

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Modulace centrální cholinergní neurotransmise**

**Modulation of central cholinergic neurotransmission**

Mgr. Paulína Valušková

Praha 2017

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka  
Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.  
Školící pracoviště: Univerzita Karlova v Praze  
Fyziologický ústav 1. LF UK  
Albertov 5, 128 00 Praha 2  
Školitel: prof. MUDr. Jaromír Mysliveček, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Souhrn

**Úvod:** Centrální cholinergní systém hraje klíčovou roli při kontrole různých mozkových funkcí, jakými jsou paměť, učení, pozornost, motorika a odměňování. Narušená integrita, regulace, nebo kapacita cholinergní signalizace je úzce spjata s kognitivními symptomy mnohých neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění, jakými jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, porucha pozornosti s hyperaktivitou (attention deficit hyperactivity disorder; ADHD), deprese, schizofrenie a zvýšená distraktibilita. Hlavním neurotransmiterem cholinergních neuronů je acetylcholin (ACh) a regulace jeho hladiny je základním přístupem farmakoterapie onemocnění spojených s centrálním cholinergním systémem. **Cílem** předložené disertační práce bylo studium změn centrální cholinergní neurotransmise s ohledem na různé aspekty modulace hladiny ACh v mozku a to prostřednictvím jeho uvolňování skrze  $M_4$  muskarinové receptory (MR), jeho hydrolýzy acetylcholinesterázou (AChE) nebo butyrylcholinesterázou (BChE) a následně po jeho hydrolýze v synapsi regulací zpětného vychytávání metabolitu cholinu pomocí vysokoafinitního cholinového transportéru (CHT). **Metodika:** Použitím telemetrie jsme sledovali pohybovou aktivitu a tělesnou teplotu u myši s vyřazeným genem pro  $M_4$  receptory ( $M_4$ KO) a kontrolních wild type ( $M_4$ WT)) myši za bazálních podmínek a po aplikaci centrálně působících látek oxotremorinu (OXO), skopolaminu (SCO) a kokainu (COC). Aktivitu AChE/BChE a expresi mRNA v odpovědi na akutní a chronický imobilizační stres jsme stanovili u myši s chybějícím kortikoliberinem (CRH KO). Pomocí *in vivo* mikroampérmetrie jsme u myši s nadměrnou expresí CHT (CHT-overexpressor; CHT-OXP) měřili schopnost CHT vychytávat cholin ze synapse a *in vivo* mikrodiálýzou jsme stanovili hladinu ACh a cholinu v kůře. U potkanů orientujících pozornost na signál (STs) nebo na cíl (GTs) jsme pomocí vysokoafinitního vychytávání cholinu (HACU) stanovili ve striatu a kůře kapacitu CHT transportovat cholin po stimulaci předního mozku (BF). **Výsledky:**  $M_4$  muskarinové receptory významně zasahují do kontroly spontánní lokomoce.  $M_4$ KO myši jsou hyperaktivní, avšak hyperaktivita je závislá na denní fázi testování a na pohlaví.  $M_4$ KO samice se rovněž liší od svých kontrol farmakologickým profilem. OXO indukovaná hypotermie byla u  $M_4$ KO samic zeslabená. SCO a COC způsobily výraznější nárůst pohybové aktivity u  $M_4$ KO samic v porovnání s WT samicemi. Imobilizační stres vede k odlišné expresi a aktivitě AChE a BChE u CRH KO a WT myši. Změny v aktivitě a expresi AChE a BChE jsou u obou genotypů specifické pro individuální oblasti mozku. Větší kapacita CHT u CHT-OXP myši vedla ke snížení maxim amplitud endogenního cholinu téměř trojnásobně ve srovnání s WT myšmi. U CHT-OXP myši vzrostla bazální hladina ACh téměř dvojnásobně a hladina cholinu 1,5 násobně v porovnání s WT. STs potkani mají sníženou kapacitu CHT pro transport cholinu do synapse v porovnání s GTs. Regulace aktivity CHT tak představuje potenciální farmakologický cíl pro efektivní ovlivňování kognitivních funkcí.

**Klíčová slova:**  $M_4$  MR,  $M_4$ KO myši, CRH KO myši, cholinový transportér, CHT-OXP myši, STs a GTs potkani

## Abstract

**Introduction:** Central cholinergic system plays a key role in control of different brain functions such as learning, memory, attention, locomotion and rewards. Disrupted integrity, regulation or capacity of cholinergic signalling is closely connected with cognitive symptoms of several neurodegenerative and neuropsychiatric diseases, as Alzheimer disease, Parkinson disease, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), depression, schizophrenia and increased distractibility. The major neurotransmitter of cholinergic neurons is acetylcholine (ACh) and regulation of ACh levels is main pharmacotherapeutic approach to the treatment of diseases associated with central cholinergic system. **The aim** of the thesis was to study the changes of central cholinergic neurotransmission with respect to various aspects of modulation of ACh levels in the brain by means of its release through M<sub>4</sub> muscarinic receptors (M<sub>4</sub> MR), its hydrolysis by acetylcholinesterase (AChE) or butyrylcholinesterase (BChE) and after its hydrolysis in the synapse, regulation of the uptake of the metabolite choline by a choline transporter (CHT). **Methods:** Here we used telemetry to measure locomotor activity and body temperature in mice with selective deletion of M<sub>4</sub> MR (M<sub>4</sub>KO) and their wild type (M<sub>4</sub>WT) controls under the basal conditions and after application of centrally acting drugs oxotremorine (OXO), scopolamine (SCO) and cocaine (COC). Activity of AChE/BChE and mRNA expression in response to acute and chronic immobilisation stress were measured in corticotropine-releasing hormone deficient mice (CRH KO). Using *in vivo* microamperometry we measured the capacity of CHT to transport choline from synapse and by *in vivo* microdialysis we determined the cortical level of ACh and choline in mice with overexpression of CHT (CHT-overexpressor; CHT-OXP). The high affinity choline uptake was used to measure the capacity of CHT to transport choline in striatum and cortex after the stimulation of basal forebrain of sign-tracking (STs) and goal-tracking (GTs) rats. **Results:** M<sub>4</sub> MR significantly modulate the control of basal locomotor activity. M<sub>4</sub>KO mice are hyperactive compare to WT control. However, the hyperactivity depends on the time of testing and on gender used in the experiment. Pharmacological profile of M<sub>4</sub>KO females differs from WT control. OXO-induced hypothermia was attenuated in M<sub>4</sub>KO females. SCO and COC-induced hyperlocomotion was more profoundly increased in M<sub>4</sub>KO females compare WT females. Immobilisation stress affected the expression and activity of AChE and BChE differently in CRH KO and WT mice. The changes in activity and mRNA expression of AChE/BChE are genotype and brain area specific. The increased capacity of CHT in CHT-OXP mice caused 3-times decrease in the maximal peak of endogenous choline compare to WT mice. CHT-OXP mice have 2-times increased basal ACh level and 1.5-times increased basal level of choline compare to WT. STs have decreased capacity of CHT to transport choline from synapse compare to GTs. Regulation of CHT activity may represent a prospective pharmacological approach in efficient modulation of cognitive functions.

**Key words:** M<sub>4</sub> MR, M<sub>4</sub>KO mice, CRH KO mice, choline transporter, CHT-OXP mice, STs and GTs rats

## Obsah

Souhrn.....	3
Abstract .....	4
Úvod .....	6
Hypotézy a cíle práce .....	7
Materiál a metodika.....	8
Experimentální zvířecí modely.....	8
Behaviorální, farmakologické a biochemické studie.....	8
Autoradiografie u M <sub>4</sub> KO a WT myší .....	9
Aktivita AChE a BChE u CRH KO myší.....	9
Exprese AChE a BChE mRNA u CRH KO a WT myší .....	9
In vivo mikroampéremetrie u CHT-OXP a WT myší.....	9
In vivo mikrodialýza u CHT-OXP a WT myší .....	9
Zpětné vychytávání cholinu v synaptozomech a immunoblotting u STs a GTs potkanů.....	9
Statistická analýza .....	10
Výsledky.....	10
M <sub>4</sub> KO samice jsou hyperaktivní v průběhu aktivní fáze dne .....	10
M <sub>4</sub> KO samice mají zvýšenou aktivitu v novém prostředí.....	11
Zesílený účinek skopolaminem a kokainem indukované hyperlokomoce u M <sub>4</sub> KO samic .....	11
Změny v expresi mRNA a aktivitě cholinesteráz u CRH KO a WT způsobené imobilizačním stresem.....	12
Posílená cholinergní kapacita a signalizace u CHT-OXP myší .....	13
Snížená cholinergní kapacita u STs potkanů.....	15
Diskuse .....	16
Úloha M <sub>4</sub> MR v řízení pohybové aktivity a tělesné teploty .....	16
Změny exprese mRNA a aktivita cholinesteráz u CRH KO a WT způsobená imobilizačním stresem .....	18
Zvýšená cholinergní kapacita u CHT-OXP myší in vivo.....	20
Snížená cholinergní kapacita u STs.....	22
Závěr .....	23
Literatura .....	24
Seznam publikací .....	28

## Úvod

Acetylcholin je hlavním neurotransmiterem cholinergních neuronů. Na rozdíl od nervosvalové ploténky, kde je ACh rychle působícím neurotransmiterem, v mozku plní ACh spíše roli neuromodulátoru a to změnami neuronální excitability, ovlivňuje synaptický přenos, indukuje synaptickou plasticitu a také nese koordinační funkci při šíření vzruchu skupinami neuronů (Picciotto et al., 2012).

Acetylcholin je zapojen v řízení nejdůležitějších funkcí nezbytných pro existenci organismu, jako kupříkladu proliferace buněk, diferenciací, migrace a zachování homeostázy. Na centrální úrovni je acetylcholin odpovědný za řízení kognitivních funkcí, motorické koordinace, termoregulace a společně s dopaminergním systémem hraje roli rovněž při kontrole závislosti (Apicella, 2007; Gordon and Heath, 1986; Pepeu and Giovannini, 2010; Pisani et al., 2001; Robinson et al., 2011).

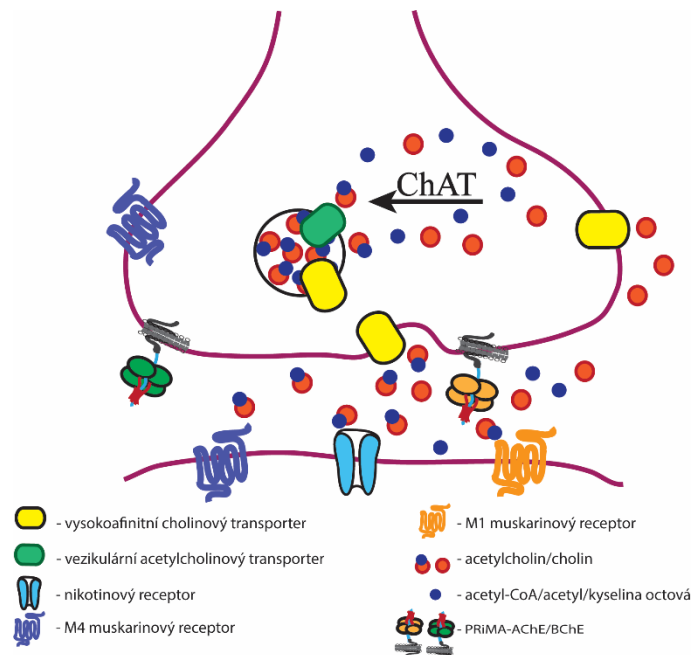
V předložené dizertační práci se zabýváme několika aspekty modulace hladiny acetylcholinu v mozku, které souvisí s regulací jeho uvolňování do synapse prostřednictvím  $M_4$  MR, následnou hydrolýzou cholinesterázami na metabolity cholin a kyseliny octovou a vychytáváním cholinu zpět do buňky pomocí CHT, kde je ACh syntetizován *de-novo*. Každá z těchto úrovní regulace ACh představuje významný farmakoterapeutický cíl při onemocnění spojených s centrálním cholinergním systémem.

