



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

dr Jacek Jasiński

AUTOREFERAT

„Butyrylocholinoesteraza - badania aktywności enzymatycznej, polimorfizm genu *BCHE* i rola w patogenezie choroby Alzheimera”

Gdańsk, 2021

1. Imię i nazwisko: **Jacek Jasiecki**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

magister biotechnologii - Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku; 2000 rok

doktor nauk biologicznych - Rada Instytutu Biologii Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego; 18 listopada 2005 roku na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem: „Regulacja ekspresji genów przez poliadenylację RNA w komórkach *Escherichia coli*”

Promotor w przewodzie doktorskim: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn;

recenzenci: prof. dr hab. Piotr Stępień, prof. dr hab. Artur Jarmołowski.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.10.2009 – obecnie - adiunkt w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny,

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego: **„Butyrylocholinoesteraza - badania aktywności enzymatycznej, polimorfizm genu *BCHE* i rola w patogenezie choroby Alzheimera”**

b) Osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie sześciu publikacji i składa się z czterech prac oryginalnych oraz dwóch prac przeglądowych zawierających także aspekty i analizy podsumowujące wcześniejsze wyniki moich badań. Wszystkie te prace zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. We wszystkich

tych publikacjach jestem autorem korespondencyjnym, a w pięciu także pierwszym autorem.

Łączny Impact Factor (IF) cyklu sześciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **23,926**

Łączna punktacja MEiN cyklu: **550**

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. JasiECKi, J.; Targońska, M.; Wasąg, B. The Role of Butyrylcholinesterase and Iron in the Regulation of Cholinergic Network and Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2033.

IF=**5.923**; punktacja MEiN=**140**

2. JasiECKi, J.; Wasąg, B. Butyrylcholinesterase protein ends in the pathogenesis of Alzheimer's disease—could BCHE genotyping be helpful in Alzheimer's therapy? *Biomolecules* **2019**, *9*, 592.

IF=**4.082**; punktacja MEiN=**100**

3. JasiECKi, J.; Limon-Sztencel, A.; Żuk, M.; Chmara, M.; Cysewski, D.; Limon, J.; Wasąg, B. Synergy between the alteration in the N-terminal region of butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5523.

IF=**3.998**; punktacja MEiN=**140**

4. JasiECKi, J.; Żuk, M.; Krawczyńska, N.; Jońca, J.; Szczoczarz, A.; Lewandowski, K.; Waleron, K.; Wasąg, B. Haplotypes of butyrylcholinesterase K-variant and their influence on the enzyme activity. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *307*, 154-157.

IF=**3.723**; punktacja MEiN=**100**

5. JasiECKi, J.; Jońca, J.; Żuk, M.; Szczoczarz, A.; Janaszak-Jasiecka, A.; Lewandowski, K.; Waleron, K.; Wasąg, B. Activity and polymorphisms of butyrylcholinesterase in a Polish population. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 70–77.

IF=**3.143**; punktacja MEiN=**30**

6. Jońca, J.; Zuk, M.; Wasag, B.; Janaszak-Jasiecka, A.; Lewandowski, K.; Wielgomas, B.; Waleron, K.; **Jasiecki, J.** New insights into butyrylcholinesterase activity assay: Serum dilution factor as a crucial parameter. *PLoS One* **2015**, *10*:e0139480.
IF=**3.057**; punktacja MEiN=**40**

c) omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Butyrylocholinoesteraza (pseudocholinoesteraza, cholinoesteraza osoczowa (BChE, E.C. 3.1.1.8; UniProt P06276), enzym hydrolizujący wiązania estrowe wielu związków, obecny w prawie wszystkich tkankach ssaków, stanowi pierwszą linię obrony człowieka i zwierząt przed toksycznymi związkami. Człowiek posiada dwa enzymy o aktywności cholinoesterazy: acetylocholinoesterazę (AChE, E.C. 3.1.1.7) i BChE. AChE będąca kluczowym enzymem transmisji impulsów nerwowych, jest specyficznym celem dla fosforoorganicznych pestycydów oraz bojowych środków trujących (BST) należących do grupy paralityczno-drgawkowej. Zahamowanie aktywności enzymatycznej AChE w organizmach żywych prowadzi do cholinergicznego objawów zatrucia wynikających z nadmiaru acetylocholiny i objawiających się zwiężeniem źrenic, ślinotokiem, wymiotami, bradykardią i paraliżem ośrodkowego oddechu. Funkcją BChE nie jest regulacja neurotransmisji cholinergicznego, co czyni AChE, ale neutralizacja trucizn, które mogą się dostać do organizmu przez co stanowią one antidotum na wiele związków chemicznych i leków takich jak: alkaloidy roślinne, pestycydy fosforoorganiczne, broń chemiczna (sarin, soman, czynnik VX), jady zwierząt, pilokarpina, kokaina i wiele innych [1–3]. W związku ze specyficzną budową centrum aktywnego, BChE może rozkładać lub trwale wiązać wszystkie związki posiadające wiązania estrowe, mieszczące się w kieszeni centrum katalitycznego. Z punktu widzenia aplikacyjnego BChE jest używana w detektorach (biosensorach) do wykrywania BST i innych związków fosforoorganicznych takich jak pestycydy [4,5]. Wysoka toksyczność związków fosforoorganicznych wynika z hamowania aktywności AChE poprzez fosforylację seryny w centrum aktywnym. Związki fosforoorganiczne są od dawna stosowane jako pestycydy, a także jako groźne środki bojowe. Na świecie każdego roku notuje się 200 tysięcy zgonów spowodowanych zatruciami fosforoorganicznymi

