktor, kyselina retinová a cAMP (Berse a Blusztajn, 1995). NGF (nerve growth factor) také zvyšuje expresi obou proteinů (Berse a kol., 1999). Cis-acting elementů (společných regulačních míst) je na cholinergním lokusu více, každý element pak spadá pod kontrolu jiné/jiných regulačních molekul. Toto vede k tvrzení, že regulace cholinergního místa je komplexní záležitostí, na které se podílí řada signálních kaskád. U výše uvedených látek byl prokázán vliv na zvýšenou expresi cholinergních proteinů. V roce 2000 byla u myši identifikována látka (morphogenetic protein 9), která nejen že zvyšuje expresi, ale je zodpovědná i za indukci exprese ChAT a VACHT a tím i za cholinergní fenotyp neuronu (Lopez-Coviella a kol., 2000).

To, zda se budou oba geny koexprimovat, nebo se bude každý z genů exprimovat zvlášť, závisí na umístění neuronu v rámci NS a jeho vývojovém a funkčním stavu. Poměr koexprese versus oddělená exprese můžou nastítnit experimenty prováděné na potkanech. *In situ* hybridizací bylo zjištěno, že u embryí potkana je v rámci všech předpokládaných cholinergních neuronů vyšší koncentrace mRNA pro protein VACHT v porovnání s ChAT mRNA. U dospělého jedince se v cholinergních oblastech CNS a motorických neuronech tento poměr vyrovná, zatímco v periferních cholinergních gangliích je exprimováno více proteinu VACHT (Schutz a kol., 2001). Oddělená exprese námi sledovaných genů může mít

za následek velikost ACh kvant obsažených ve váčcích. Afinity proteinu VChT k ACh byla stanovena přibližně na 1 mM, což je také odhadovaná hodnota koncentrace ACh v cytoplazmě cholinergního neuronu zajištěná funkcí ChAT. Poměr těchto proteinů v nervovém zakončení pak tedy ovlivní i míru plnění váčků (Weihe a kol., 1998).

5. Patofyziologie cholinergních neuronů a neurotransmise

Do dnešní doby byla popsána řada neurodegenerativních nemocí, které se nějakým způsobem týkají regulace exprese cholinergního genového lokusu nebo funkcí proteinů z něj exprimovaných. Mezi tyto nemoci patří například Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Huntingtonova nemoc, schizofrenie, syndrom nenadálého úmrtí kojence a další. Ve své práci se krátce zmíním o Alzheimerově chorobě a o úloze cholinergních neuronů při její patogenezi.

5.1. Alzheimerova choroba (AD)

AD je neurodegenerativní onemocnění, které postihuje CNS. Výskyt nemoci se zvyšuje s věkem a projevuje se poruchami krátkodobé paměti, zapomínáním, nepředvídatelným chováním apod. Obecně uznávanou prvotní příčinou onemocnění je zvýšená tvorba β -amyloidu ($A\beta$), jehož hromadění v CNS lze posmrtně AD diagnostikovat. $A\beta$ vzniká štěpením proteinu prekursor amyloidu (amyloid precursor protein) za účasti enzymů označovaných jako sekretázy. Nahromadění amyloidu v CNS společně s atrofovanými neurony a buňkami imunitního systému se označuje jako neuritický plak. Dalším příznakem AD je přítomnost neurofibrilárních klubíček složených ze spárovaných a jednoduchých vláken tvořených z velké části hyperfosforylovanou formou proteinu τ (tau, protein asociovaný s mikrotubuly).

Rozlišujeme dvě formy AD – dědičnou a sporadickou. U dědičných forem onemocnění jsou příčinou zvýšené tvorby β -amyloidu známé mutace genů pro protein prekursor amyloidu, ze kterého se $A\beta$ odštěpuje, a proteiny presenilin 1 a 2, které jsou součástí komplexu bílkovin působících jako γ -sekretáza (Kar a kol., 2004). Ke vzniku a rozvoji nemoci také přispívá alelická varianta apolipoproteinu E ApoE4 (Corder a kol., 1993), která onemocnění přímo nevyvolává, ale představuje nejvýznamnější rizikový faktor. Příčina zvýšené tvorby $A\beta$ u sporadických forem onemocnění, které ale představují až 98% všech případů, není známá.

V průběhu nemoci dochází k oslabování cholinergního přenosu, které je následkem poklesu aktivity bílkovin podílejících se na hospodaření s ACh. Pokročilá stádia onemocnění jsou doprovázena zánikem cholinergních neuronů. Dopusud však není zřejmé, zda je poškození funkce a zánik cholinergních neuronů pouze doprovodným projevem onemocnění, nebo zda se oslabená funkce cholinergních neuronů podílí na vzniku a rozvoji onemocnění. Zásadní úlohu mozkových cholinergních neuronů v patogenezi Alzheimerovy nemoci předpokládá cholinergní teorie Alzheimerovy nemoci (Bartus a kol., 1982).