Účinek ACh je zprostředkován dvěma typy cholinergních receptorů, nikotinovými (NR) a muskarinovými (MR) acetylcholinovými receptory. Proto není nikterak překvapivé, že v současnosti jsou muskarinové receptory středem pozornosti při výzkumu nových potenciálních molekul v terapii neurologických a neurodegenerativních onemocnění. MR jsou zapojeny do řízení kognitivních funkcí, jakými jsou učení a paměť, a aktivace těchto receptorů, především podtypu  $M_1$  MR má prokognitivní účinek (Wess et al., 2007; van der Zee and Luiten, 1999). V  $M_1$  MR je tudíž shledáván atraktivní cíl v terapii Alzheimerovy choroby, zejména v souvislosti se ztrátou paměti. Další centrální MR, ke kterým jsou upínány naděje v terapii jak kognitivních, tak i pozitivních a negativních symptomů schizofrenie, jsou  $M_4$  MR (Scarr and Dean, 2008).  $M_4$  MR byla v souvislosti se schizofrenií přisouzena důležitá role v regulaci dopaminergní neurotransmise (Raedler et al., 2007). Důležitá funkce  $M_1$  a  $M_4$  MR při kontrole kognitivních funkcí je podpořena rovněž klinickými studiemi, ve kterých  $M_1/M_4$ -agonista xanomelin (Jakubík et al., 2008) prokázal zlepšení behaviorálního a kognitivního deficitu jak u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Bodick et al., 1997a, 1997b), tak i u pacientů trpících schizofrenií (Shekhar et al., 2008).

Regulace hladiny ACh skrze  $M_4$  MR, mimo dříve uvedených funkcí, sehrává důležitou úlohu v kontrole bazální pohybové aktivity a při inhibiční kontrole pohybové aktivity zprostředkované aktivací  $D_1$  dopaminových receptorů (Gomez et al., 1999a).  $M_4$  MR kontrolují bazální eflux ACh v hipokampe (Tzavara et al., 2003). Jsou taktéž hlavními inhibičními autoreceptory v středním mozku, kde řídí zpětnou kontrolu uvolňování ACh (Tzavara et al., 2004). Při absenci  $M_4$  MR dochází jednak k posílení uvolňování DA ve striatu prostřednictvím zvýšení efluxu ACh v středním mozku a taktéž k posílení uvolňování DA z GABA-ergních projekčních neuronů v středním mozku.

Po uvolnění do synapse je ACh efektivně hydrolyzován enzymem AChE na metabolity cholin a kyselinu octovou. Přítomnost BChE v mozku taktéž naznačuje její úlohu při hydrolyze ACh zejména za patologických stavů jako je kupříkladu Alzheimerova nemoc (Giacobini, 2003). Cholinesterázy v mozku jsou zodpovědné za kontrolu hladiny ACh a umožňují jeho difuzi také mimo synapsi.

Důležitým krokem v modulaci syntézy, ale také následného uvolňování ACh je zpětné vychytávání cholinu do cholinergných neuronů pomocí CHT, kde je cholin použitý na syntézu ACh *de novo*. Množství CHT dostupného pro transport cholinu do neuronů je klíčovým presynaptickým faktorem cholinergní neuromodulace (Sarter et al., 2016a) a genetické rozdíly v množství CHT ovlivňují kognitivní schopnosti (Berry et al., 2014) a rovnováhu mezi „bottom-up“ vs. „top-down“ kontrolou pozornosti (Parikh et al., 2013).



**Obrázek 1:** Schematická ilustrace životního cyklu acetylcholinu v CNS: modulace syntézy, transportu, uvolňování ACh a zpětného vychytávání jeho metabolitu cholinu

### Hypotézy a cíle práce

Na základě dříve publikovaných studií s M<sub>4</sub>KO myši a jejich protichůdnými výsledky pozorovanými především na změnách v pohybové aktivitě předpokládáme, že M<sub>4</sub>KO myši mají změněnou pohybovou aktivitu v porovnání s WT myši, tato změna je však viditelná pouze během určité fáze cirkadiálního cyklu myši. Ve změnách pohybové aktivity existují rozdíly mezi samci a samicemi. Následkem chybní M<sub>4</sub> podtypu MR dochází ke kompenzačním změnám rovněž u jiných receptorových systémů.

Jak akutní, tak i chronický stres mají schopnost modulovat cholinergní signalizaci hlavně prostřednictvím zvýšení hladiny glukokortikoidů.

CHT-OXP myši v důsledku nejen zvýšeného množství CHT, ale i prokázané zvýšené aktivity HACU mají zesílené uvolňování ACh v porovnání s WT myši a posílenou cholinergní signalizaci.

STs potkani mají sníženou kapacitu CHT transportovat cholin do synapse za zvýšených nároků na cholinergní signalizaci. Toto snížení kapacity CHT je způsobeno sníženou distribucí CHT do plazmatické membrány.

Cílem předložené práce je pomocí behaviorálních, biochemických a farmakologických metod prozkoumat vliv chybění M<sub>4</sub> MR u M<sub>4</sub>KO myši, vliv imobilizačního stresu u CRH KO myši, nadměrnou expresi CHT u CHT-OXP myši a kapacitu CHT transportovat cholin u STs a GTs potkanů.

## **Materiál a metodika**

### ***Experimentální zvířecí modely***

Experimenty byly uskutečněny na třech různých genetických modelech myši: M<sub>4</sub>KO, CRH KO, CHT-OXP a jejich WT sourozencích a na Sprague-Dawley potkanech. Myši byly v době experimentů staré 3-6 měsíců. M<sub>4</sub>KO a CHT-OXP myši byly udržovány na C57BL/6 genetickém pozadí. CRH KO myši byly získány pářením homozygotních CRH KO myši. Genotyp myši byl potvrzen PCR metodou na DNA izolované ze vzorku odebraného z ocasu nebo prstu. Dospělí potkani Sprague-Dawley prošli screeningem na STs a GTs pomocí testování na Pavlovův podmíněný reflex. Zvířata (M<sub>4</sub>KO, CRH KO, CHT-OXP a jejich příslušní WT sourozenci a potkani) byla chována v prostředí s kontrolovanou teplotou (22 ± 1 °C) a vlhkostí (23°C, 45%) a udržována při kontrolovaných světelných podmínkách s dvanáctihodinovým intervalem pro světlo a tmu. Jídlo a voda byly dostupné *ad libitum*.

### ***Behaviorální, farmakologické a biochemické studie***

U M<sub>4</sub>KO myši a jejich WT sourozenců se jednalo o monitorování cirkadiánní pohybové aktivity a tělesné teploty pomocí telemetrického systému v průběhu tří po sobě následujících dní s počátkem vždy v osmém dni od operace s následným testováním v otevřeném poli v jedenáctém dni. Po tomto testu následovala nejméně 48 hodinová přestávka, po které byly myši podrobeny farmakologickým testům se skopolaminem (5 mg/kg), kokainem (20 mg/kg) anebo s oxotremorinem (0.2 mg/kg) v 9:00 ráno nebo v 21:00 večer. Myši obou genotypů, u nichž byla testovaná pouze pohybová aktivita, byly použity na radioligandové vazebné studie.

CRH KO myši a jejich WT sourozenci byli podrobeni akutnímu (30 min nebo 120 min) či chronickému (7×120 min) imobilizačnímu stresu, přičemž byly na vzorcích mozku stanoveny jak aktivita, tak exprese mRNA AChE, BChE.

U CHT-OXP myši a jejich WT sourozenců byla měřena extracelulární hladina ACh a cholinu v mPFC pomocí *in vivo* mikrodialýzy a kapacita CHT vychytávat endogenní či exogenní cholin za pomoci *in vivo* mikroampérometrie.

U Sprague-Dawley potkanů se jednalo v případě behaviorálních testů o Pavlovův podmíněný reflex (PPR), screening a rozdělení potkanů na skupiny STs a GTs. U vybraných potkanů byla provedena elektrická stimulace BF a na vzorcích mozku bylo stanoveno zpětné vychytávání cholinu cholinovým transportérem a subcelulární frakcionace s následným immunoblottingem.



### ***Autoradiografie u M<sub>4</sub>KO a WT myši***

Autoradiografie sestávala ze tří hlavních kroků, a to z preinkubace, která sloužila k odstranění endogenních ligandů, z inkubace sagitálních řezů mozku v inkubačním roztoku obsahujícím příslušný radioligand (MR - [<sup>3</sup>H]-QNB; D<sub>1</sub>-like dopaminové receptory - [<sup>3</sup>H]-SCH23390; D<sub>2</sub>-like dopaminové receptory - [<sup>3</sup>H]-spiperon; kainátové receptory - [<sup>3</sup>H]-kainát; NMDA receptory - [<sup>3</sup>H]-CGP-39653; GABA<sub>A</sub> receptory - [<sup>3</sup>H]-muscimol) a z promytí řezů od nenávaného radioligandu. Nespecifická vazba byla stanovena v přítomnosti vysoké koncentrace nezačteného ligandu. Denzitometrická analýza byla provedena pomocí analytického softwaru MCID. Měření byla stanovena z průměru alespoň tří řezů získaných z jednoho zvířete pro každou oblast mozku.

### ***Aktivita AChE a BChE u CRH KO myši***

Aktivita ChE byla stanovena pomocí Ellmanovy kolorimetrické metody upravené pro 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Abychom vzájemně mezi sebou odlišili AChE a BChE, použili jsme selektivní inhibitory pro AChE a BChE.

### ***Exprese AChE a BChE mRNA u CRH KO a WT myši***

RNA byla izolována pomocí RNABee. PCR pro specifické receptory byla realizována použitím primerů pro AChE<sub>T</sub>, AChE<sub>R</sub>, BChE a GAPDH. Jako kontrola byla použita GAPDH. Intenzita jednotlivých produktů PCR byla stanovena pomocí PCBase softwaru.

### ***In vivo mikroampéremetrie u CHT-OXP a WT myši***

Keramické mikroelektrody byly potaženy cholinoxidázou (ChOx), která byla vázána na směs BSA-glutaraldehyd. Mikroelektroda byla implantována do oblasti mPFC, kde sloužila k měření cholinových signálů generovaných aplikací  $\alpha 4\beta 2^*n$ AChR agonisty ABT-894 nebo aplikací exogenního cholinu za přítomnosti nebo absence blokátorů cholinového transportéru HC-3 a/nebo ML-352.

### ***In vivo mikrodialýza u CHT-OXP a WT myši***

Mikrodialyzační sonda s membránou o délce 1,5 mm byla v den experimentu vložena do mPFC. Sondy byly perfundovány při průtoku 1,0  $\mu$ l/min s umělým mozkomíšním mokem obsahujícím přísávek neostigminu (10  $\mu$ mol/l). Myši se mohly po celou dobu trvání experimentu volně pohybovat prostorem testovací klece. Po stabilizaci hladiny ACh, jsme odebrali do zkumavek pět čtyřminutových dialyzátů, ze kterých byla stanovena bazální hodnota extracelulární hladiny ACh a cholinu. Koncentrace ACh a cholinu byla následně stanovena HPLC hmotnostní spektrometrií. Za účelem stanovení skutečné hodnoty bazálního ACh a cholinu byly absolutní hodnoty ACh/cholinu upraveny podle „recovery rate“ mikrodialyzační sondy (9,5-14,3%).