pestycydami, są więc one poważnym problemem zdrowia publicznego, szczególnie na wiejskich terenach krajów rozwijających się [6]. Związki te dostając się do organizmu, hamują aktywność BChE obecnej w osoczu, jednak nie wywołuje to poważnych konsekwencji zdrowotnych. Także brak BChE lub zmniejszona aktywność tego enzymu nie powoduje u człowieka ani u myszy żadnych poważnych efektów fenotypowych, oprócz zwiększonej wrażliwości na suksametonium (depolaryzujący lek zwiotczający mięśnie prądkowane stosowany w anestezjologii) i związki fosforoorganiczne. Z punktu widzenia fizjologii jest to bardzo rzadka sytuacja, kiedy w organizmie człowieka utrzymuje się tak wysoki poziom niepotrzebnego na pozór białka (brak efektów fenotypowych u ludzi i zwierząt nieposiadających tego białka lub posiadających nieaktywny wariant). Jednak korzyści płynące z wysokiej aktywności BChE, skutkujące większą odpornością na zatrucia, szczególnie alkaloidami roślinnymi we wczesnych fazach naszej ewolucji zapewne były niewątpliwe [7]. BChE wychwytyjąc związki toksyczne obecne w osoczu albo je hydrolizuje albo trwale wiąże zapobiegając dotarciu ich do AChE obecnej w obwodowych połączeniach nerwowych lub centralnym układzie nerwowym. Doświadczenia na modelach zwierzęcych, którym podano dożylnie BChE, wykazały, że BChE stanowi pełną ochronę na dawkę $5 \times LD_{50}$ czynnika bojowego [8]. Z kolei, 1 mol ludzkiej BChE wiąże 1 mol związków fosforoorganicznych, a dawka 200 mg tego białka jest w stanie prawdopodobnie zapobiec efektom zatrucia człowieka o wadze 70 kg somanem w dawce $2 \times LD_{50}$ [2,9]. Warto zwrócić tutaj uwagę na ilość białka BChE potrzebnego do inaktywacji toksyny u jednej osoby - 200 mg czystego preparatu BChE, jest to ilość bardzo duża i kosztowna. Zapewnienie takiej ilości preparatu tylko na potrzeby ochrony oddziałów wojskowych w obszarze potencjalnego skażenia bronią chemiczną wiąże się ogromnymi kosztami. Głównym źródłem oczyszczonego preparatu białka - BChE jest osocze człowieka (frakcja IV Cohna), ale ilość białka jaką można rocznie pozyskać tym sposobem jest niewystarczająca na potrzeby armii USA, a tym bardziej na potrzeby szerokiej ochrony ludności cywilnej. Na wyprodukowanie dawek dla 5000 osób (1 kg BChE) potrzeba by było ogromnych ilości ludzkiego osocza, ekwiwalent tego co rocznie otrzymuje się w USA. W świetle potencjalnej konieczności obrony przed użyciem broni chemicznej, amerykański Departament Obrony USA przeznaczył setki milionów dolarów na opracowanie metod produkcji czystej ludzkiej BChE [10]. Podjęto więc różne próby opracowania bardziej wydajnych technologii produkcji BChE, oparte na technologiach inżynierii genetycznej. Próbowano uzyskać nadprodukcję BChE w różnych organizmach m.in. w różnych bakteriach, drożdżach, w

larwach owadziach jedwabnika morwowego *Bombyx mori*, roślinach [11,12]. Jednak żadna z tych prób nie pozwoliła na uzyskanie wysokiej nadprodukcji BChE aktywnego i stabilnego w ludzkim osoczu enzymu. Próbowano uzyskać ekspresję BChE także w ssaczych liniach komórkowych (CHO), czy też w linii komórkowej (HEK 293)[13,14]. Głównym jednak ograniczeniem tych systemów ekspresji jest jednak niska wydajność nadprodukcji rekombinowanego białka, co czyni je nieopłacalnymi w masowej produkcji. Uzyskano nadprodukcję ludzkiej BChE w transgenicznym kozach, które wydzielają BChE w mleku. Preparat tego rekombinowanego białka BChE skomercjalizowano pod nazwą Protexia (PharmAthene Canada, Inc.)[15,16]. Jednak technologia ta posiada pewne wady które nie pozwolą na pokrycie zapotrzebowania na to białko. W ramach projektu pt.: "Opracowanie technologii przemysłowego otrzymywania rekombinowanych cholinoesteraz na podstawie klonowania molekularnego genów kodujących enzymy" (Grant rozwojowy NCBiR nr N R12 0070 06 (2009-2012) pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Skowrona opracowaliśmy technologię produkcji i oczyszczania rekombinowanej BChE w mikroorganizmach uzyskując dużą wydajność nadprodukcji. Uzyskaliśmy ekspresję genu kodującego BChE w mikroorganizmach otrzymując aktywny biologicznie enzym oraz opracowaliśmy metodę oczyszczania tego enzymu na skalę przemysłową. Dotychczasowa metoda pozyskiwania enzymu opiera się na izolacji BChE z osocza. Produkcja enzymu w mikroorganizmach z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej jest znacznie tańsza niż pozyskiwanie go z osocza, powtarzalna technologicznie, nie niesie zagrożenia w postaci możliwych infekcji (bakterie, wirusy, priony), umożliwia łatwiejsze oczyszczanie (w wyniku zastosowania znaczników) produkt (homogenne białko) oraz nie niesie problemów etycznych. Ponadto technologia ta daje praktycznie nieograniczone możliwości produkcji enzymu w porównaniu do dotychczasowych metod bazujących na pozyskiwaniu enzymu z ograniczonego źródła pod względem dostępnej ilości jakim jest ludzkie osocze. Możemy w razie potrzeby w ciągu kilku tygodni dowolnie zwielokrotnić produkcję BChE ze skali laboratoryjnej na skalę przemysłową. Wynikiem tych prac wdrożeniowych jest złożony wniosek patentowy [17].

Cel badawczy osiągnięcia habilitacyjnego

Celem naukowym prowadzonych badań było znalezienie wariantów polimorficznych w genie *BCHE* wpływających na poziom ekspresji i aktywność enzymatyczną butyrylocholinoesterazy. Dodatkowe cele naukowe stawiane w ramach przedstawianego osiągnięcia naukowego to:

- Oznaczenie rozkładu aktywności BChE w populacji o różnych haplotypach wariantu BChE- K.
- Zbadanie wpływu substytucji w 5'UTR (rs1126680) i/lub intronie 2 (rs55781031) genu *BCHE* na proces translacji BChE i analiza częstości ich występowania u pacjentów z chorobą Alzheimera.
- Walidacja i kalibracja metody szybkiego oznaczania aktywności enzymatycznej BChE w osoczu.

