

Les cholinestérases : des enzymes ancrées dans les membranes et les lames basales

par **Éric Krejci**

Laboratoire de Neurologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-ENS UMR 8544, 75005 Paris.

Nouvelle adresse : Laboratoire Biologie des jonctions neuromusculaires normales et pathologiques, IFR95, INSERM U686 Université Paris 5, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris. E-mail : eric.krejci@univ-paris5.fr

Reçu le 29 novembre 2004

RÉSUMÉ

L'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) sont deux enzymes qui hydrolysent l'acétylcholine. Elles sont organisées en deux domaines : le domaine catalytique et un domaine d'organisation du tétramère. Ce tétramère est préférentiellement organisé par le domaine riche en proline de deux protéines caractérisées par leur association avec l'AChE, un collagène particulier ColQ et une petite protéine transmembranaire PRiMA. ColQ localise l'AChE dans les lames basales et PRiMA sur la membrane plasmique.

Le complexe ColQ/AChE présente une forte concentration dans la lame basale des jonctions neuromusculaires, plusieurs processus assurant son accumulation.

Les conséquences fonctionnelles de l'absence d'AChE sont multiples mais la désensibilisation des récepteurs nicotiques n'est pas la cause primaire ou majeure qui explique la faiblesse musculaire observée après inhibition de l'AChE ou en absence d'AChE chez les patients qui portent des mutations dans ColQ.

SUMMARY Cholinesterases: anchored enzymes in membranes and basal laminae

Two proteins, ColQ and PRiMA, organize tetramers of acetylcholinesterase (AChE) and of butyrylcholinesterase (BChE) through peptide interactions. A short proline rich sequence in the N-terminal domain of ColQ or PRiMA associates four C-terminal extension of AChE or BChE. ColQ targets the enzymes in the basal lamina, PRiMA targets the enzymes at the plasma membrane. These complexes represent the mature proteins. The unassembled C-terminal extension of AChE is the key determinant recognized during the "quality control" of protein synthesis. Unassembled catalytic subunits are then degraded by the proteasome pathway.

At the neuromuscular junction, ColQ/AChE repre-

sents the concentrated enzyme. The clusterisation of AChE depends upon ColQ through three sites of interactions: two different heparin binding domains in the collagen domain interact with heparan sulfate proteoglycan particularly the perlecan and the C-terminal non collagenic domain interacts with MuSK, the tyrosine kinase receptor organiser of the neuromuscular junction.

The absence of ColQ and AChE has revealed that the excess of Ach stimulates more nicotinic receptors but probably not until their desensitization. Several morphological modifications may help the clearance of Ach. Conversely the synapse transmission fails during high frequency nerve stimulation.

INTRODUCTION

A la jonction neuromusculaire chez les mammifères, le nerf informe le muscle qu'il doit se contracter par la libération contrôlée d'acétylcholine. L'arrêt de l'activation des récepteurs nicotiques post-synaptiques accumulés à la surface du muscle en regard du nerf dépend de la diffusion du neuromédiateur et de son hydrolyse. Il est bien établi que l'inhibition des cholinestérases bloque la transmission synaptique.

L'AChE possède une remarquable activité enzymatique. Paradoxalement pour une enzyme aussi efficace, le site catalytique révélé par la structure 3D de l'enzyme est localisé au fond d'une gorge de résidus aromatiques (Sussman *et al.*, 1991). Dix ans de mutagenèses dirigées et d'étude de nombreux cristaux d'enzyme, ont permis de cartographier le site catalytique et de définir le site périphérique. Les nouveaux défis visent à comprendre la dynamique de la protéine et des produits de la réaction : entrée simultanée de l'acétylcholine et d'une molécule

d'eau et sortie de cette gorge de la choline et de l'acétate.