### ***Zpětné vychytávání cholinu v synaptozomech a immunoblotting u STs a GTs potkanů***

Míru zpětného vychytávání [<sup>3</sup>H]-cholinu jsme stanovili pomocí vysokoafinitního zpětného vychytávání cholinu (HACU) v synaptozomech připravených z kůry nebo striata. Subcelulární frakcionace sloužila k izolaci frakcí plazmatické membrány (LP1) a vezikulární membrány (LP2). Následně bylo ekvivalentní množství (25  $\mu$ g) proteinu z každé frakce použito k immunoblottingu a každý vzorek byl stanoven v duplikátu.

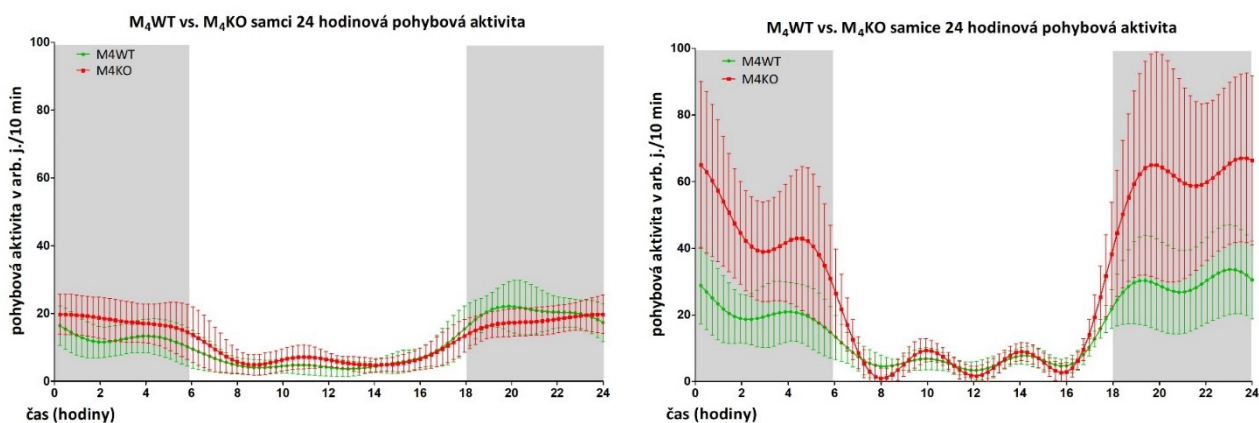
## Statistická analýza

U  $M_4$ KO myši byla statistická významnost mezi skupinami vypočtena pomocí Studentova t-testu. Statistická významnost u CRH KO a WT myši byla stanovena s one-way ANOVA s post hoc SNK testem. Schopnost vycytávat exogenní cholin u CHT-OXP a WT myši a bazální hladina ACh a cholinu byla porovnána pomocí Studentova t-testu. Naměřené hodnoty cholinových amplitud evokovaných pomocí ABT-894 byly analyzovány použitím two-way ANOVA testu. Naměřené hodnoty transportu cholinu pomocí CHT u STs a GTs potkanů ( $V_{max}$  a  $K_m$ ) a koncentrace CHT v subcelulárních frakcích (LP1, LP2) byly analyzovány použitím two-way ANOVA, kde faktory byly skupina potkanů (STs a GTs) a stimulační BF (BF-sham nebo BF-ES). Za signifikantní byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ .

## Výsledky

### $M_4$ KO samice jsou hyperaktivní v průběhu aktivní fáze dne

Analýza biorytmů u  $M_4$ KO a WT samic/samců ukázala výrazné zvýšení pohybové aktivity u  $M_4$ KO genotypu, přičemž tato změna byla zaznamenatelná pouze u samic v průběhu aktivní fáze dne.

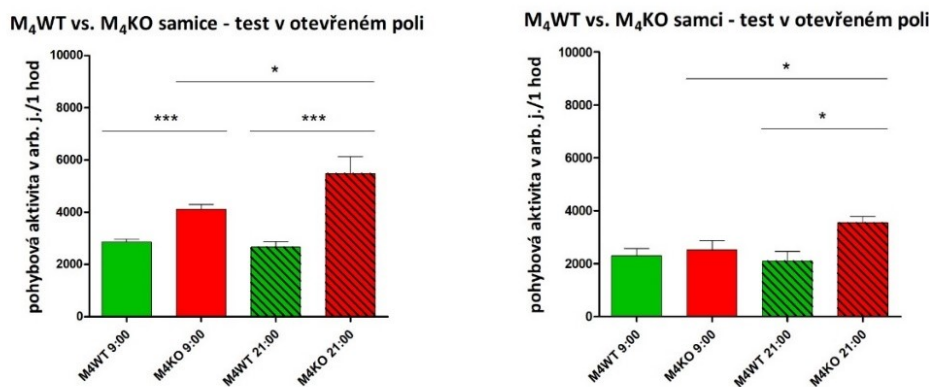


**Obrázek 2:** Cirkadiánní rytmus pohybové aktivity  $M_4$ WT a  $M_4$ KO samců (vlevo) a samic (vpravo).

Pohybová aktivita je vyjádřena jako průměr $\pm$ SD. Pohybová aktivita v arbitrárních jednotkách byla měřena pomocí telemetrie během tří po sobě jdoucích dní v jednodominutových intervalech. Vynesené jsou 14,4 min průměry pohybové aktivity ( $M_4$ WT samci:  $n=15$ ;  $M_4$ KO samci:  $n=15$ ;  $M_4$ WT samice:  $n=17$ ;  $M_4$ KO samice:  $n=13$ ) za 3 dny, zpracované programem ChronosFit s následným převodem do GraphPad Prism5. Šedou barvou je zvýrazněna tmavá fáze 24 hodinového intervalu.

### *M<sub>4</sub>KO samice mají zvýšenou aktivitu v novém prostředí*

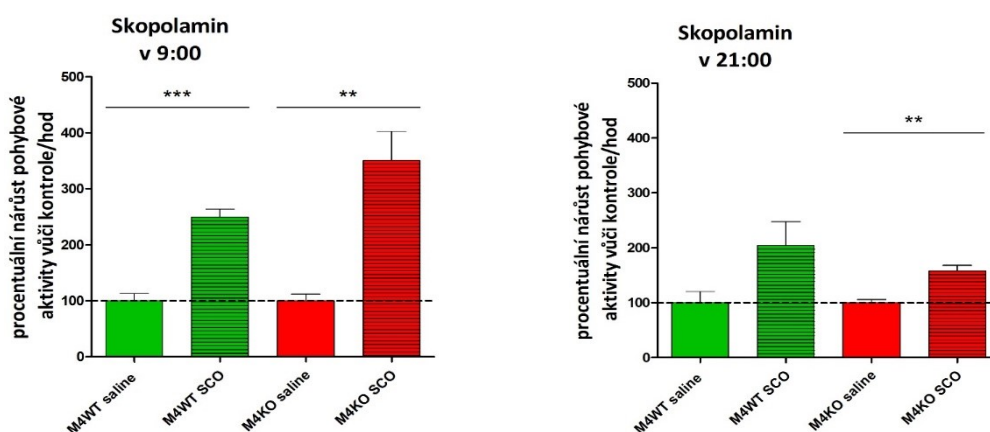
M<sub>4</sub>KO a M<sub>4</sub>WT samce a samice jsme otestovali v otevřeném poli ve světlé (inaktivní) a tmavé (aktivní) fázi dne. M<sub>4</sub>KO samice byly aktivnější v obou fázích dne v porovnání s WT myšmi, přičemž tento efekt byl výraznější v noční/aktivní fázi. M<sub>4</sub>KO samci měli signifikantně zvýšenou pohybovou aktivitu pouze v průběhu tmavé fáze ve srovnání s M<sub>4</sub>WT samci (Obr.3).



**Obrázek 3:** Pohybová aktivita M<sub>4</sub>KO a M<sub>4</sub>WT myši během testu v otevřeném poli trvajícím 60 minut.

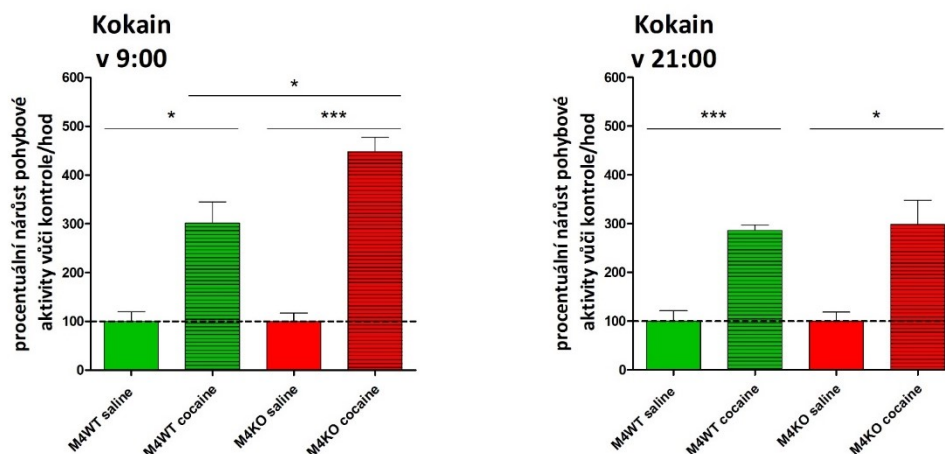
### *Zesílený účinek skopolaminem a kokainem indukované hyperlokomoce u M<sub>4</sub>KO samic*

Aplikace SCO (5 mg/kg s. c.) během inaktivní fáze dne zvýšila pohybovou aktivitu o 149,33% u M<sub>4</sub>WT a o 250,64% u M<sub>4</sub>KO samic ve srovnání s kontrolní aplikací fyziologického roztoku (Obr. 4). V průběhu aktivní fáze se SCO zasadil o statisticky významné zvýšení pohybové aktivity pouze ve skupině M<sub>4</sub>KO samic, a to o 57,5%.



**Obrázek 4:** Pohybová aktivita M<sub>4</sub>KO a WT samic po aplikaci skopolaminu (5 mg/kg s. c.) měřeno během 60 minut od aplikace.

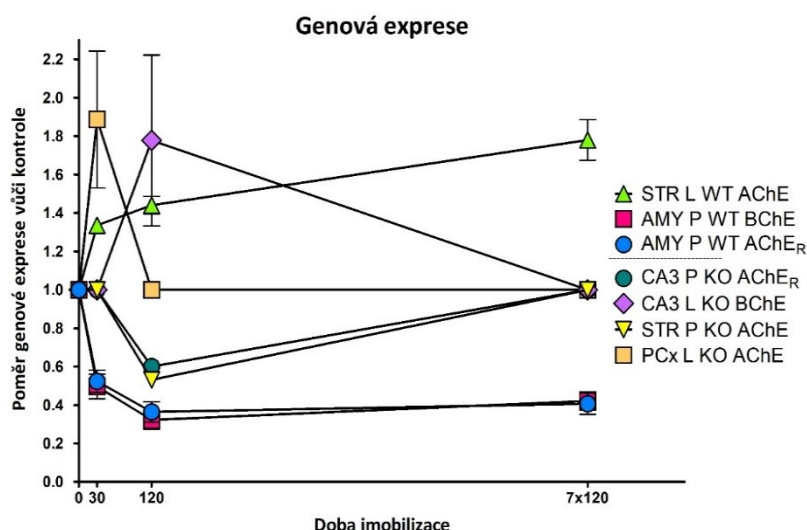
Během inaktivní fáze dne byla kokainem (20 mg/kg s. c.) indukovaná lokomoce mezi genotypy signifikantně rozdílná (o 145,9% vyšší účinek kokainu u M<sub>4</sub>KO samic ve srovnání s M<sub>4</sub>WT). Kokain během aktivní fáze dne zvýšil pohybovou aktivitu u M<sub>4</sub>WT o 186,0% a u M<sub>4</sub>KO samic o 197,9%, bez signifikantních rozdílů mezi genotypy (Obr. 5).