Ludzki gen *BCHE* ulega ekspresji głównie w wątrobie, nerkach, płucach, sercu i mięśniach. Człowiek posiada w organizmie 10 razy więcej BChE (680 nmoli) niż AChE (62 nmole) [18]. W osoczu BChE występuje w stężeniu 2-5 mg/L głównie w formie glikozylowanego tetrameru (G4) o masie 340 kDa złożonego z 4 jednakowych podjednostek. BChE o długości 602 reszt aminokwasowych ulega modyfikacji potranslacyjnej, polegającej na odcięciu sekwencji sygnałowej, w wyniku której powstaje aktywny enzym – BChE, zbudowany 574 reszt aminokwasowych [12]. Gen *BCHE* o długości około 70 000 par zasad jest zlokalizowany na chromosomie 3 (3q26.1-q.26.2) i składa się z 4 egzonów i 3 intronów. Z genu tego w wyniku transkrypcji i splicingu powstaje mRNA o długości około 2400 zasad, kodujący białko złożone z 602 reszt aminokwasowych [19,20]. Do tej pory zidentyfikowano ponad 100 wariantów polimorficznych genu *BCHE*. Chociaż większość mutacji jest rzadka, dwie z nich - „atypowy wariant” i „wariant K” - występują znacznie częściej homozygotycznie w populacji kaukaskiej, odpowiednio 1:3000 i 1:100. Osoby z „atypowym” wariantem genu *BCHE* czyli z substytucją w sekwencji aminokwasowej białka (D70G) wykazują przedłużone zwiótczenie mięśni po podaniu suksametonium [21–23]. Suksametonium to krótko działający środek zwiótczający, stosowany w anestezjologii. U osób z normalnym fenotypem typu dzikiego, działanie suksametonium jest zakończone w wyniku hydrolizy

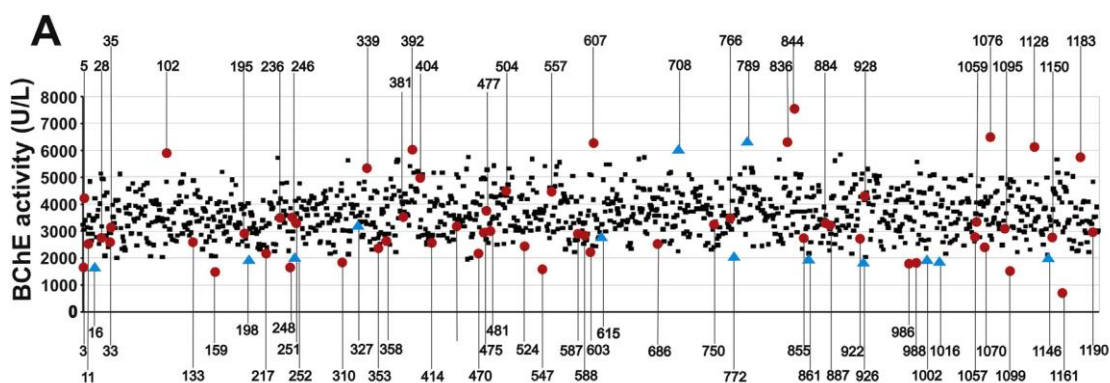
przez BChE. Normalne funkcjonowanie mięśni zostaje przywrócone około 10 minut po zakończeniu podawania tego środka. Przedłużone zwiotczenie mięśni w wyniku podania suksametonium występuje także u osób z wariantami BChE o zmniejszonej aktywności katalitycznej (warianty jakościowe) lub/i o zmniejszonym stężeniu w osoczu (warianty ilościowe) oraz u osób, które w wyniku zatrucia pestycydami mają obniżoną aktywność enzymu. Ten fenotypowy efekt może zostać określony u pacjenta wcześniej, przed podaniem suksametonium przez pomiar aktywności BChE w osoczu w obecności i nieobecności inhibitora - dibukainy. Na tej podstawie można obliczyć wartość dibukainy (ang. *dibucaine number*) (DN), który odpowiada stopniowi inhibicji aktywności enzymatycznej badanej BChE. Wartość DN i całkowita aktywność BChE są używane w połączeniu aby opisać biochemiczny fenotyp BChE. Osoby o normalnym fenotypie (U) wykazują krótkotrwałą (do 10 min) blokadę nerwowo-mięśniową po podaniu suksametonium to mają wartość DN większą niż 80. W przeciwieństwie do tego, osoby z wartością DN mniejszą niż 30 wykazują przedłużone zwiotczenie mięśni po podaniu suksametonium i u nich często występuje wariant „atypowy” (A) BChE. Heterozygoty (UA) mają kliniczne i biochemiczne fenotypy pomiędzy U i A. Inne scharakteryzowane fenotypy to (S) (silent) u których brakuje aktywności katalitycznej enzymu, oraz (F) wykazujące zwiększoną odporność na inhibicję przez fluorki [24][25]. Inne warianty, ilościowe - James (J), i Hammersmith (H) [26,27], posiadają normalną powinowactwo do substratu ale mają obniżoną ilość enzymu w osoczu. Dane literaturowe wskazują, że wariant BChE-K może być powiązany z wieloma chorobami m. in miażdżycą naczyń wieńcowych i chorobą Alzheimera [28][29]. Około 6% populacji posiada fenotyp BChE odbiegający od normy (dane na podstawie wyników badań 726 osób) [30]. Warte uwagi jest to, że erę farmakogenetyki i spersonalizowanej medycyny zapoczątkowało odkrycie dziedzicznej nietypowej reakcji ludzi na suksametonium i metody oznaczania tej cechy w próbkach osocza stosując dibukainę, która została opisana przez Wernera Kalowa w 1957 [31]. Nie znano wtedy jeszcze podstaw molekularnych tej fenotypowej cechy, ale pozwalała ona określić ryzyko wystąpienia bezdechu przy zabiegach anestetycznych z wykorzystaniem suksametonium szczególnie u ludzi obarczonych dziedzicznym ryzykiem.

Badanie aktywności butyrylocholinoesterazy i polimorfizm genu *BCHE* w populacji

Większość raportów na temat mutacji i polimorfizmów w genie *BCHE* pojawia się w kontekście zwiększonej wrażliwości na suksametonium czy hipocholinoesteresemii, a więc mutacji, które zmniejszają aktywność enzymatyczną białka. Mało jest doniesień o wariantach polimorficznych genu *BCHE* w statystycznej populacji ludzkiej, a nie było w ogóle wyników badań charakteryzujących populację mieszkańców Polski. Tylko niewielka ilość poznanych substytucji w tym genie wpływa negatywnie na aktywność enzymatyczną. Funkcja części reszt aminokwasowych BChE nie jest w pełni poznana. Część mutacji powoduje spadek aktywności BChE, wynikający ze zmiany przestrzennej budowy centrum katalitycznego enzymu, albo wpływa na poziom produkcji i stabilności białka. Inne z kolei mutacje centrum aktywnego i miejsca wiążącego resztę choliny (ang. *choline-binding site*) powodują całkowitą utratę aktywności przez enzym. Niektóre warianty polimorficzne powodują obniżenie ekspresji genu *BCHE*, inne wprowadzają kodon stop (mutacja nonsensowna), powodując obniżenie lub brak aktywności BChE w surowicy. Istnieją także doniesienia o wariantach BChE o zwiększonej aktywności, są to warianty Cyntiana i Johanesburg [32,33].