Chez les Mammifères une seconde enzyme, la pseudo-cholinestérase ou butyrylcholinestérase (BChE), peut hydrolyser efficacement l'acétylcholine, mais son rôle dans l'élimination de l'acétylcholine a jusqu'à présent paru négligeable puisque cette enzyme peut être absente chez l'Homme sans dommage apparent (La Du *et al.*, 1991).

Si l'activité enzymatique est nécessaire à la destruction du neuromédiateur, je vais présenter des résultats qui montrent que sa localisation est également déterminante. Comment sont adressées ces enzymes dans l'espace extracellulaire? Où sont-elles localisées? Comment sont-elles accumulées? Je vais passer en revue les résultats obtenus au cours de ces dix dernières années dans le laboratoire de Neurobiologie à l'ENS. Puis je rapporterai quelques manipulations génétiques des enzymes de dégradation qui remettent en cause la vision simple que nous avons de la fonction de l'ACh dans la jonction neuromusculaire (JNM).

CoIQ ET PRiMA, DEUX PROTÉINES ASSOCIÉES À L'ACHÉ OU À LA BChE

Il est bien connu que l'AChE présente un remarquable polymorphisme (Bon & Massoulié, 1980). Un gène unique code l'AChE et produit par épissage alternatif plusieurs transcrits. Tous contiennent le même domaine catalytique mais se terminent par une séquence différente. La séquence R produit un monomère soluble d'enzyme, la séquence H produit un dimère ancré à la membrane plasmique par un glycoposphatidylinositol (GPI) et la séquence T produit toute une famille d'oligomères (Massoulié *et al.*, 1999). La BChE ne produit qu'une sous-unité de type T (Lockridge *et al.*, 1987).

Cette extension T s'associe par un pont disulfure à un collagène dans le muscle ou à une protéine membranaire dans le cerveau (Gennari *et al.*, 1987; Inestrosa *et al.*, 1987) (Fig. 1). Au cours des dix dernières années, deux gènes CoIQ et PRiMA qui organisent des hétéro-oligomères complexes ont été clonés (Krejci *et al.*, 1991; Krejci *et al.*, 1997; Perrier *et al.*, 2002). La simple co-expression de CoIQ ou PRiMA avec l'AChE produit des molécules dans lesquelles chaque extrémité N-terminale d'une chaîne porte un tétramère d'enzyme. Ainsi des anticorps dirigés contre le domaine C-terminal de PRiMA élimine spécifiquement le pic d'activité révélé dans un gradient de saccharose. Dans le cas de CoIQ la longueur du collagène définit la position du pic d'activité dans le gradient de saccharose (Deprez *et al.*, 2003).

CoIQ ET PRiMA ORGANISENT DES TÉTRAMÈRES D'ACHÉ OU DE BChE

Dans le domaine N-terminal de CoIQ une séquence riche en proline (PRAD, Proline Rich Attachment Domain) s'associe au tétramère d'AChE par l'extrémité C-terminale

de la sous-unité catalytique (Bon *et al.*, 1997). On a longtemps cru que le domaine N-terminal de CoIQ ou PRiMA interagissait avec des dimères d'enzymes. Des expériences de compétitions ont montré que la sous-unité catalytique complète pouvait être remplacé par l'extension C-terminale de type T dans le tétramère organisé par le PRAD (Simon *et al.*, 1998). Ces expériences établissaient que le domaine C-terminal de l'AChE ou de la BChE est un domaine autonome qui assure la formation du tétramère et suggèrent que le domaine PRAD constitue le moteur de la formation du tétramère. Ce tétramère est efficacement assemblé *in vitro* par incubation de monomère d'enzyme avec le domaine PRAD (Kronman *et al.*, 2000). Le même assemblage des PRAD et 4 WAT a permis d'obtenir des cristaux qui révèlent la structure 3D (Dvir *et al.*, 2004). L'étude des molécules entières concorde avec la structure des peptides et établit l'organisation de chaînes antiparallèles (Bon *et al.*, 2004).