**Obrázek 5:** Pohybová aktivita M<sub>4</sub>KO a M<sub>4</sub>WT samic po aplikaci kokainu (20 mg/kg s. c.), měřeno během 60 minut od aplikace.

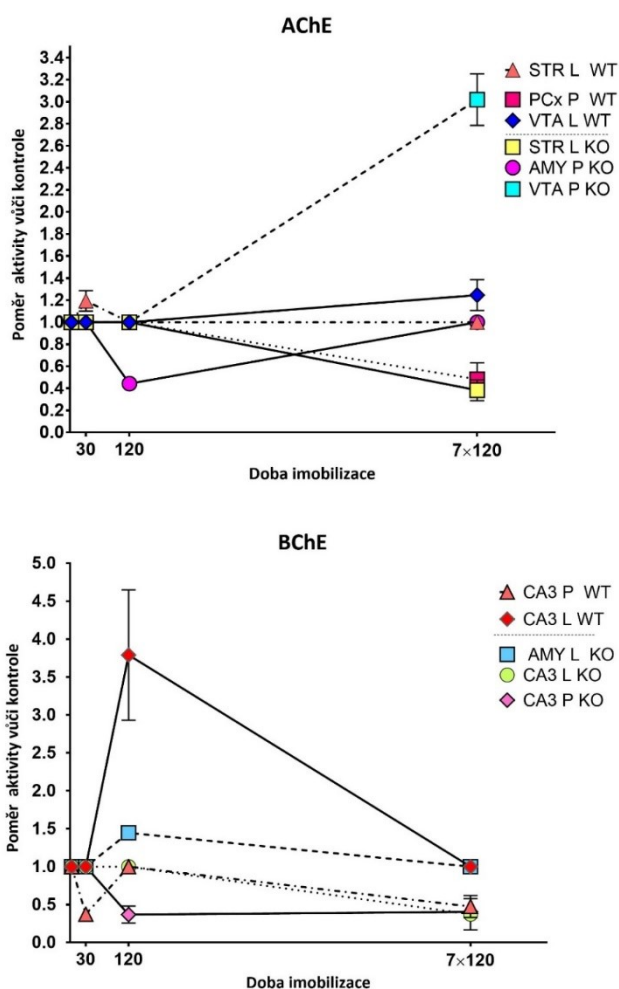
### Změny v expresi mRNA a aktivitě cholinesteráz u CRH KO a WT způsobené imobilizačním stresem

Imobilizační stres vedl k odlišné expresi a aktivitě AChE a BChE u CRH KO a WT myši. Změny v aktivitě a expresi mRNA AChE a BChE byly u obou genotypů specifické pro individuální oblasti mozku a závisely také na délce trvání imobilizace (Obr. 6 a 7).



**Obrázek 6:** Změny v expresi AChE/BChE mRNA po stresu u WT a CRH KO myši vyjádřené jako poměr vůči nestresovaným kontrolám. Graf trvání imobilizace (30 min, 120 min nebo 7×120 min) a poměr exprese AChE/BChE mRNA vůči kontrole. Kontrolní zvířata (intaktní, doba=0) nebyla imobilizována. V případě změn

v expresi je ukázán vzestup/sestup, pokud nedocházelo ke změnám v expresi, poměr byl 1,0. Zobrazená data jsou vyjádřena jako průměr±SEM (n=4). Viz legendu pro vysvětlení symbolů. STR, striatum; AMY, amygdala; CA3, hipokampální CA3 oblast; PCx, parietální kůra; P, pravá hemisféra; L, levá hemisféra.

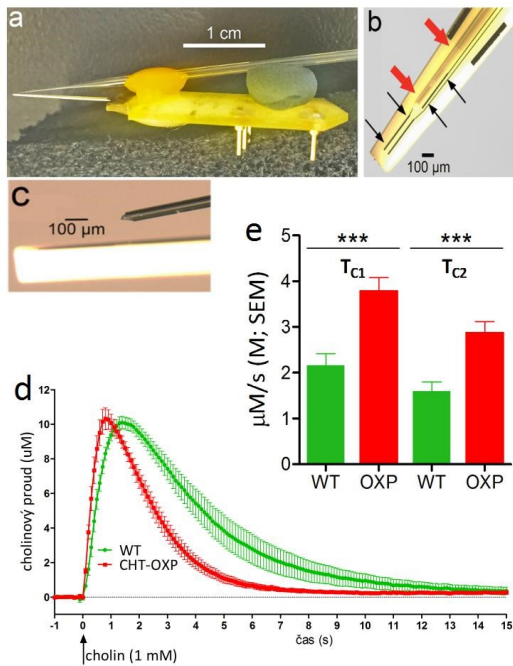


**Obrázek 7:** Změny v aktivitě AChE a BChE u WT a CRH KO myši vyjádřené jako poměr vůči kontrolám nevystaveným stresu.

Graf trvání imobilizace (30 min, 120 min nebo 7×120 min), a poměr aktivity AChE (nahore) nebo BChE (dole) vůči kontrole. Kontrolní zvířata (intaktní, doba = 0) nebyla imobilizována. V případě změn v expresi je ukázán vzestup/sestup, pokud nedocházelo ke změnám v aktivitě, poměr činil 1,0. Zobrazená data jsou vyjádřena jako průměr±SEM (n=4). Viz legendu pro vysvětlení symbolů. STR, striatum; AMY, amygdala; CA3, hipokampální oblast CA3; VTA, tegmentum ventrale; PCx, parietální kůra; P, pravá hemisféra; L, levá hemisféra.

### ***Posílená cholinergní kapacita a signalizace u CHT-OXP myši***

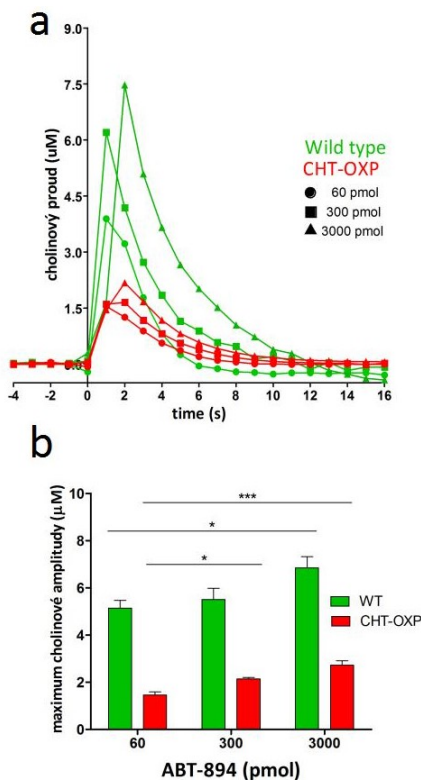
Větší množství CHT u CHT-OXP myši vedla ke snížení maxim amplitud endogenního cholinu téměř trojnásobně ve srovnání s WT myšmi (Obr.9). Míra zpětného vycytávání cholinu měřená po aplikaci exogenního cholinu byla zvýšena téměř dvojnásobně u CHT-OXP myši (Obr. 8). U CHT-OXP myši vzrostla bazální hladina ACh dvojnásobně a hladina cholinu 1,5 násobně (Obr. 10).



**Obrázek 8:** Cholinové proudy měřené v mPFC, vyvolané aplikací exogenního cholinu (1mmol/l) u WT a CHT-OMP myši.

**a:** Sestava keramické mikroelektrody s mikropipetou (boční pohled). **Vlevo:** Špička mikropipety se nachází nad čtyřmi měřicími Pt plochami. **b:** Mikrofotografie povrchu elektrody s oběma spodními Pt plochami a jednou svrchní měřicí plochou (černé šipky). Levá svrchní měřicí plocha je zamaskovaná za mikropipetou (červené šipky). **c:** Zvětšený boční pohled na sestavu elektrody s mikropipetou a umístění špičky mikropipety nad měřicí plochou elektrody. **d, e:** Míra vychytávání cholinu byla signifikantně vyšší u CHT-OMP myši pro jak dřívější ( $T_{C1}$ ), tak i pozdější ( $T_{C2}$ ) komponent poklesu cholinového signálu (WT (n=7); CHT-OMP (n=12); \*\*\*,  $p < 0,0001$ ). **d, e:** Naměřené hodnoty jsou

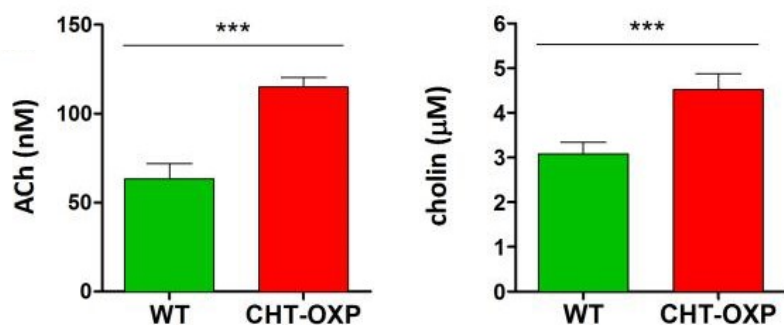
vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM. Viz legendu pro vysvětlení symbolů.



**Obrázek 9:** Endogenní cholinové proudy měřené v mPFC vyvolané aplikací  $\alpha 4\beta 2^*$  agonisty ABT-894 u WT a CHT-OMP myši.

**a:** cholinové proudy evokované aplikací ABT-894 (data zaznamenávána v 1 Hz intervalech). **b:** Maxima cholinových amplitud zůstala signifikantně menší u CHT-OMP v porovnání s WT myšmi, což odráží zvýšené vychytávání cholinu u CHT-OMP. Zobrazená data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Viz legendu pro vysvětlení symbolů.

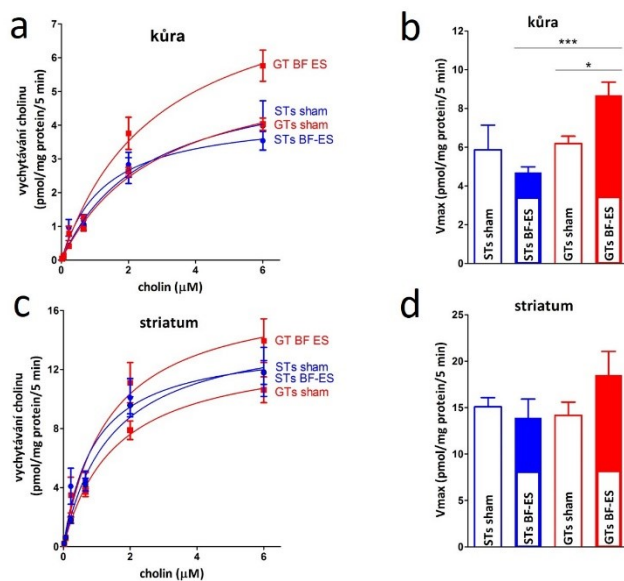




**Obrázek 10:** Extracelulární hladina ACh a cholinu měřená v prefrontální kůře u WT a CHT-OXP myši pomocí *in vivo* mikrodialýzy.

### Snížená cholinergní kapacita u STs potkanů

STs potkani mají sníženou kapacitu CHT pro transport cholinu do synapse v porovnání s GTs. U STs byl transport cholinu prostřednictvím CHT rezistentní vůči elektrické stimulaci BF. U STs stimulační BF rovněž nezpůsobila zvýšení denzity CHT v synaptické plazmatické membráně (Obr.11 a 12).

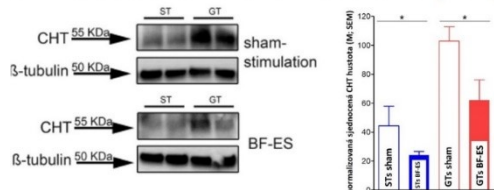


**Obrázek 11:** Účinek BF-ES *in vivo* na cholinový transport zprostředkovaný CHT (n=20; n=5 GTs a 5 STs u BF-ES; n=5 GTs a 5 STs u sham stimulace).