W celu znalezienia wariantów polimorficznych w genie *BCHE* wpływających na poziom ekspresji i aktywność enzymatyczną butyrylocholinoesterazy przeprowadzono pomiar aktywności enzymatycznej w osoczu 1200 osób (ryc. 1) jak i pomiar stopnia inhibicji enzymu przez dibukainę i fluorek sodu w celu określenia parametrów DN i FN. Otrzymane wyniki przedstawiono w poniżej pracy:

Jasiecki, J.; Jońca, J.; Żuk, M.; Szczoczarz, A.; Janaszak-Jasiecka, A.; Lewandowski, K.; Waleron, K.; Wasąg, B. **Activity and polymorphisms of butyrylcholinesterase in a Polish population.** *Chem. Biol. Interact.* 2016, 259, 70–77.



Ryc. 1. Aktywność enzymatyczna BChE określona u 1200 ludzi. Aktywność pojedynczej osoby jest reprezentowana przez pojedynczą czarną kropkę. Aktywność BChE mierzono metodą Ellmana. Czerwone kropki i niebieskie trójkąty z odpowiednią numeracją oznaczają aktywność BChE u osób wybranych do sekwencjonowania genu *BCHE* [34].

Następnie gen *BCHE* poddano sekwencjonowaniu DNA z próbek pochodzących od osób, które wykazywały skrajnie odbiegające od średniej wartości aktywności BChE. Czyli próbki o najwyższych i najniższych aktywnościach enzymu, tj. z zakresu poniżej 2000 U/L i powyżej 5745 U/L). Sekwencjonowaniu genu *BCHE* poddano także próbki o obniżonych wartościach DN i FN. Analogicznie do DN wartość FN (ang. *fluiride number*) odpowiada stopniowi inhibicji aktywności enzymatycznej badanej próbki BChE w wyniku działania fluorku sodu.

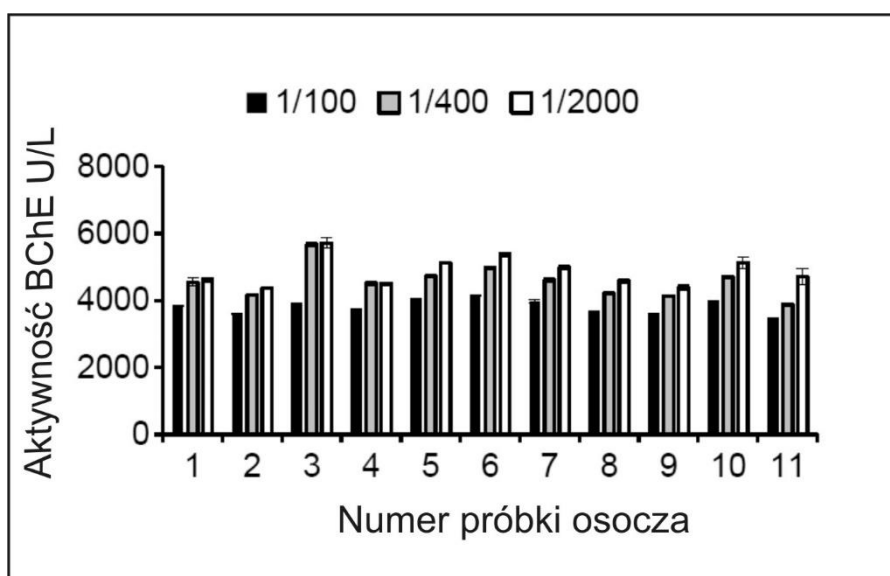
Podsumowując, uzyskane wyniki pokazały że częstość występowania poszczególnych znalezionych wariantów m. in. „atypowy wariant” i ”fluorkowy” genu *BCHE* jest podobna do częstości występowania tych wariantów w innych populacjach kaukaskich. Inną ważną obserwacją wynikającą z naszych badań jest fakt, że (50%) osób z aktywnością BChE poniżej 2000 U/L miało mutację w 5'UTR (32G/A), intronie 2 (c.1518-121T/C) lub eksonie 4 (c.1699G/A mutacja wariantu K). Ponadto wykazaliśmy, że proponowany przez nas szybki test fenotypowania BChE z użyciem czytnika 96-dołkowych płytek jest bardzo powtarzalną i szybką metodą identyfikacji wariantów atypowego i fluorkowego. Obserwowaliśmy doskonałą (100%) zgodność między fenotypem a genotypem w populacji 1200 osób dla fenotypów fluorkowego i atypowego, co świadczy o dokładności przeprowadzonych badań.

Na potrzeby badań enzymatycznych tak dużej populacji ludzi przeprowadzono kalibrację metod i warunków, w których te testy będą przeprowadzane i będą spełniać pożądane parametry czułości, powtarzalności i szybkości wykonywania. Na podstawie

wielu prób ustalono optymalny protokół przeprowadzania testów aktywności BChE i wyznaczania DN i FN przedstawiony w poniższej pracy [35].

Jońca, J.; Zuk, M.; Wasag, B.; Janaszak-Jasiecka, A.; Lewandowski, K.; Wielgomas, B.; Waleron, K.; Jasiecki, J. **New insights into butyrylcholinesterase activity assay: Serum dilution factor as a crucial parameter**. PLoS One 2015, 10:e0139480.

Nasze badania wykazały, że istnieje zjawisko zależności aktywności obserwowanej BChE od stopnia rozcieńczenia badanej surowicy. Im bardziej rozcieńczona surowica tym większa obserwowana była aktywność tej samej próbki po przeliczeniu uwzględniającego stopień rozcieńczenia (ryc. 2). Głównym wnioskiem płynącym z tych doświadczeń jest to, że w klinicznych pomiarach aktywności BChE należy uwzględniać i ujednolicić sposób przygotowania próbek surowicy aby można było porównywać próbki między laboratoriami. Dotychczas nie ma takiego ujednoliconego protokołu i sposób przeprowadzania pomiarów różni się między laboratoriami i producentami sprzętu do badań biochemicznych.



Ryc. 2. Wpływ rozcieńczenia surowicy na aktywność BChE. Aktywność BChE w 100, 400, 2000-krotnie rozcieńczonych jedenastu losowo wybranych próbkach surowicy [35].