Ce domaine de tétramérisation de l'AChE sert au contrôle de qualité de l'enzyme en cours de synthèse. Lorsque les résidus aromatiques de ce domaine sont exposés, l'enzyme est dégradée par la voie du protéasome (Belbeoc'h *et al.*, 2003). Finalement, comme pour la plupart des hétéro-oligomères, cette séquence participe au contrôle qualité de la formation du complexe (Falasca *et al.*, 2004) qui représente l'enzyme mature.

PRiMA ADRESSE LES TÉTRAMÈRES SUR LA MEMBRANE PLASMIQUE

Dans les lignées cellulaires qui expriment l'AChE, celle-ci n'est pas détectable à la surface des cellules. La coexpression de l'AChE avec PRiMA localise l'enzyme à la surface des cellules.

CoIQ ACCUMULE L'ACHÉ DANS LA LAME BASALE

L'élimination du domaine PRAD de CoIQ par recombinaison homologue chez la souris empêche l'accumulation d'AChE dans la JNM (Feng *et al.*, 1999). Plus précisément, une lignée musculaire dérivée de la souris CoIQ^{-/-} n'organise pas d'hétéro-oligomères d'AChE ni d'amas d'AChE à sa surface; après transfection de CoIQ les hétéro-oligomères et les amas d'AChE sont restaurés (Cartaud *et al.*, 2004). Ces résultats montrent que CoIQ joue un rôle majeur dans l'accumulation de l'AChE.

DES INTERACTIONS MULTIPLES DE CoIQ NÉCESSAIRES À L'ACCUMULATION DE L'ACHÉ À LA JNM

Plusieurs observations ont suggéré que l'accumulation de l'AChE dépend principalement de l'interaction de la queue collagénique de l'AChE avec des protéogly-

canes à sulfate d'héparane. D'une part l'AChE est solubilisée par l'héparine ou par traitement par l'héparinase mais pas par les chondroïtines sulfates (Inestrosa & Perelman, 1989), d'autre part, l'incubation en présence de l'héparine prévient la formation d'amas d'AChE en culture cellulaire (Rossi & Rotundo, 1996). En outre, l'incubation de ColQ/AChE sur des coupes de muscles montre une fixation du complexe au niveau des JNM qui est bloquée par l'héparine. Ces interactions sont proposées comme transitoires, puis des interactions covalentes serviraient à la stabilisation sans la lame basale (Rossi & Rotundo, 1993). Le perlecan HSPG2, l'héparane sulfate protéoglycane majeur de la matrice extracellulaire, est nécessaire à l'accumulation d'AChE. Ainsi en culture l'AChE se localise avec le perlecan (Peng *et al.*, 1999). Dans le mutant de souris sans perlecan, l'AChE ne s'accumule pas dans la JNM alors que l'agrine, un autre protéoglycane de la matrice extracellulaire, est toujours

présent (Arikawa-Hirasawa *et al.*, 2002). Il faut noter que le mutant perlecan présente de nombreux défauts des lames basales des tissus. La moitié des mutants meurt à E10,5 de défauts cardiaques et l'autre moitié à la naissance avec une désorganisation majeure des lames basales et du squelette (Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999 ; Costell *et al.*, 1999).

Dans ColQ, deux séquences riches en résidus basiques dans le domaine organisé en trimère de collagène sont responsables de la forte interaction avec l'héparine (Deprez *et al.*, 2003). Ces interactions sont complexes, puisque le complexe ColQ/AChE s'élué suivant des pics discrets dans un gradient de sel. Si ces interactions avec l'héparine dépendent principalement des résidus basiques, les deux sites présentent des différences notables d'affinités qui résultent non pas de variations du nombre ou de la nature des résidus basiques mais de la géométrie locale à plus grande échelle de trimères de collagène. Même