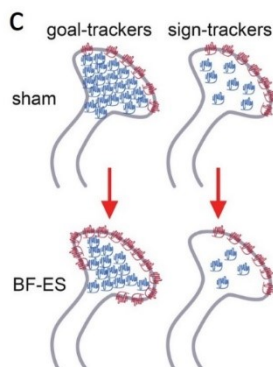
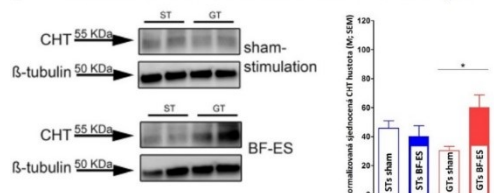
Po 20 minutách BF-ES byly odebrány vzorky tkání z kůry a striata. Následně z nich byly připraveny synaptosomy pro měření HACU. **a, c:** Saturační křivky pro vychytávání cholinu na synaptosomích z frontální kůry a striata. **b, d:** Hodnoty V<sub>max</sub> pro kortikální a striatální synaptosomy. BF-ES významně zvýšilo kapacitu CHT transportovat cholin v kůře u GTs. (b). Takový účinek ovšem nebyl pozorován u STs. Hodnoty V<sub>max</sub> ve striatu nebyly ovlivněny fenotypem ani BF-ES (d).

Hodnoty K<sub>m</sub> nebyly ovlivněny fenotypem ani BF-ES v žádné z měřených oblastí (viz Výsledky pro ANOVAs; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### a intracelulární lokalizace CHT (LP2)



### b membránová lokalizace CHT (LP1)



**Obrázek 12:** Účinek BF-ES na subcelulární distribuci CHT v synaptozomech kůry (n=19; n=5 GTs a 5 STs u BF-ES; n=4 GTs a 5 STs u sham stimulace; otisky proteinu zobrazují duplikáty u 1 ST a 1 GT).

**a:** V souladu s předchozím výzkumem, většina CHT u GTs a STs je za bazálních podmínek (sham) lokalizována na

intracelulárních doménách, jakými jsou vezikulární a endozomální membrány. BF-ES snížila densitu intracelulárně lokalizovaných CHT u obou fenotypů. Kromě toho bylo u STs pozorováno nižší množství intracelulárního CHT, než u GTs. **b:** Zatímco BF-ES zvýšila densitu CHT na plazmatické membráně u GTs, u STs k takovému nárůstu hladiny CHT nedošlo. Výsledky analýz jsou ilustrovány na obrázku. **c:** Na synaptozomech STs sham potkanů (LP1) byl poměr LP2/LP1 téměř 1 (červené symboly CHT proteinu na membráně). Výsledky z předchozích prací naznačily, že poměr LP2/LP1 rovnající se 1 představuje limit mobilizace CHT na plazmatickou membránu. Tudíž, jak se zdá, synaptozomální distribuce CHT u STs dosáhla maximum už za bazálních podmínek (sham), což je možné připsat nižší densitě intracelulárního CHT v porovnání s GTs. U STs, BF-ES vyvolaná ztráta intracelulárního CHT (LP2; modré symboly CHT proteinu) nezpůsobila jeho zvýšení na membráně, což naznačilo, že stimulací vyvolaný transport CHT z intracelulárních domén musel proběhnout na jiné úrovni, než je plazmatická membrána).

## Diskuse

### Úloha $M_4$ MR v řízení pohybové aktivity a tělesné teploty

Na genetickém modelu s vyřazeným genem pro  $M_4$  podtyp MR jsme nejprve prokázali, že  $M_4$  receptory jsou schopny významným způsobem ovlivnit biorytmus pohybové aktivity, přičemž tento účinek je výraznější u samic, než u samců. Tato změna pohybového biorytmu je specifická, neboť teplotní biorytmus mezi  $M_4$ KO a WT myšmi nebyl změněn. V dalších testech s použitím  $M_4$ KO a WT samic jsme zkoumali vliv  $M_4$  MR na kontrolu pohybové aktivity v průběhu testu v otevřeném poli a farmakologické odpovědi na cholinergní a dopaminergní látky s ohledem na fázi dne, ve které testy probíhaly.

Prokázali jsme, že  $M_4$ KO samice jsou v porovnání s WT samicemi více aktivní v průběhu testu v otevřeném poli, přičemž je tento účinek výraznější, když jsou myši testovány v noci, tedy za jejich aktivní fáze dne.  $M_4$ KO samci jsou v průběhu testu v otevřeném poli více aktivní než WT samci, avšak pouze během aktivní fáze dne.  $M_4$ KO samice jsme dále podrobili sérii farmakologických testů s třemi centrálně působícími látkami.  $M_4$ KO samice jsou více rezistentní vůči oxotremorinem indukované hypotermii než WT samice, přičemž rozdíly v hypotermické odpovědi mezi aktivní a inaktivní fází dne jsou signifikantní. Skopolamin a kokain vyvolaly výraznější zvýšení pohybové aktivity v porovnání s



kontrolní aplikací fyziologického roztoku v průběhu inaktivní fáze dne u obou genotypů. M<sub>4</sub>KO samice mají zesílenou kokainem indukovanou pohybovou aktivitu v průběhu inaktivní fáze dne v porovnání s WT samicemi. Kokain není během aktivní fáze dne schopen vyvolat výraznější odpověď u M<sub>4</sub>KO v porovnání s WT samicemi. Denzita NMDA, GABA<sub>A</sub>, D<sub>1</sub>-like a D<sub>2</sub>-like dopaminových receptorů mezi M<sub>4</sub>KO a WT myšmi není změněna během dne ani v průběhu noci. Pozorovali jsme změny v denzitě kainátových receptorů, která je u M<sub>4</sub>KO myší signifikantně snížena, pokles denzity receptorů je více výrazný během noci.

V první práci s M<sub>4</sub>KO myšmi pozorovali Gomeza a kol. (Gomeza et al., 1999a, 2001) u M<sub>4</sub>KO myší hyperaktivitu a zvýšenou citlivost na stimulaci D<sub>1</sub> dopaminových receptorů. M<sub>4</sub> MR byla připsána významná role v inhibiční kontrole D<sub>1</sub> receptory zprostředkované stimulace pohybové aktivity (Gomeza et al., 1999a). Podobná data týkající se pohybové aktivity u M<sub>4</sub>KO myší byla publikována i v novější práci, ve které byly M<sub>4</sub>KO myši aktivnější a v průběhu testu v otevřeném poli překonaly delší vzdálenosti (Koshimizu et al., 2012). V rozporu s těmito výsledky je několik dalších prací, ve kterých nepozorovali rozdíly v pohybové aktivitě mezi M<sub>4</sub>KO a WT myšmi (Fink-Jensen et al., 2011; Schmidt et al., 2011; Turner et al., 2010). Takový nesoulad mezi výsledky může být následkem použití rozdílných experimentálních metod a návrhů těchto studií. Gomeza a kol. (1999) a Koshimizu a kol. (2012) udržovali M<sub>4</sub>KO myši na smíšeném 129SvEv/CF-1 resp. čistém 129SvEv genetickém pozadí. Avšak po intenzivním zpětném křížení původní linie udržované na smíšeném genetickém pozadí do inbrední C57BL/6NTac linie se M<sub>4</sub>KO myši od WT myší v pohybové aktivitě již nelišily (Fink-Jensen et al., 2011; Schmidt et al., 2011; Turner et al., 2010). V našich experimentech byly M<sub>4</sub>KO myši a jejich WT sourozenci zpětně kříženi na C57BL/6NTac genetickém pozadí do 12. generace. Na rozdíl od již zmiňovaných prací jsme ovšem pozorovali nárůst v pohybové aktivitě u M<sub>4</sub>KO myší. Tento účinek byl však statisticky významným pouze u M<sub>4</sub>KO samic a to jen v průběhu jejich aktivní fáze dne. Většina studií s výjimkou studie Gomezy a kol. (1999) byla uskutečněna výhradně na M<sub>4</sub>KO samcích. Důležitost pohlaví použitého v experimentech může být ilustrována na práci s dvojími M<sub>1</sub>/M<sub>4</sub> KO myšmi. Zatímco M<sub>1</sub>/M<sub>4</sub> KO samice měly sníženou prepulzní inhibici v porovnání s WT samicemi (Thomsen et al., 2010), u samců takový účinek pozorován nebyl.

Kromě rozdílů v křížení, použitém genetickém pozadí a pohlaví, myši byly v předešlých pracích testovány pouze v průběhu jejich inaktivní fáze dne. V naší práci jsme však pozorovali významné rozdíly mezi M<sub>4</sub>KO a WT myšmi na základě toho, ve které fázi cirkadiálního rytmu testy probíhaly (9:00 vs. 21:00). Bazální pohybová aktivita vzrostla u M<sub>4</sub>KO myší stejně jako i pohybová aktivita v novém prostředí významněji v průběhu aktivní fáze dne.

V předchozích pracích nebyly mezi M<sub>4</sub>KO a WT myšmi nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v OXO indukované hypotermii (Bymaster et al., 2001, 2003; Gomeza et al., 1999a). My jsme však pozorovali, že hypotermický účinek OXO byl statisticky významně oslaben u M<sub>4</sub>KO samic v porovnání s WT samicemi. Zatímco Gomeza a kol. (1999) i Bymaster a kol. (2003) použili k měření hypotermického účinku rektální teploměr a teplotu měřili pouze v 30 minutách od aplikace OXO, v naší

práci jsme použili přesnější a citlivější metodu pro detekci tělesné teploty, kterou jsme měřili s intraperitoneálně implantovanými E-Mitter transpondéry. Pomocí telemetrie jsme sledovali tělesnou teplotu u nerušených zvířat a v minutových intervalech. V předchozích pracích tak účinek OXO nebyl pravděpodobně detekován, protože tělesná teplota byla měřena pouze 30 minut od aplikace OXO. V předchozích pracích byl účinek OXO indukované hypotermie u M<sub>4</sub>KO a WT myši pravděpodobně maskován z důvodu použití nedostatečně citlivé a přesné metody zvolené za účelem detekce tělesné teploty a v nevhodně zvoleném čase měření od aplikace oxotremorinu.

Účinek skopolaminu na pohybovou aktivitu nebyl u M<sub>4</sub>KO myši doposud zkoumán. V předložené práci jsme M<sub>4</sub>KO a WT samice podrobili testu na skopolaminem indukovanou hyperlokomoci. Naše výsledky ukázaly, že M<sub>4</sub> podtyp MR není hlavním podtypem MR zodpovědným za řízení SCO indukované hyperlokomoce, neboť jsme u M<sub>4</sub>KO samic pozorovali výraznější zvýšení pohybové aktivity po aplikaci SCO, tento účinek ovšem nebyl statisticky významný v porovnání s WT myšmi.