Przypuszczalnym powodem istnienia tej zależności aktywności enzymatycznej od stopnia rozcieńczenia o jest złożoność, gęstość i lepkość ośrodka jakim jest osocze w którym ten enzym występuje i w którym jest badany. Prowadzone są dalsze prace w kierunku wyjaśnienia rodzaju i natury oddziaływań tego enzymu z innymi komponentami osocza. Uzyskane wyniki sugerują, że BChE oddziałuje z wieloma innymi białkami

osocza m.in.: ApoA-I, CLU, VTN [36] i tworzy znacznie większe kompleksy niż przewidywano na podstawie masy cząsteczkowej tetrameru BChE.

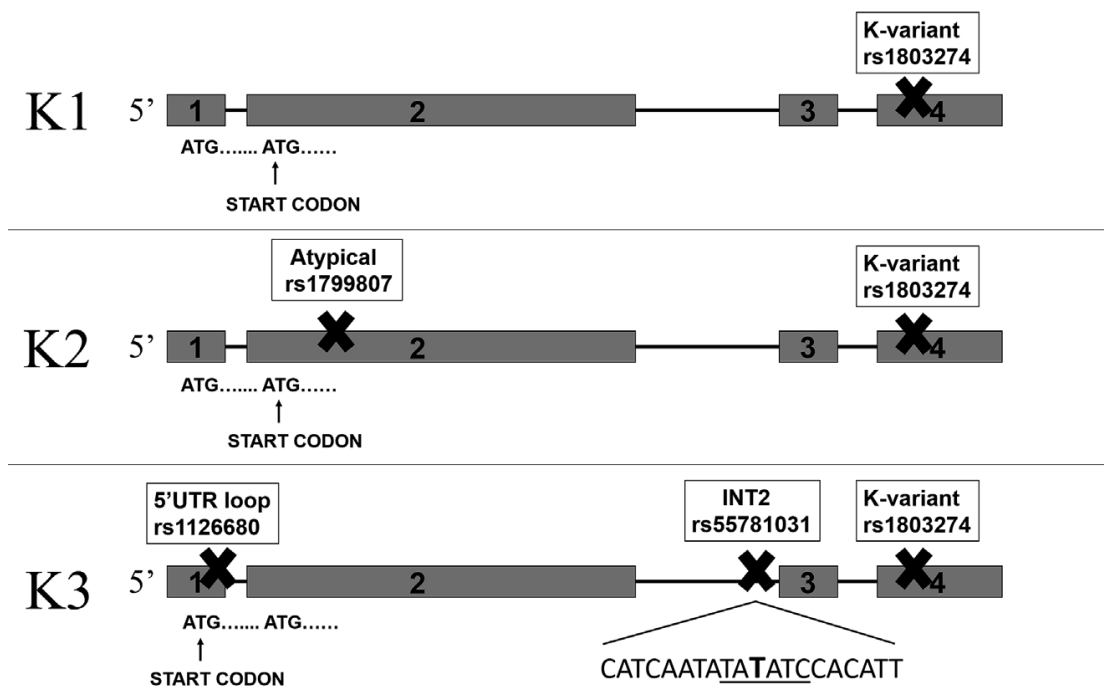
Wpływ substytucji w genie *BCHE* na aktywność enzymatyczną butyrylocholinoesterazy

Wariant K genu *BCHE* (BChE-K, c.1699G > A, p.A539T, rs1803274), substytucja zlokalizowana w domenie tetrameryzacji jest najczęstszym wariantem genetycznym genu *BCHE*, występujący w populacji dość często MAF/MinorAlleleCount: T=0.158546/794 (1000Genomes). Wcześniejsze publikacje z innych ośrodków naukowych sugerowały, że wariant BChE-K może być powiązany z zmniejszoną ilością białka BChE w osoczu co skutkować by miało obserwowaną obniżoną aktywnością enzymu w osoczu wynikającą z zaburzonej czwartorzędowej organizacji tetrameru [28,37]. Z drugiej strony badania innych zespołów nie potwierdzały tej hipotezy i wskazywały, że wariant BChE-K nie ma wpływu na aktywność enzymatyczną BChE w osoczu [38]. W poniższej pracy analizowano wpływ substytucji na aktywność enzymatyczną wariantu BChE-K.

Jasiecki, J.; Żuk, M.; Krawczyńska, N.; Jońca, J.; Szczoczarz, A.; Lewandowski, K.; Waleron, K.; Wasąg, B. **Haplotypes of butyrylcholinesterase K-variant and their influence on the enzyme activity.** *Chem. Biol. Interact.* 2019, 307, 154-157.

Przeprowadzone badania enzymatyczne i genetyczne wykazały istnienie wariantów BChE-K w 3 trzech różnych konfiguracjach (K1; K2; K3) (ryc. 3). K1- bez dodatkowej substytucji w genie BChE; K2- z dodatkową „atypową” substytucją D (rs1799807); K3- z dodatkowymi substytucjami w 5'UTR (rs1126680) i intronie 2 (rs55781031). Co ciekawe tylko pacjenci posiadający wariant K genu *BCHE* z tymi dodatkowymi substytucjami czyli mający wariant K3 lub K2 mają jednocześnie obniżoną wartość aktywności enzymatycznej BChE w surowicy.

Podsumowując, wyniki naszych badań potwierdziły nasze wcześniejsze wyniki a także tych zespołów badawczych, które sugerowały, że sama substytucja rs1803274 nie ma wpływu na aktywność enzymatyczną BChE w surowicy, a tylko w przypadku istnienia dodatkowych substytucji w egzonie 2 (rs1799807) lub egzonie 1 (rs1126680) i intronie 2 (rs55781031) (K3) obserwowaliśmy obniżoną aktywność BChE [39].



Ryc. 3. Haplotypy związane z wariantem BChE-K. **K1** – 1 substytucja w allelu: wariant BChE-K c.1699G > A, p.A539T,(rs1803274); genotyp **K2-AK**, 2 substytucje w allelu: wariant atypowy.293A > G, p.Asp70Gly, (rs1799807) i BChE-K; **K3**-trzy substytucje w allelu: 5'UTR c.-32G > A(rs1126680) oraz w intronie 2 c.1518-121T > C(rs55781031) i BChE-K [39].

Rola butyrylocholinoesterazy w patogenezie choroby Alzheimera

Dotychczasowe dane literaturowe sugerują powiązanie występowania allelu *BCHE-K* z wieloma chorobami m. in. miażdżycą naczyń wieńcowych czy z chorobą Alzheimera [40][41][41]. Część tych danych literaturowych pokazuje, że istnieje korelacja między występowaniem chorobą Alzheimera a obecnością wariantu BChE-K u pacjentów posiadających także allel *APOE4* [42][43]. Inne dane z kolei wykazują brak takiej korelacji. Pomimo tego, że wiele z tych badań opiera się na metaanalizie GWAS (*ang.* genome-wide association study) to wyniki te są niespójne i rola BChE w patogenezie choroby Alzheimera pozostaje niejasna [44][45]. Prawie wszystkie dotychczasowe doniesienia dotyczące udziału BChE w rozwoju choroby Alzheimera skupiały się wyłącznie na roli wariantu BChE-K (K1).