Deux enzymes



Deux ancres



Deux protéines d'ancrages organisent des tétramères d'enzymes

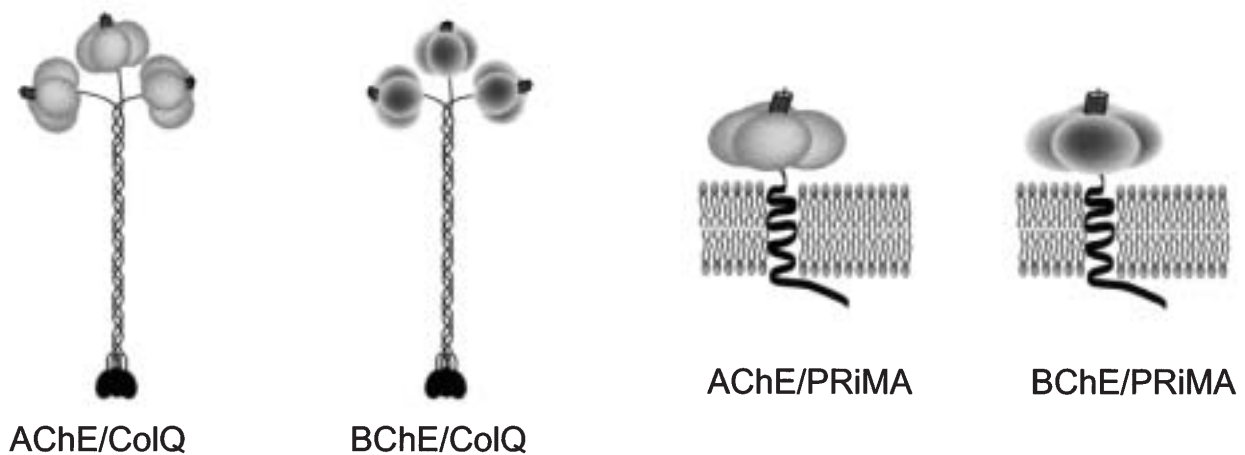


FIG. 1. – Les cholinestérases contiennent deux domaines autonomes, le domaine portant l'activité catalytique et le domaine C-terminal WAT (tryptophane amphiphilic tetramerisation). Les protéines d'ancrage contiennent un domaine riche en proline qui organise efficacement le domaine WAT en tétramère et des domaines qui servent à la localisation des complexes. L'expression combinatoire de ces protéines produit au moins quatre complexes portant des activités enzymatiques et localisés dans différents compartiments extracellulaires.

dans une structure aussi bien organisée que le collagène, les modalités d'interactions sont multiples. Enfin, les deux sites dans le domaine de collagène sont séparés de 25 nm, une distance significative dans une lame basale de 50 nm ; ces deux sites pourraient participer à l'organisation de la lame basale.

Pour identifier les domaines de ColQ qui assurent la formation d'amas d'AChE, une lignée musculaire a été dérivée de la souris ColQ^{-/-} et a été transfectée par des cDNA codant ColQ et portant une délétion de l'un ou l'autre des sites de liaisons à l'héparine ou du domaine C-terminal, non impliqués dans la formation du trimère de collagène (Cartaud *et al.*, 2004). Aucun de ces mutants ne permet la formation d'amas d'AChE alors que les hétéro-oligomères sont produits et que ceux qui conservent un site de liaison à l'héparine restent ancrés dans la lame basale. Ainsi, les mutants délétés des deux sites de liaison à l'héparine sont solubles dans le milieu de culture alors que ceux qui en conservent au moins un ne sont solubles qu'en présence d'héparine dans le milieu de culture (Cartaud *et al.*, 2004).