Zvýšená pohybová aktivita u M<sub>4</sub>KO myši byla přisouzena změněné striatální aktivitě a dysregulovanému dopaminergnímu tonu (Gomez et al., 1999a). M<sub>4</sub>KO myši mají zvýšenou bazální hladinu dopaminu v NAc (Zhang et al., 2002a) a zároveň zvýšenou bazální hladinu ACh ve středním mozku (Tzavara et al., 2004). Hyperdopaminergie u M<sub>4</sub>KO myši byla připsána nadměrné stimulaci cholinergních receptorů ve středním mozku, které regulují dopaminergní funkci. Kromě toho byla zvýšená dopaminergní signalizace pozorována u M<sub>4</sub>KO myši jako důsledek ztráty M<sub>4</sub> MR ve striatu (Tzavara et al., 2004). Ve striatu jsou M<sub>4</sub> MR kolokalizovány spolu s D<sub>1</sub> dopaminovými receptory na GABAergních MSN. Na molekulární úrovni M<sub>4</sub> MR inhibují produkci cAMP, která je stimulována D<sub>1</sub> receptory. D<sub>1</sub>-M<sub>4</sub>KO myši mají zvýšené uvolňování DA v NAc jak za bazálních podmínek, tak i po aplikaci amfetaminu (Jeon et al., 2010). V souladu s předchozími pracemi, stimulace pohybové aktivity kokainem byla výraznější u M<sub>4</sub>KO samic. Zvýšený účinek kokainu na pohybovou aktivitu u M<sub>4</sub>KO samic byl v porovnání s WT samicemi pozorován ovšem jen v průběhu testování v inaktivní fázi dne (o 48% nárůst v porovnání s WT). Tyto výsledky tudíž naznačují, že v průběhu aktivní fáze dne nebyl kokain schopen zesílit neuronální systém zapojený v řízení pohybové aktivity tak účinně, jak tomu bylo v průběhu inaktivní fáze dne.

### ***Změny exprese mRNA a aktivita cholinesteráz u CRH KO a WT způsobená imobilizačním stresem***

U CRH KO a WT myši jsme testovali hypotézu, že akutní stres je schopen modulovat aktivitu AChE a BChE a expresi mRNA cholinesteráz v mozku, přičemž jsou tyto změny závislé na zvýšení hladiny kortikosteronu. Abychom otestovali účinek glukokortikoidů, použili jsme CRH KO myši, které se vyznačují nezměněnou bazální hladinou kortikosteronu, nejsou však schopny zvýšit hladinu kortikosteronu při odpovědi na stres. Imobilizační stres snížil expresi mRNA BChE a AChE<sub>R</sub> v pravé AMY. Expresi mRNA AChE byla zvýšena v levém striatu. Aktivita AChE byla zvýšena v levém striatu a snížena v pravé PFC po opakované imobilizaci. Aktivita BChE byla snížena po akutním

třicetiminutovém stresu v pravé hipokampální oblasti CA3, naproti tomu byla po 120 minut trvající imobilizaci zvýšená v levé oblasti CA3. Změny v aktivitě a expresi mRNA cholinesteráz vlivem stresu se lišily mezi CRH KO a WT myšmi, což potvrdilo naši hypotézu, že cholinesterázy jsou ovlivněny stresem a tento účinek je z určité části zprostředkován kortikosteronem.

V předchozích pracích byl vliv stresu na aktivitu a expresi cholinesteráz studován pouze v oblastech kůry, hipokampu a mozečku, kde byly jako stresory použity plavání, chladový stres, nebo omezení na pohybu (tzv. „restraint stress“). V předložené práci jsme uskutečnili detailnější analýzu a zaměřili jsme se rovněž na rozdíly mezi pravou a levou mozkovou hemisférou. Analyzovali jsme změny ve FCx, PCx, Nbm, VTA, STR, AMY, hipokampální oblasti CA3 a DG. Imobilizační stres vedl k oblastně specifickým změnám v aktivitě a expresi AChE a BChE, přičemž byly tyto změny závislé i na délce trvání imobilizace. Chybění glukokortikoidů u CRH KO myši v průběhu odpovědi na stres vedlo ke statisticky významným změnám v aktivitě a expresi těchto enzymů. Výsledky práce Kauferovej a kol. (Kaufer et al., 1998) a Perriera a kol. (Perrier et al., 2005) jsou odlišné. Perrier a kol. pozorovali nárůst v AChE<sub>R</sub> mRNA po „restraint stresu“ trvajícím 30 minut, nepotvrdili ovšem předchozí výsledky pozorované v práci Kauferové a Meshorera (Kaufer et al., 1998; Meshorer et al., 2002) v nárůstu exprese mRNA AChE<sub>R</sub> v kůře a hipokampu poté, co myši vystavili stresu v podobě plavání (Kaufer et al., 1998). Jak chronický chladový stres (opakovaně po dobu sedmi dní při 4°C), tak i akutní chladový stres v kombinaci s imobilizací způsobil pokles aktivity AChE v kůře, hypotalamu, adenohypofýze a nadledvinkách (Gabriel and Soliman, 1983). Ve zmiňované práci autoři dále před stanovením aktivity AChE aplikovali zvířatům kortikosteron, což vedlo k poklesu aktivity AChE v kůře, hypotalamu a nadledvinách. U zvířat po adrenalectomii nezpůsobil akutní stres změny v aktivitě AChE v kůře ani hypotalamu. Autoři této studie proto předpokládali, že kortikosteron může zprostředkovat účinek stresu na aktivitu AChE (Gabriel and Soliman, 1983). V naší práci jsme použili imobilizační stres, který je silnějším stresorem než „restraint stress“, při kterém mají myši omezený pohyb a jsou zavřeny ve stísněné komůrce či krabici (Buynitsky and Mostofsky, 2009). Změny v aktivitě a expresi mRNA cholinesteráz byly analyzovány tři hodiny po imobilizaci, kdy byly pozorovány největší změny aktivity v mozkové kůře (Kaufer et al., 1998). Na rozdíl od Kaufera a kol. jsme v naší práci nepozorovali nárůst v aktivitě AChE v kůře WT myši, ale přibližně 20% nárůst v aktivitě AChE byl pozorován v levém STR. Aktivita a exprese AChE v hipokampálních oblastech CA3 a DG byla beze změn, v CA3 oblasti jsme pozorovali změny v aktivitě BChE, která byla vlivem stresu snížena u WT (po 30 minutách a chronickém stresu) i u CRH KO myši (po 120 minutách a chronickém stresu).

Změny v expresi jednotlivých variant AChE mohou být způsobeny různými okolnostmi. V předchozích pracích byly pozorovány změny v nárůstu synaptické N-terminální AChE<sub>T</sub> varianty, která může vyústit v apoptózu buněk a ovlivnit tak neurony v mozku po akutním stresu (Toiber et al., 2009) nebo změny v AChE<sub>R</sub> variantě u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Berson et al., 2008). Kromě toho, epigenetické faktory jsou schopny ovlivnit promotéra AChE za stresových podmínek (Sailaja et al.,

2012), což podporuje hypotézu, že změny chromatinu podporují dlouhotrvající změny neuronální genové exprese a cholinergní neurotransmise v hipokampu.

Novým pozorováním v naší práci byly změny v aktivitě BChE, která byla účinkem stresu změněna v hipokampální oblasti CA3. U WT myši byla v pravé CA3 aktivita snížena po 30 minutách imobilizace, po 120 minutové imobilizaci byla beze změn a po chronické imobilizaci jsme v aktivitě BChE rovněž pozorovali pokles. Na rozdíl od pravé hemisféry nedošlo v levé CA3 vlivem 30 minutové a chronické imobilizace ke změnám v aktivitě BChE, ale po 120 minutách imobilizace jsme pozorovali nárůst aktivity. U CRH KO myši nedocházelo v pravé CA3 vlivem 30 minutového stresu ke změnám v aktivitě BChE, ale po 120 minutovém a chronickém stresu aktivita BChE v porovnání s nestresovanými CRH KO myšmi poklesla. V levé CA3 jsme pozorovali pokles aktivity BChE pouze vlivem chronického stresu. Vliv kortikosteronu na aktivitu BChE se tak zdá být selektivním pouze pro levou oblast CA3 po 120 minut trvajícím stresu, nakolik u CRH KO myši v této oblasti ke změnám v aktivitě BChE nedošlo. Naše výsledky poprvé prokázali, že kromě AChE by mohla sehrávat úlohu ve stresové odpovědi také BChE. Role kortikosteronu v kontrole aktivity BChE a rozdíly mezi pravou a levou hemisférou však musí být ještě prozkoumány.

Gen pro AChE obsahuje „glucocorticoid response element“ (GRE) asi 17 kB před iniciační oblastí transkripce (Meshorer et al., 2002). V případě BChE kódované jedním genem, která se nachází pouze ve formě varianty BChE<sub>T</sub> (Lockridge, 2015), se GRE v genu nenachází. Dále gen pro AChE kromě GRE obsahuje i „cAMP response element“ (CRE) (Choi et al., 2001). Hladina cAMP je zvýšena v důsledku aktivace adrenoreceptorů katecholaminy (adrenalinem) v průběhu prvotní fáze odpovědi na stres. Bylo prokázáno, že signalizace prostřednictvím cAMP měla vliv na expresi AChE, která byla aktivována u ptáků a potlačena u savců (Choi et al., 2001), což by mohlo představovat odpověď na otázku, proč jsme v naší práci pozorovali sníženou expresi mRNA a aktivitu AChE.

Několik prací popsalo změny v aktivitě AChE vlivem stresu (Das et al., 2000; Fatranská et al., 1989; Gabriel and Soliman, 1983; Kaufer et al., 1998; Meshorer et al., 2002; Perrier et al., 2005; Romero-Vecchione et al., 1987), výsledky jsou ovšem rozdílné. V některých pracích pozorovali pokles a v jiných nárůst v aktivitě AChE vlivem stresu. Je proto komplikované stanovit jednotný závěr, jaký vliv má stres na aktivitu a expresi ChE. Stres způsobuje změny v expresi mRNA a aktivitě ChE, tyto změny závisí na oblasti mozku a na délce působení stresu, přičemž se stejně tak významně liší mezi pravou a levou hemisférou. Kromě toho schopnost, jejíž účelem je v organismu zvýšit hladinu kortikosteronu v průběhu odpovědi na stres a která chybí u CRH KO myši, vede k rozdílným změnám mezi WT a CRH KO myšmi především v oblasti CA3.

### ***Zvýšená cholinergní kapacita u CHT-OXP myši in vivo***

U myši s nadměrnou expresí cholinového transportéru jsme *in vivo* prokázali, že jejich cholinergní synapse jsou schopny efektivněji vycytávat jak endogenní, tak i exogenní cholin v porovnání s WT myšmi. Zvýšená kapacita CHT u CHT-OXP myši navíc vedla k dvojnásobnému zvýšení bazálních hladin ACh a cholinu měřených pomocí *in vivo* mikrodialýzy v prefrontální kůře. Po

zablokování CHT dvěma různě účinkujícími blokátory/modulátory HC-3 a ML352 a následně evokovaném uvolnění ACh pomocí  $\alpha 4\beta 2^*$  agonisty ABT-894 jsme pozorovali diametrálně odlišný účinek na cholinové amplitudy u CHT-OXP a WT myši. Následným otestováním HC-3 a ML352 v přítomnosti exogenně aplikovaného cholinu jsme potvrdili, že obě látky účinkují jako antagonisté CHT u obou genotypů, což se projevilo nárůstem maxima amplitudy cholinového signálu.

V prvotní studii s CHT-OXP myšmi bylo *ex vivo* na synaptosomech připravených z kůry a striata prokázáno, že zvýšená exprese CHT vede k dvojnásobnému zvýšení kapacity vychytávání cholinu v porovnání s WT myšmi, přičemž afinita cholinu k CHT nebyla mezi genotypy změněna (Holmstrand et al., 2014). Cílem našeho prvního experimentu bylo stanovit kapacitu CHT vychytávat cholin *in vivo* u WT a CHT-OXP myši. Analýza cholinové amplitudy a z ní vypočtená míra vychytávání cholinu v dřívější  $T_{C1}$  a pozdější  $T_{C2}$  fázi ukázala, že u CHT-OXP myši byl exogenně aplikovaný cholin vychytáván dvakrát rychleji v porovnání s WT myšmi. Předchozí práce s použitím CHT HET myši, které mají sníženou kapacitu CHT za zvýšených nároků na neuronální signalizaci prokázala opačný účinek, kdy u CHT HET myši došlo ke zpomalení vychytávání exogenně aplikovaného cholinu v  $T_{C2}$  téměř trojnásobně (Parikh et al., 2013).