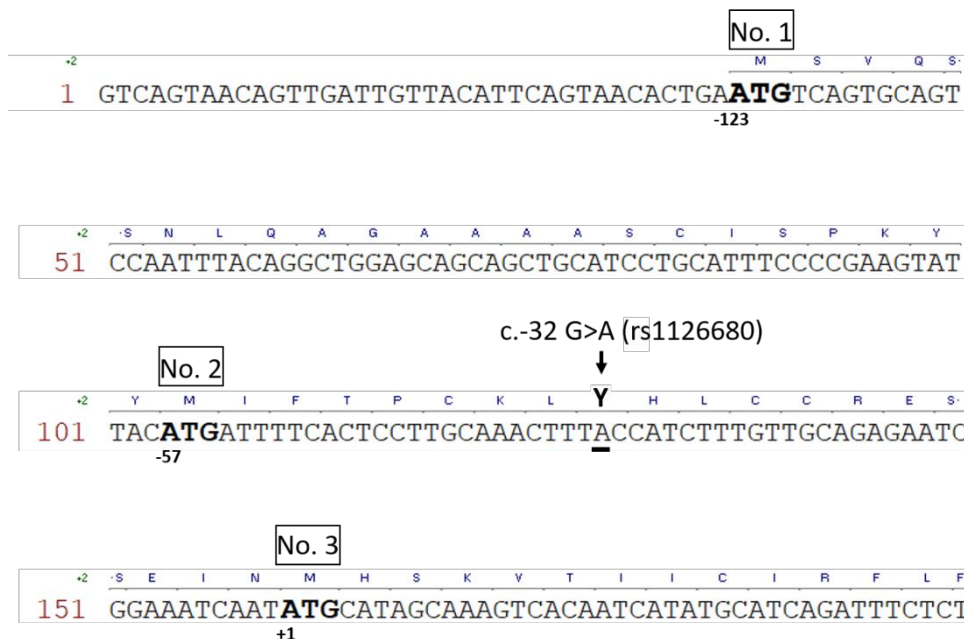
Nasza badania na populacji chorych na Alzheimera wskazują na wyraźną korelację między występowaniem choroby Alzheimera a obecnością wariantu BChE K3, czyli z dodatkowymi substytucjami w 5'UTR (rs1126680) i intronie 2 (rs55781031). Co skłoniło

nas do głębszej analizy tej zależności. Przedstawiono w poniżej pracy efekt synergiczny między wariantem APOE-ε4 a substytucjami zlokalizowanymi w 5'UTR (rs1126680) oraz w intronie 2 (rs55781031) z jednoczesnym występowaniem allelu BCHE-K (rs1803274) u 18% pacjentów z chorobą Alzheimera o późnym początku (n = 55).

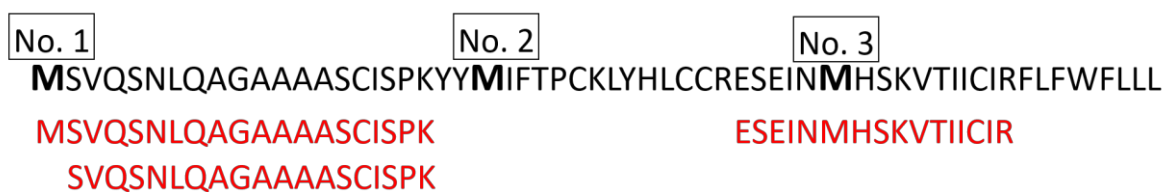
Jasiecki, J.; Limon-Sztencel, A.; Żuk, M.; Chmara, M.; Cysewski, D.; Limon, J.; Wasąg, B. **Synergy between the alteration in the N-terminal region of butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease.** *Sci. Rep.* 2019, 9, 5523.

Wyniki wskazują, że współlistnienie allelu APOE-ε4 i trzech substytucji w genie *BCHE* wiąże się z ryzykiem wystąpienia choroby Alzheimera. Mimo małej badanej grupy pacjentów warty uwagi jest fakt u wszystkich pacjentów posiadających ten komplet alleli (APOE-ε4 i trzech substytucji w genie *BCHE*) wystąpiła choroba Alzheimera.

Substytucja (rs1126680) w 5'UTR w genie *BCHE* znajduje się 32 nukleotydy powyżej 28-aminokwasowego peptydu sygnałowego, co sugerowałoby, że ta mutacja nie wiąże się ze zmianą sekwencji aminokwasowej białka, a ewentualnie może wpływać na regulację jego translacji (ryc. 4). Analiza sekwencji nukleotydowej transkryptu genu *BCHE* wykazała jednak prawdopodobieństwo istnienia dodatkowego miejsca startu translacji znacznie wcześniej niż opisany w literaturze, który obejmowałby SNP (rs1126680) w 5'UTR (kodon Met No. 1 i No.2 na ryc. 4). Założyłem, że skoro takie wydłużona wersja białka nie była wcześniej opisana w literaturze to takie białko mogłoby powstawać w pewnych warunkach, na przykład w wyniku zmian w strukturze 5'UTR RNA w przypadku występowania właśnie takiej substytucji SNP (rs1126680). W celu potwierdzenia tej hipotezy oczyściłem białka BChE z surowicy homozygotycznych pacjentów z substytucją (rs1126680) i poddano analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN w Warszawie. W wyniku tej analizy okazało się, że obie homozygotyczne próbki zawierały fragmenty BChE świadczące o tym, że białko to może powstawać także w formie wydłużonej obejmującej substytucję (rs1126680) (ryc. 5)[46]. Eksperyment ten udowodnił naszą hipotezę, zakładającą, że białko może powstawać z alternatywnego miejsca startu translacji BChE (No.1 na ryc. 4) i powstaje w formie wydłużonej u ludzi niosących substytucję (rs1126680). Wiąże się to także z tym, że w tych warunkach powstają także białko ze zmienionym aminokwasem w pozycji 31 licząc od początku białka N-BChE.