Il est clair que le domaine C-terminal de ColQ n'interagit pas avec l'héparine mais est nécessaire pour l'accumulation du complexe AChE/ColQ aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet plus de 25 mutations dans COLQ sont responsables chez l'Homme d'une myasthénie congénitale caractérisée par l'absence d'AChE à la JNM (Engel *et al.*, 2003). Parmi ces mutations huit modifient le domaine C-terminal de ColQ sans modifier la formation des hétéro-oligomères AChE/ColQ ni leur propriété d'interaction avec l'héparine (Donger *et al.*, 1998 ; Kimbell *et al.*, 2004). MuSK, le récepteur tyrosine kinase organisateur de la JNM (Sanes & Lichtman, 2001), vient d'être identifié comme le récepteur membranaire de ColQ à la JNM (Cartaud *et al.*, 2004). ColQ est une protéine co-purifiée avec MuSK dans l'organe électrique de Torpille, ColQ est immuno-précipité par MuSK dans des cellules COS co-transfectées. De plus, la délétion du domaine C-terminal de ColQ ou une mutation ponctuelle responsable de l'absence d'AChE chez l'Homme n'interagit plus avec MuSK. ColQ et MuSK sont co-localisés à la surface des cellules co-transfectées. Cette interaction explique l'accumulation d'AChE/ColQ dans la lame basale de la JNM.

DES CONSÉQUENCES MULTIPLES DE L'ABSENCE DE ColQ

Les souris sans ColQ sont viables et leur tremblement et leur faiblesse musculaire permettent de les identifier dès la seconde semaine après la naissance. L'absence de ColQ entraîne une absence d'accumulation d'AChE dans la JNM mais la BChE persiste (Feng *et al.*, 1999), ancrée par PRiMA (résultats non publiés). Les JNM présentent de nombreuses modifications morphologiques : fragmentation, réduction du domaine pré-synaptique, pénétration de la cellule de Schwann entre le nerf et le muscle.

Altérations postsynaptiques

L'étude quantitative de la contraction *ex-vivo* de la préparation diaphragme nerf phrénique montre un arrêt de la contraction du muscle lorsque la fréquence de stimulation du nerf augmente. A 22° C le tétanos se maintient correctement jusqu'à 40 HZ pour chuter à plus haute fréquence. Cet arrêt de la transmission synaptique est souvent attribué à la désensibilisation des récepteurs nicotiniques post-synaptiques mais ce n'est pas le cas. En effet, si l'absence d'AChE entraîne une activation répétitive des récepteurs nicotiniques post-synaptiques, à plus haute fréquence on observe une dépolarisation progressive de la membrane post synaptique (Minic *et al.*, 2003). Cette différence d'interprétation provient probablement de la méthode utilisée pour enregistrer les variations du potentiel de membrane du muscle. Puisqu'il est nécessaire de bloquer le mouvement, trois méthodes sont utilisées 1) bloquer partiellement les récepteurs nicotiniques avec du curare pour limiter la dépolarisation de la membrane sous le seuil d'activation des canaux Na⁺ dépendant du potentiel ; 2) couper les fibres musculaires ; 3) bloquer les canaux Na⁺ par la μ -conotoxine GIIIA ou B. Ces trois méthodes introduisent des biais : les curares vont titrer les récepteurs, la section des fibres va modifier l'équilibre ionique et la μ -conotoxine GIIIA va bloquer au cours du temps les canaux du nerf. En utilisant la μ -conotoxine GIIIB, il est possible d'enregistrer la dépolarisation de la membrane post synaptique et une facilitation évidente de la seconde stimulation dans des expériences de "pair-pulse" (Minic *et al.*, 2003). Cette dépolarisation peut expliquer au moins en partie l'arrêt de la contraction en fonction de la fréquence puisque, dans ces conditions, la force motrice nécessaire à l'entrée du Na⁺ diminue et que la repolarisation de la membrane nécessaire à l'activation du canal sodium pendant sa période réfractaire n'est plus possible.

Pour savoir si la BChE participe au contrôle de la transmission synaptique, la BChE a été inhibée et la force musculaire enregistrée en fonction de la fréquence de stimulations du nerf. Chez une souris normale l'inhibition de la BChE n'a pas de conséquence, en revanche chez le mutant ColQ l'inhibition de la BChE accentue la faiblesse musculaire. Cependant, aucune modification des réponses post-synaptiques enregistrées à faible fréquence étaye une action directe de la BChE dans la fente synaptique (Minic *et al.*, 2003).