Abychom stanovili kapacitu CHT-OXP vychytávat endogenní cholin, vyvolali jsme uvolňování ACh tlakovou aplikací úplného agonisty  $\alpha 4\beta 2^*$  nikotinových receptorů. V přední kůře uvolňuje stimulace  $\alpha 4\beta 2^*$  nAChR ACh zejména skrze talamické glutamatergní dráhy (Parikh et al., 2008; Sarter et al., 2009; Parikh et al., 2010). Protože  $\alpha 4\beta 2^*$  nAChR-agonistou evokované uvolňování ACh vyžaduje aktivaci multisynaptických drah, je použití tohoto agonisty fyziologicky více relevantní ve srovnání s přímou depolarizací pomocí KCl. Tři testované dávky ABT-894 způsobily na dávce závislé zvýšení maxim cholinových amplitud u obou genotypů. U CHT-OXP myši ovšem došlo ke snížení maxim amplitud endogenního cholinu téměř trojnásobně ve srovnání s WT myšmi, což bylo podle všeho způsobeno větší kapacitou CHT na cholinergních synapsích a tudíž mnohem rychlejším a efektivnějším vychytáváním cholinu.

Interpretace výsledků účinku ABT-894, které naznačují zvýšené vychytávání cholinu u CHT-OXP myši, stejně jako výsledky získané z experimentů vychytávání exogenního cholinu, by byla nesprávná, pokud by důvodem nižších naměřených cholinových amplitud bylo snížené uvolňování ACh u CHT-OXP myši. Z tohoto důvodu jsme měřili bazální hladinu extracelulárního ACh a cholinu pomocí *in vivo* mikrodialýzy u volně se pohybujících CHT-OXP a WT myši. Naměřené hladiny ACh a cholinu u WT myši byly v souladu s hodnotami publikovanými v dřívějších pracích (Parikh et al., 2013). U CHT-OXP myši byly bazální hladiny kortikálního ACh a cholinu dvojnásobně zvýšeny v porovnání s WT myšmi. *In vivo* mikrodialýzou jsme tak potvrdili výsledky našich předchozích experimentů, že nadměrná exprese CHT vede k zesílení cholinergní signalizace zvýšením kapacity CHT vychytávat endogenní cholin a ke zvýšení uvolňování endogenního ACh.

Výsledky našich studií u CHT-OXP myši tak *in vivo* potvrdily důležitou roli CHT v udržování cholinergní signalizace. CHT tak představuje významný farmakologický cíl, který může zvýšením

kapacity/afinity vést k posílení cholinergní neurotransmise při onemocněních, u kterých je cholinergní signalizace snížena jako u Alzheimerovy choroby a jiných neurodegenerativních onemocnění.

### ***Snížená cholinergní kapacita u STs***

V porovnání s GTs je kapacita cholinergních neuronů udržet zvýšené hladiny cholinergní neurotransmise u STs snížena. Abychom objasnili celulární mechanismy zodpovědné za zeslabenou cholinergní kapacitu u STs, zaměřili jsme se v předložené práci na hlavní limitující faktor v syntéze ACh, tedy na cholinový transportér. U STs byl transport cholinu prostřednictvím CHT rezistentní vůči elektrické stimulaci BF. Stimulace BF rovněž nezpůsobila zvýšení denzity CHT v synaptické plazmatické membráně. Tyto výsledky tak naznačily velmi důležitá omezení v kapacitě cholinergní synapse přizpůsobit se zvýšené neuronální aktivitě u STs.

Celkové množství proteinu CHT se v synaptosomech připravených z kůry STs a GTs potkanů nelišilo. Na rozdíl od celkového proteinu, bazální hladiny CHT na membráně vezikul (LP2 frakce) byly u nestimulovaných (sham) potkanů nižší u STs, než u GTs. Většina CHT je u GTs za bazálních podmínek lokalizována na vezikulární membráně (Ferguson et al., 2003; Parikh et al., 2013), zatímco u STs významné množství intracelulárního CHT se, jak se zdá, může nalézat i v jiných subcelulárních kompartmentech, kterými jsou například endozomy a mitochondrie. Z tohoto důvodu nebyla tato část CHT detekována metodou, kterou jsme použili k přípravě LP2 frakcí. Jinou možnou příčinou, kvůli které jsme nebyli schopni detekovat větší množství intracelulárního CHT u STs může být, skutečnost, že epitop pro použitou protilátku mohl být maskován posttranslačními změnami spojenými se změnou distribucí CHT. Část CHT byla jako výsledek elektrické stimulace BF u STs přemístěna z membrány vezikul ve frakci LP2, avšak tento přesun neodrážel nárůst denzity CHT ve frakci LP1, což naznačuje, že CHT byl přemístěn do jiných intracelulárních kompartmentů, které nebyly spojeny s mobilizací CHT do plazmatické membrány. Intracelulární CHT u STs mohl být po stimulaci modifikován (např. fosforylací, nitrosylací) a tudíž učiněn nedostupným pro přemístění do plazmatické membrány (Cuddy et al., 2015; Gates et al., 2004; Ribeiro et al., 2005). Jelikož byla denzita CHT na plazmatické membráně za bazálních podmínek totožná u STs i GTs, předpokládáme, že odlišnosti v subcelulární distribuci CHT pozorované u STs a neschopnost zvýšit cholinový transport po stimulaci BF odrážejí spíše změny v distribuci nebo posttranslační modifikace, mezi které patří degradace CHT.

Rovněž není doposud jasné, jestli existuje přímé propojení mezi orientací STs na znamení v průběhu testu pozornosti a dysfunkcí CHT na jedné straně, nebo mezi motivačním procesem a němu podléhající dopaminergní odpovědi v NAc na straně druhé. Orientace pozornosti na znamení u STs může být kritickým mechanismem, který vede k prvotnímu vývoji tohoto „sign-tracking“ fenotypu. Je velice důležité zodpovědět otázku, zda subkapacita CHT přispívá rovněž k dopaminergní signalizaci v NAc evokované podnětem, který zprostředkovává přeměnu CS na motivační magnet u STs (Flagel et al., 2011). Interakce mezi aktivitou cholinergních interneuronů v NAc a dopaminergní signalizací není dodnes uspokojivě objasněna (Collins et al., 2016; Crespo et al., 2006) a z toho důvodu je náročné předpovědět, jaký dopad by měla snížená kapacita CHT na tuto interakci. Zbývá proto zodpovědět

otázku, jestli snížená kapacita CHT v NAc podporuje na znamení orientovanou dopaminergní signalizaci u STs.

„Sign-tracking” chování je komplexním psychologickým znakem spojeným s náchylností ke vzniku závislosti. Hlavním charakteristickým znakem tohoto chování je pravděpodobně poškození motivačních procesů, které mění prvotně neutrální podněty na podněty, které jsou lákavé a vyhledávané (Robinson and Berridge, 2008; Robinson and Flagel, 2009; Saunders and Robinson, 2010). Výsledky naší práce ovšem naznačují, že taková konceptualizace těchto znaků není úplně kompletní. Orientace na znamení v průběhu udržování pozornosti je buď dalším důležitým komponentem, nebo dokonce hlavním faktorem pro „sign-tracking” chování, kterého hlavním neuronálním mechanismem je pravděpodobně snížená kapacita CHT. Vzhledem k tomu, že snížená kontrola pozornosti v průběhu testů s návykovými látkami je považována za klíčové psychologické riziko pro rozvoj závislosti (Field and Cox, 2008), jak studie s hlodavci, tak i humánní studie zachytávající znaky „sign-tracking” chování mohou být velmi užitečné při vývoji nových terapií, které by byly schopny obnovit kapacitu cholinergní aktivity a schopnosti kontrolovat chování v průběhu těchto testů.

## **Závěr**

Neuromodulační účinek ACh je rozhodujícím faktorem pro normální fungování různých mozkových funkcí. Je známo, že abnormality cholinergního systému přispívají k množství psychiatrických a neurologických onemocnění. Regulace hladiny ACh na úrovni jeho uvolňování prostřednictvím M<sub>4</sub> muskarinových receptorů, hydrolýzy cholinesterázami, vychytávání cholinovým transportérem a opětovné syntézy tak představuje významný farmakoterapeutický cíl.

V předložené dizertační práci jsme prokázali, že M<sub>4</sub> MR jsou zapojeny v kontrole pohybové aktivity, přičemž tento účinek závisí na pohlaví a aktivní resp. inaktivní fázi dne. M<sub>4</sub>KO samice byly za bazálních podmínek hyperaktivní jenom v průběhu aktivní fázi dne. Vyřazení genu pro podtyp M<sub>4</sub> muskarinových receptorů má u M<sub>4</sub>KO samic za následek zvýšení rezistence vůči oxotremorinem indukované hypotermii a zesílenou hyperlokomoční odpověď na skopolamin a kokain. Účinek těchto látek se liší podle toho, v které fázi dne testy probíhají a je výraznější během inaktivní fáze. V průběhu behaviorálních a farmakologických studií je proto velice důležité, aby se bralo v úvahu i to, v které fázi dne testy probíhají, protože myši sú aktivní během tmavé fázi dne.

Aktivita a exprese cholinesteráz (AChE a BChE) v mozku je ovlivněna stresem a modulována glukokortikoidy. U CRH-KO myši dochází vlivem akutního a chronického imobilizačního stresu ke změnám v expresi a aktivitě AChE a BChE na různých úrovních a závisí na lateralitě.

U CHT-OXP myši jsme *in vivo* prokázali jejich zvýšenou schopnost vychytávat exogenní a endogenní cholin. Navíc jsme pomocí *in vivo* mikrodialýzy potvrdili naši hypotézu, že zvýšení exprese CHT má za následek zvýšení bazální hladiny ACh a tudíž vede k posílení cholinergní signalizace.

STs potkani mají v porovnání s GTs potkany sníženou kapacitu cholinergních neuronů udržet zvýšenou hladinu neurotransmíse při zvýšených nárocích na cholinergní systém. U STs je CHT

zprostředkovaný transport cholinu rezistentní vůči stimulaci BF. V souladu s tímto výsledkem nevede stimulace BF ke zvýšení denzity CHT v synaptické plazmatické membráně u STs.

## Literatura

Apicella, P. (2007). Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition. *Trends Neurosci.* *30*, 299–306.

Berry, A.S., Demeter, E., Sabhapathy, S., English, B.A., Blakely, R.D., Sarter, M., and Lustig, C. (2014). Disposed to distraction: genetic variation in the cholinergic system influences distractibility but not time-on-task effects. *J. Cogn. Neurosci.* *26*, 1981–1991.

Berson, A., Knobloch, M., Hanan, M., Diamant, S., Sharoni, M., Schuppli, D., Geyer, B.C., Ravid, R., Mor, T.S., Nitsch, R.M., et al. (2008). Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain J. Neurol.* *131*, 109–119.

Bodick, N.C., Offen, W.W., Levey, A.I., Cutler, N.R., Gauthier, S.G., Satlin, A., Shannon, H.E., Tollefson, G.D., Rasmussen, K., Bymaster, F.P., et al. (1997a). Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *54*, 465–473.

Bodick, N.C., Offen, W.W., Shannon, H.E., Satterwhite, J., Lucas, R., van Lier, R., and Paul, S.M. (1997b). The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *11 Suppl 4*, S16–22.

Buynitsky, T., and Mostofsky, D.I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *33*, 1089–1098.

Bymaster, F.P., Carter, P.A., Zhang, L., Falcone, J.F., Stengel, P.W., Cohen, M.L., Shannon, H.E., Gomeza, J., Wess, J., and Felder, C.C. (2001). Investigations into the physiological role of muscarinic M2 and M4 muscarinic and M4 receptor subtypes using receptor knockout mice. *Life Sci.* *68*, 2473–2479.