Ryc. 4. Początek sekwencji genu *BCHE* ulegający transkrypcji. cDNA i odpowiadająca mu sekwencja aminokwasowa N-końcowej części BChE. Przewidywane kodony inicjacji translacji (ATG) w pierwszych 200 nukleotydach cDNA pokazano jako powiększone pogrubione litery. Proponowany kodon startowy ATG rozszerzonego wariantu białka BChE jest oznaczony jako No. 1. Znany kodon inicjacji wt BChE oznaczony jako No. 3. Substytucja w nukleotydzie -32 TGC > TAC (c.-32G >A) pC-11Y (rs1126680) lub oznaczając inaczej p.C31Y (w pozycji 31 licząc od początku białka N-BChE) jest powiększona i podkreślona [46].



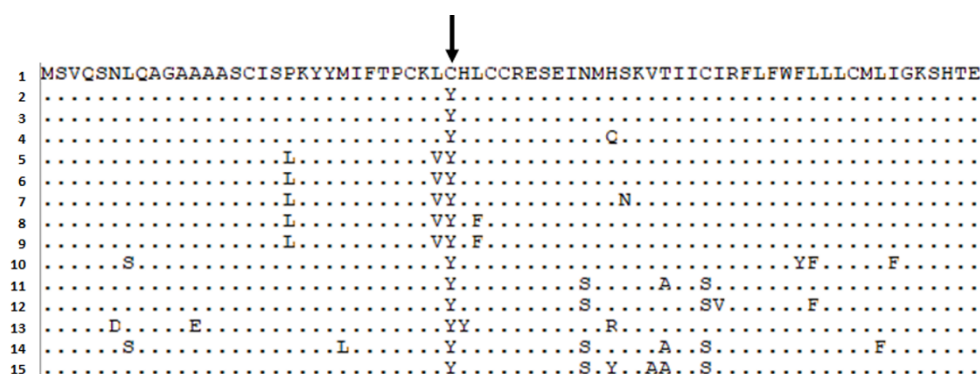
Ryc. 5. Peptydy N-BChE zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas przedstawiono kolorem czerwonym pod odpowiadającą sekwencją pierwszych 60 reszt aminokwasowych białka N-BChE [46].

Powstający wariant białka z 69-aminokwasową sekwencją sygnałową, oznaczony przeze mnie jako N-BChE, który przypuszczalnie może odgrywać rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Jaka jest fizjologiczna rola takiego wydłużonego wariantu BChE i w jaki sposób ulega on sekrecji z komórek bez odcinania sekwencji sygnałowej? Na te

pytania będą także szukał odpowiedzi w planowanych przyszłych badaniach. Jedną z przypuszczalnych funkcji takiego wydłużonego N-końca białka jest rola kotwicząca BChE w błonach komórek. Wcześniejsze badania innych zespołów wykazały, że dziki typ białka ulega sekrecji z komórek m. in. wątroby, a podczas tego procesu odcinana jest sekwencja sygnałowa. W przypadku substytucji (rs1126680) białko to ulega sekrecji bez odcinania tej sekwencji sygnałowej co może świadczyć o tym że w tym przypadku wybierana jest niekonwencjonalna droga sekrecji (bez odcinania sekwencji sygnałowej) [47].

Jasiecki, J.; Wasąg, B. **Butyrylcholinesterase protein ends in the pathogenesis of Alzheimer’s disease—could BCHE genotyping be helpful in Alzheimer’s therapy?** *Biomolecules* 2019, 9, 592.

Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że ta wydłużona forma sekwencji sygnałowej jest bardzo konserwowana ewolucyjnie. Szczególnie pozycja substytucji (rs1126680) p.C31Y (w pozycji 31 od początku białka N-BChE) jest wyjątkowa, gdyż jak wskazuje to analiza filogenetyczna tej sekwencji, obecność tyrozyny w tej pozycji jest bardzo konserwowana ewolucyjnie u wszystkich zwierząt naczelnych. Wyjątkiem jest tu sekwencja aminokwasowa człowieka, gdzie w przypadku dzikiego typu BChE występuje reszta cysteiny w pozycji 31 (ryc. 6). Obecność tej cysteiny w tej pozycji daje możliwość tworzenia dodatkowych mostków disiarczkowych w obrębie tego N-końca. Przeprowadziłem analizę sekwencji z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych, które sugerują, że fragment ten może przybierać formę 3 helis alfa spiętych mostkami disiarczkowymi (ryc. 7) [48].



Ryc. 6. Porównanie 70-cio aminokwasowej sekwencji N-BChE u ewolucyjnie bliskich gatunków. Pozycja p.C-11Y (rs1126680) (lub p.C31Y liczone od początku białka N-BChE) jest zaznaczona czarną strzałką. Porównanie za pomocą BLASTP N-BChE u 14 najbliższych żyjących krewnych: 1—(Homo sapiens) EAW78592.1; 2 — (*Pan*

troglydotes) XP_516857.2; 3 — (*Pan paniscus*) XP_003817746.1; 4 — (*Gorilla gorilla gorilla*) XP_018880258.1; 5 — (*Chlorocebus sabaues*) XP_007970394.1; 6 — (*Colobus angolensis palliatus*) XP_011800018.1; 7- (*Piliocolobus tephrosceles*) XP_023069278.1; 8 — (*Rhinopithecus bieti*) XP_017745933.1; 9 — (*Rhinopithecus roxellana*) XP_010353594.1; 10 — (*Nomascus leucogenys*) XP_003256448.1; 11 — (*Cebus capucinus*) XP_017358747.1; 12 — (*Callithrix jacchus*) XP_002807699,3; 13 — (*Pongo abelii*) XP_009237773.2; 14 — (*Saimiri boliviensis boliviensis*) XP_003925023.1; 15 — (*Aotus nancimae*) XP_012302784.1 [48].



Ryc. 7. Proponowana struktura drugorzędowa N-końca białka N-BCHE o długości 70 reszt aminokwasowych. Fragment BChE z p.C-11Y (rs1126680) (lub p.C31Y od początku białka) analizowano za pomocą programu PSIPRED [49,50]. Reszty cysteiny mogą tworzyć mostki dwusiarczkowe prowadzące do połączenia i stabilizacji 3 helikalnych regionów (czarne klamry). Tworzenie wiązań dwusiarczkowych między resztami cysteiny przewidywano za pomocą serwera DISULFIND [48][51].