Régulations pré-synaptiques

A chaque dépolarisation du motoneurone, une partie des zones actives libère une vésicule d'ACh avec une probabilité donnée, c'est la notion de « contenu quantique ». Ce processus est régulé. Ainsi, en absence d'AChE, chronique dans le mutant ColQ et AChE ou aiguë après inhibition de l'AChE, le contenu quantique mesuré par la méthode des échecs augmente. Ainsi non seulement la réponse post synaptique est prolongée mais, de plus, la probabilité de libération est plus forte. Cette augmentation dépend de l'activation de récepteurs muscariniques

M₁ (Minic *et al.*, 2002). Au contraire, le contenu quantitatif diminue après inhibition de la BChE même lorsque l'AChE est fonctionnelle sans que l'on puisse préciser le mécanisme impliqué (Minic *et al.*, 2003).

Il est donc possible que l'arrêt de la contraction musculaire après l'inhibition de l'AChE et la BChE résulte d'un défaut de libération du neuromédiateur plutôt que d'un effet post-synaptique. Plusieurs approches génétiques en cours devraient permettre de hiérarchiser ces processus.

Plusieurs analyses biochimiques ont montré que la quantité de tétramères varie en fonction de l'exercice et du muscle (Boudreau-Larivière *et al.*, 1997). Avec la caractérisation de PRiMA, il est clair que le complexe PRiMA/AChE est abondant dans certains muscles et varie d'un muscle à un autre. Cependant il n'a pas été possible de visualiser cette enzyme au niveau de la JNM même en absence de ColQ. Il est probable que la densité des sites est faible comparée à celle de ColQ/AChE ; ainsi en utilisant les conditions de marquages qui permettent de localiser l'AChE à la surface des neurones dans le cerveau, l'AChE est bien repérée dans le domaine pré-synaptique de la JNM.