Bymaster, F.P., Carter, P.A., Yamada, M., Gomeza, J., Wess, J., Hamilton, S.E., Nathanson, N.M., McKinzie, D.L., and Felder, C.C. (2003). Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 1403–1410.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., and Bernardi, G. (2000). Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci.* *23*, 120–126.

Choi, R.C., Siow, N.L., Zhu, S.Q., Wan, D.C., Wong, Y.H., and Tsim, K.W. (2001). The cyclic AMP-mediated expression of acetylcholinesterase in myotubes shows contrasting activation and repression between avian and mammalian enzymes. *Mol. Cell. Neurosci.* *17*, 732–745.

Collins, A.L., Aitken, T.J., Greenfield, V.Y., Ostlund, S.B., and Wassum, K.M. (2016). Nucleus Accumbens Acetylcholine Receptors Modulate Dopamine and Motivation. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *41*, 2830–2838.

Crespo, J.A., Sturm, K., Saria, A., and Zernig, G. (2006). Activation of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens core is necessary for the acquisition of drug reinforcement. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 6004–6010.

Cuddy, L.K., Seah, C., Pasternak, S.H., and Rylett, R.J. (2015). Differential regulation of the high-affinity choline transporter by wild-type and Swedish mutant amyloid precursor protein. *J. Neurochem.*



- Das, A., Kapoor, K., Sayeepriyadarshini, A.T., Dikshit, M., Palit, G., and Nath, C. (2000). Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. *Pharmacol. Res.* *42*, 213–217.
- Fatranská, M., Budai, D., Gulya, K., and Kvetnanský, R. (1989). Changes in acetylcholine content, release and muscarinic receptors in rat hippocampus under cold stress. *Life Sci.* *45*, 143–149.
- Ferguson, S.M., Savchenko, V., Apparsundaram, S., Zwick, M., Wright, J., Heilman, C.J., Yi, H., Levey, A.I., and Blakely, R.D. (2003). Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9697–9709.
- Field, M., and Cox, W.M. (2008). Attentional bias in addictive behaviors: a review of its development, causes, and consequences. *Drug Alcohol Depend.* *97*, 1–20.
- Fink-Jensen, A., Schmidt, L.S., Dencker, D., Schüle, C., Wess, J., Wörtwein, G., and Woldbye, D.P.D. (2011). Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *656*, 39–44.
- Flagel, S.B., Clark, J.J., Robinson, T.E., Mayo, L., Czuj, A., Willuhn, I., Akers, C.A., Clinton, S.M., Phillips, P.E.M., and Akil, H. (2011). A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature* *469*, 53–57.
- Gabriel, N.N., and Soliman, K.F. (1983). Effect of stress on the acetylcholinesterase activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the rat. *Horm. Res.* *17*, 43–48.
- Gates, J., Ferguson, S.M., Blakely, R.D., and Apparsundaram, S. (2004). Regulation of choline transporter surface expression and phosphorylation by protein kinase C and protein phosphatase 1/2A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *310*, 536–545.
- Gerber, D.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Huang, S.Y., Caron, M.G., and Tonegawa, S. (2001). Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 15312–15317.
- Gomez, J., Zhang, L., Kostenis, E., Felder, C., Bymaster, F., Brodtkin, J., Shannon, H., Xia, B., Deng, C., and Wess, J. (1999). Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 10483–10488.
- Gomez, J., Zhang, L., Kostenis, E., Felder, C.C., Bymaster, F.P., Brodtkin, J., Shannon, H., Xia, B., Duttaroy, A., Deng, C.X., et al. (2001). Generation and pharmacological analysis of M2 and M4 muscarinic receptor knockout mice. *Life Sci.* *68*, 2457–2466.
- Gordon, C.J., and Heath, J.E. (1986). Integration and central processing in temperature regulation. *Annu. Rev. Physiol.* *48*, 595–612.
- Himmelheber, A.M., Sarter, M., and Bruno, J.P. (2000). Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* *9*, 313–325.
- Holmstrand, E.C., Lund, D., Cherian, A.K., Wright, J., Martin, R.F., Ennis, E.A., Stanwood, G.D., Sarter, M., and Blakely, R.D. (2014). Transgenic overexpression of the presynaptic choline transporter elevates acetylcholine levels and augments motor endurance. *Neurochem. Int.* *73*, 217–228.
- Jeon, J., Dencker, D., Wörtwein, G., Woldbye, D.P.D., Cui, Y., Davis, A.A., Levey, A.I., Schütz, G., Sager, T.N., Mørk, A., et al. (2010). A subpopulation of neuronal M4 muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 2396–2405.

- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., and Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393, 373–377.
- Koshimizu, H., Leiter, L.M., and Miyakawa, T. (2012). M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. *Mol. Brain* 5, 10.
- Kozak, R., Bruno, J.P., and Sarter, M. (2006). Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 16, 9–17.
- Levey, A.I. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13541–13546.
- Lockridge, O. (2015). Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.* 148, 34–46.
- Meshorer, E., Erb, C., Gazit, R., Pavlovsky, L., Kaufer, D., Friedman, A., Glick, D., Ben-Arie, N., and Soreq, H. (2002). Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science* 295, 508–512.
- Paolone, G., Lee, T.M., and Sarter, M. (2012). Time to pay attention: attentional performance time-stamped prefrontal cholinergic activation, diurnality, and performance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 12115–12128.
- Parikh, V., and Sarter, M. (2006). Cortical choline transporter function measured in vivo using choline-sensitive microelectrodes: clearance of endogenous and exogenous choline and effects of removal of cholinergic terminals. *J. Neurochem.* 97, 488–503.
- Parikh, V., Kozak, R., Martinez, V., and Sarter, M. (2007). Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. *Neuron* 56, 141–154.
- Parikh, V., St Peters, M., Blakely, R.D., and Sarter, M. (2013). The presynaptic choline transporter imposes limits on sustained cortical acetylcholine release and attention. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2326–2337.
- Passetti, F., Dalley, J.W., O’Connell, M.T., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2000). Increased acetylcholine release in the rat medial prefrontal cortex during performance of a visual attentional task. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3051–3058.
- Pepeu, G., and Giovannini, M.G. (2010). Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem. Biol. Interact.* 187, 403–408.
- Perrier, N.A., Salani, M., Falasca, C., Bon, S., Augusti-Tocco, G., and Massoulié, J. (2005). The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J. Neurochem.* 94, 629–638.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., and Perry, R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* 22, 273–280.
- Pisani, A., Bonsi, P., Picconi, B., Tolu, M., Giacomini, P., and Scarnati, E. (2001). Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25, 211–230.
- Quirion, R., Wilson, A., Rowe, W., Aubert, I., Richard, J., Doods, H., Parent, A., White, N., and Meaney, M.J. (1995). Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M(2)-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1455–1462.

- Raedler, T.J., Bymaster, F.P., Tandon, R., Copolov, D., and Dean, B. (2007). Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 12, 232–246.
- Ribeiro, F.M., Black, S.A.G., Cregan, S.P., Prado, V.F., Prado, M.A.M., Rylett, R.J., and Ferguson, S.S.G. (2005). Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J. Neurochem.* 94, 86–96.
- Robinson, T.E., and Berridge, K.C. (2008). Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 3137–3146.
- Robinson, T.E., and Flagel, S.B. (2009). Dissociating the predictive and incentive motivational properties of reward-related cues through the study of individual differences. *Biol. Psychiatry* 65, 869–873.
- Robinson, L., Platt, B., and Riedel, G. (2011). Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav. Brain Res.* 221, 443–465.
- Romero-Vecchione, E., Fatranská, M., and Kvetnanský, R. (1987). Acetylcholinesterase activity in several hypothalamic and brain stem nuclei after acute and chronic immobilization stress in rats. *Endocrinol. Exp.* 21, 159–165.
- Sailaja, B.S., Cohen-Carmon, D., Zimmerman, G., Soreq, H., and Meshorer, E. (2012). Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3687-3695.
- Sarter, M., and Bruno, J.P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23, 28–46.
- Sarter, M., and Bruno, J.P. (2004). Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities. *Neurobiol. Aging* 25, 1127–1139.
- Sarter, M., and Parikh, V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 48–56.
- Saunders, B.T., and Robinson, T.E. (2010). A cocaine cue acts as an incentive stimulus in some but not others: implications for addiction. *Biol. Psychiatry* 67, 730–736.
- Scarr, E., and Dean, B. (2008). Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia? *J. Neurochem.* 107, 1188–1195.
- Schmidt, L.S., Thomsen, M., Weikop, P., Dencker, D., Wess, J., Woldbye, D.P.D., Wortwein, G., and Fink-Jensen, A. (2011). Increased cocaine self-administration in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 216, 367–378.
- Shekhar, A., Potter, W.Z., Lightfoot, J., Lienemann, J., Dubé, S., Mallinckrodt, C., Bymaster, F.P., McKinzie, D.L., and Felder, C.C. (2008). Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 165, 1033–1039.
- St Peters, M., Demeter, E., Lustig, C., Bruno, J.P., and Sarter, M. (2011). Enhanced control of attention by stimulating mesolimbic-corticothalamic cholinergic circuitry. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9760–9771.
- Thomsen, M., Wess, J., Fulton, B.S., Fink-Jensen, A., and Caine, S.B. (2010). Modulation of prepulse inhibition through both M(1) and M(4) muscarinic receptors in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 208, 401–416.

Toiber, D., Greenberg, D.S., and Soreq, H. (2009). Pro-apoptotic protein-protein interactions of the extended N-AChE terminus. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 *116*, 1435–1442.

Turner, J., Hughes, L.F., and Toth, L.A. (2010). Sleep, activity, temperature and arousal responses of mice deficient for muscarinic receptor M2 or M4. *Life Sci.* 86, 158–169.

Tzavara, E.T., Bymaster, F.P., Davis, R.J., Wade, M.R., Perry, K.W., Wess, J., McKinzie, D.L., Felder, C., and Nomikos, G.G. (2004). M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1410–1412.

Wess, J., Eglen, R.M., and Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 721–733.

Winkler, J., Suhr, S.T., Gage, F.H., Thal, L.J., and Fisher, L.J. (1995). Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375, 484–487.

van der Zee, E.A., and Luiten, P.G. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog. Neurobiol.* 58, 409–471.

Zhang, W., Basile, A.S., Gomeza, J., Volpicelli, L.A., Levey, A.I., and Wess, J. (2002). Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1709–1717.

## **Seznam publikací**

### **1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace**

a) s impact factorem

Valuskova P., Farar V., Janisova K., Ondicova K., Mravec B., Kvetnansky R. a Myslivecek J.: Brain region-specific effects of immobilization stress on cholinesterases in mice. *Stress*, 20, 53-60, 2016 (IF:2.59)

Koshy Cherian A., Kucinski A., Pitchers K., Yegla B., Parikh V., Valuskova P., Gurnani S., Lindsley C.W., Blakely R.D. a Sarter M.: Unresponsive choline transporter as a trait neuromarker and a casual mediator of bottom-up attentional biases. *J Neurosci*, 37, 2947-2959, 2017 (IF:5.988)

Myslivecek J., Farar V., Valuskova P.: M<sub>4</sub> muscarinic receptors and locomotor activity regulation. *Phys Res Suppl*, 2017 (in press) (IF=1.64)

### **2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace**

a) s impact factorem

Tomankova H., Valuskova P., Varejkova E., Rotkova J., Benes J., and Myslivecek J.: The M2 muscarinic receptors are essential for signaling in the heart left ventricle during restraint stress in mice. *Stress*, 18, 208-220, 2015 (IF:2.383)

b) bez impact factoru

Myslivecek, J., Valuskova, P. and Varejkova, E. Adrenaline, Heart Adrenoceptors and Stress. In Alfred Bennun. *Adrenaline Production, Role in Disease and Stress, Effects on the Mind and Body*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2014. p.117–148. ISBN 978-1-63321-087-5