6. Závěr

Možnost koexprese váčkového přenašeče a enzymu pro syntézu ACh a přítomnost společných regulačních míst svědčí o těsném funkčním svázání obou proteinů. Jejich společné působení je nezbytné pro metabolismus ACh a tedy i pro správnou funkci cholinergní synapse.

Vazba mezi oběma geny je fylogeneticky velmi konzervována, protože stejné uspořádání bylo nalezeno a zkoumáno jak u členovců (*Drosophila*), hlístic (*C. elegans*) tak u obratlovců (myš, člověk). Unikátní uspořádání sledovaných genů nám poskytuje jedinečnou možnost pozorování a studia operonového modelu u eukaryot, kde se podobné uspořádání vyskytuje jen vzácně. To, že jsou operony časté především u prokaryot, svědčí také o úzké vazbě proteinů VAcHT a ChAT a lze z něj usuzovat na mnohem hlubší vývojové vztahy.

Naši pozornost si proteiny cholinergního místa zaslouží také díky své účasti v řadě neurodegenerativních nemocí. Nejdiskutovanější nemocí je Alzheimerova choroba, která se vyskytuje u čím dál větší části lidské populace a dosud není známa efektivní léčba. Jedinými doposud známými léky, i když jen s omezenou účinností, jsou látky, které posilují nervový přenos na mozkových cholinergních synapsích. U opic bylo zjištěno, že i při přirozeném stárnutí dochází k oslabování nervového přenosu na mozkových cholinergních synapsích, které je doprovázeno vratným snížením exprese cholinergního fenotypu (Smith a kol., 1999). Oslabování cholinergního nervového přenosu v průběhu stárnutí bylo popsáno u kontrolních myší a ve vystupňované podobě u transgenních myší, které produkují zvýšené množství A β (Machová a kol., 2008). Tyto pokusy ukazují na užitečnost zkoumání exprese a regulace exprese cholinergního lokusu pro pochopení účasti cholinergních neuronů v patogenezi neurodegenerativních onemocnění a pro možnosti jejich léčby.

Použitá literatura:

- Alfonso A, Grundahl K, McManus JR, Asbury JM, Rand JB. 1994. Alternative splicing leads to two cholinergic proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 241(4):627-630.
- Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558):408-414.
- Bejanin S, Cervini R, Mallet J, Berrard S. 1994. A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem* 269(35):21944-21947.
- Berse B, Blusztajn JK. 1995. Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem* 270(38):22101-22104.
- Berse B, Lopez-Coviella I, Blusztajn JK. 1999. Activation of TrkA by nerve growth factor upregulates expression of the cholinergic gene locus but attenuates the response to ciliary neurotrophic growth factor. *Biochem J* 342 (Pt 2):301-308.
- Carroll PT. 1994. Membrane-bound choline-O-acetyltransferase in rat hippocampal tissue is associated with synaptic vesicles. *Brain Res* 633(1-2):112-118.
- Cervini R, Houhou L, Pradat PF, Bejanin S, Mallet J, Berrard S. 1995. Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. *J Biol Chem* 270(42):24654-24657.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261(5123):921-923.
- Eiden LE. 1998. The cholinergic gene locus. *J Neurochem* 70(6):2227-2240.
- Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB. 1994. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* 269(35):21929-21932.
- Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. 2004. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 29(6):427-441.
- Lopez-Coviella I, Berse B, Krauss R, Thies RS, Blusztajn JK. 2000. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* 289(5477):313-316.
- Machová E, Jakubík J, Michal P, Oksman M, Iivonen H, Tanila H, Doležal V. 2008. Impairment of muscarinic transmission in transgenic APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Aging* 29(3):368-378.
- Mallet J, Houhou L, Pajak F, Oda Y, Cervini R, Bejanin S, Berrard S. 1998. The cholinergic locus: ChAT and VACHT genes. *J Physiol Paris* 92(2):145-147.
- Misawa H, Ishii K, Deguchi T. 1992. Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. *J Biol Chem* 267(28):20392-20399.
- Nguyen ML, Cox GD, Parsons SM. 1998. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry* 37(38):13400-13410.
- Oda Y. 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49(11):921-937.
- Oda Y, Muroishi Y, Nakanishi I. 1996. Translation initiation sites and relative activity of large and small forms of human choline acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* 38(1):135-138.

- Okuda T, Haga T. 2000. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett* 484(2):92-97.
- Pahud G, Salem N, van de Goor J, Medilanski J, Pellegrinelli N, Eder-Colli L. 1998. Study of subcellular localization of membrane-bound choline acetyltransferase in *Drosophila* central nervous system and its association with membranes. *Eur J Neurosci* 10(5):1644-1653.
- Schutz B, Weihe E, Eiden LE. 2001. Independent patterns of transcription for the products of the rat cholinergic gene locus. *Neuroscience* 104(3):633-642.
- Smith DE, Roberts J, Gage FH, Tuszynski MH. 1999. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19):10893-10898.
- Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI, Erickson JD. 1995. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci* 18(5):218-224.
- Weihe E, Schafer MK, Schutz B, Anlauf M, Depboylu C, Brett C, Chen L, Eiden LE. 1998. From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron. *J Physiol Paris* 92(5-6):385-388.