BIBLIOGRAPHIE

- Arikawa-Hirasawa E., Rossi S. G., Rotundo R. L. & Yamada Y., Absence of acetylcholinesterase at the neuromuscular junctions of perlecan-null mice. *Nat. Neurosci.*, 2002, 5, 119-123.
- Arikawa-Hirasawa E., Watanabe H., Takami H., Hassell J. R. & Yamada Y., Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.*, 1999, 23, 354-358.
- Belbeoch S., Massoulié J. & Bon S., The C-terminal T peptide of acetylcholinesterase enhances degradation of unassembled active subunits through the ERAD pathway. *Embo J.*, 2003, 22, 3536-3545.
- Bon S., Coussen F. & Massoulié J., Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 3016-3021.
- Bon S., Dufourcq J., Leroy J., Cornut I. & Massoulié J., The C-terminal T peptide of acetylcholinesterase forms an alpha helix that supports homomeric and heteromeric interactions. *Eur. J. Biochem.*, 2004, 271, 33-47.
- Bon, S. & Massoulié J., Collagen-tailed and hydrophobic components of acetylcholinesterase in *Torpedo marmorata* electric organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 4464-4468.
- Boudreau-Larivière C., Gisiger V., Michel R. N., Hubatsch D. A. & Jasmin B. J., Fast and slow skeletal muscles express a common basic profile of acetylcholinesterase molecular forms. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272 (1 Pt 1), C68-C76.
- Cartaud A., Strohlic L., Guerra M., Blanchard B., Lambergeon M., Krejci E., Cartaud J. & Legay C., MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.*, 2004, 165, 505-515.
- Costell M., Gustafsson E., Aszodi A., Morgelin M., Bloch W., Hunziker E., Addicks K., Timpl R. & Fassler R., Perlecan maintains the integrity of synaptic cartilage and some basement membranes. *J. Cell. Biol.*, 1999, 147, 1109-1122.
- Deprez P., Inestrosa N. C. & Krejci E., Two different heparin-binding domains in the triple-helical domain of ColQ, the collagen tail subunit of synaptic acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 23233-23242.
- Donger C., Krejci E., Serradell A. P., Eymard B., Bon S., Nicole S., Chateau D., Gary F., Fardeau M., Massoulié J. & Guicheney P., Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, ColQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 63, 967-975. * contribution equivalently to this work.
- Dvir H., Harel M., Bon S., Liu W. Q., Vidal M., Garbay C., Sussman J. L., Massoulié J. & Silman I., The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *Embo J.*, 2004, 23, 4394-4405.
- Engel A. G., Ohno K. & Sine S. M., Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003, 4, 339-352.
- Falasca C., Perrier N. A., Massoulié J. & Bon S., Determinants of the T peptide involved in folding, degradation and secretion of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 878-886.
- Feng G., Krejci E., Molgo J., Cunningham J. M., Massoulié J. & Sanes J. R., Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J. Cell. Biol.*, 1999, 144, 1349-1360.
- Gennari K., Brunner J. & Brodbeck U., Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and number of active sites. *J. Neurochem.*, 1987, 49, 12-18.
- Inestrosa N. C. & Perelman A., Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1989, 10, 325-329.
- Inestrosa N. C., Roberts W. L., Marshall T. L. & Rosenberry T. L., Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. *J. Biol. Chem.*, 1962, 4441-4444.
- Kimbell L. M., Ohno K., Engel A. G. & Rotundo R. L., C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 10997-11005.
- Krejci E., Coussen F., Duval N., Chatel J. M., Legay C., Puype M., Vandekerckhove J., Cartaud J., Bon S. & Massoulié J., Primary structure of a collagenic tail peptide of *Torpedo* acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *EMBO J.*, 1991, 10, 1285-1293.
- Krejci E., Thomine S., Boschetti N., Legay C., Sketelj J. & Massoulié J., The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 22840-22847.
- Kronman C., Chitlaru T., Elhanany E., Velan B. & Shafferman A., Hierarchy of post-translational modifications involved in the circulatory longevity of glycoproteins. Demonstration of concerted contributions of glycan sialylation and subunit assembly to the pharmacokinetic behavior of bovine acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 29488-29502.
- La Du B. N., Bartels C. F., Nogueira C. P., Arpagaus M. & Lockridge O., Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1991, 11, 79-89.
- Lockridge O., Bartels C. F., Vaughan T. A., Wong C. K., Norton S. E. & Johnson L. L., Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 549-557.
- Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N. & Simon S., The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem. Biol. Interact.*, 1999, 119-120, 29-42.
- Minic J., Chatonnet A., Krejci E. & Molgo J., Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 138, 177-187.

- Minic J., Molgo J., Karlsson E. & Krejci E., Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depend on activity of acetylcholinesterase. *Eur. J. Neurosci.*, 2002, 15, 439-448.
- Peng H. B., Xie H., Rossi S. G. & Rotundo R. L., Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J. Cell. Biol.*, 1999, 145, 911-921.
- Perrier A. L., Massoulié J. & Krejci E., PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*, 2002, 33, 275-285.
- Rossi S. G. & Rotundo R. L., Localization of "non-extractable" acetylcholinesterase to the vertebrate neuromuscular junction. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 19152-19159.
- Rossi S. G. & Rotundo R. L., Transient interactions between collagen-tailed acetylcholinesterase and sulfated proteoglycans prior to immobilization on the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 1979-1987.
- Sanes J. R. & Lichtman J. W., Development induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001, 2, 791-805.
- Simon S., Krejci E. & Massoulié J., A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *EMBO J.*, 1998, 17, 6178-6187.
- Sussman J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. & Silman I., Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, 253, 872-879.
-