Choroba Alzheimera (ang. Alzheimer's disease, AD) – postępująca choroba neurodegeneracyjna, najczęstsza przyczyna otępienia u ludzi po 65 roku życia, klinicznie charakteryzuje się postępującym pogorszeniem pamięci i innych funkcji poznawczych, prowadzącym do utraty zdolności do wykonywania codziennych czynności. Opisał ją po raz pierwszy niemiecki neuropatolog Alois Alzheimer w 1906 i mimo upływu ponad 100 lat nadal nie znamy dokładnie przyczyn wystąpienia tej choroby i nie dysponujemy żadnym lekiem ani terapią która potrafi zapobiegać jej powstawaniu. Na poziomie tkanki mózgu choroba ta wiąże z uszkodzeniem synaps, któremu towarzyszy utrata neuronów, szczególnie w hipokampie i korze mózgowej [52–55]. Istnieje wiele hipotez dotyczących pierwotnej przyczyny wystąpienia choroby Alzheimera, w tym uszkodzenia neuronów cholinergicznym, akumulacji białek, takich jak beta-amyloid (A β) i fosforylowanego tau, która prowadzi do masywnej utraty neuronów, zapalenia, stresu oksydacyjnego i ferroptozy [56–60].

Z definicji wiek jest największym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera o późnym początku [61], z kolei najczęstszym genetycznym czynnikiem

ryzyka jest obecność allelu APOE-ε4 [62]. Wydaje się, że w patogenezie choroby Alzheimera o późnym początku bierze udział wiele innych czynników genetycznych i środowiskowych. Wiele badań wykazało, że brak równowagi między wytwarzaniem a usuwaniem beta-amyloidu (Aβ) tworzącego złoży amyloidowe jest prawdopodobnie znaczącym czynnikiem przyczyniającym się do neurodegeneracji i rozwoju choroby [63,64]. Badania biochemiczne mózgow pacjentów z chorobą Alzheimera ujawniły niedobory acetylocholin (ACh). Badania te doprowadziły do sformułowania hipotezy cholinergicznnej choroby Alzheimera która sugeruje, że degeneracja neuronów cholinergicznnych przodomózgowia i związana z tym utrata neuroprzeżącznictwa cholinergicznego w korze mózgowej inicjuje progresję dysfunkcji poznawczych i behawioralnych obserwowanych u pacjentów z chorobą Alzheimera [65–67]. Hipoteza stała się bardziej przekonująca, gdy wykazano skuteczność terapii z użyciem inhibitorów cholinoesterazy co skutkowało poprawą głównych funkcji poznawczych u pacjentów z chorobą Alzheimera [68]. Stężenie ACh w synapsach neuronów cholinergicznnych jest wypadkową jej syntezy i hydrolizy, która jest kontrolowana odpowiednio przez acetylotransferazę cholinową (ChAT) i cholinoesterazy (ChE). Mózgi ssaków zawierają dwa siostrzane enzymy cholinesterazy: AChE i BChE. AChE jest głównym enzymem neuronów uczestniczącym w przewodnictwie cholinergicznym poprzez hydrolizę ACh, ale BChE może również hydrolizować ACh. W mózgu BChE znajduje się głównie w komórkach gleju i istocie białej. Niemniej jednak BChE jest również związane z neuronami, szczególnie w hipokampie, ciele migdałowatym i wzgórzu [69,70]. Obecność BChE stwierdzono również w złożach beta-amyloidu i splątkach neurofibrylarnych (NFT), co sugeruje, że białko może być zaangażowane w patogenezę choroby Alzheimera [41,71,72].

W ciągu ostatniego stulecia, od czasu kiedy zdiagnozowano pierwszego pacjenta z chorobą Alzheimera do leczenia otępienia związanego z tą chorobą zatwierdzono tylko kilka leków. Terapia ta oparta jest na inhibitorach cholinoesterazy (ChEI) czyli lekach zwiększających stężenie neuroprzeżączników w synapsach w mózgu [73,74]. U pacjentów z farmakologiczną inhibicją AChE przez ChEI i dodatkowo obniżoną aktywnością BChE z powodu mutacji w genie *BCHE* obserwowano szkodliwy wpływ takiej terapii na funkcje poznawcze ponieważ zbyt duży stopień inhibicji ChE prowadzi do niekorzystnych konsekwencji zdrowotnych wynikających z nadmiaru acetylocholin. Uważano, że to wariant BChE-K (rs1803274), najczęstszy wariant genetyczny genu

BCHE, zmniejsza aktywność enzymu, odzwierciedlając słabszą odpowiedź kliniczną na rywastygminę u pacjentów z chorobą Alzheimera [75]. Podczas terapii ChEI pacjenci z BChE o zmniejszonej aktywności nie wykazują takiej poprawy funkcji poznawczych, jak pacjenci z enzymem typu dzikiego [76]. Z drugiej strony substytucje w genie *BCHE* powodujące zmniejszenie aktywności enzymu mogą opóźnić wystąpienie choroby Alzheimera u pacjentów z grupy ryzyka poprzez zwiększenie poziomu acetylocholin w korze mózgowej (ACh). Nasze wyniki wskazują, że substytucje zlokalizowane poza sekwencją kodującą w 5'UTR (rs1126680) i/lub intronie 2 (rs55781031) genu *BCHE*, a nie tylko substytucją wariantu K (rs1803274) odpowiadają za zmniejszoną aktywność enzymu [39].

Podsumowując, na podstawie naszych badań podejrzewamy, że nie sam wariant BChE-K, ale te współistniejące substytucje (rs1126680 i rs55781031), mogą być związane z pogorszeniu funkcji poznawczych u pacjentów leczonych ChEI. Na podstawie tych wyników sugerujemy, że powinno się przeprowadzać genotypowanie pacjentów na obecność substytucji (rs1126680) i/lub (rs55781031) w celu zidentyfikowania osób zagrożonych obniżoną skutecznością terapii ChEIs. Pacjenci z tymi substytucjami powinni być leczeni mniejszą dawką rywastygminy [48].

Pojawiają się coraz częściej z różnych ośrodków naukowych badania sugerujące, że obecność beta-amyloidu tworzącego złogi amyloidowe nie jest czynnikiem wystarczającym do tego aby rozwijała się choroba Alzheimera. Badania te pokazują, że u około 40% ludzi wykryto w mózgach złogi białka beta-amyloidu ale nie manifestowali oni żadnych objawów klinicznych. Wyniki te sugerują, że muszą istnieć dodatkowe czynniki które uruchamiają proces degeneracji neuronów [77–80]. Interesującą hipotezą jest teoria mówiąca o tym, że oprócz złogów beta-amyloidu do wywołania objawów choroby potrzebne są zmiany zapalne związane ze starzeniem się, które są skorelowane z wyższym stężeniem jonów żelaza w mózgu i stresem oksydacyjnym. Wykazano, że jony żelaza gromadzą się wokół złogów amyloidowych w mysich modelach choroby Alzheimera i mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera [81–83]. Jony żelaza niezbędne są we wszystkich procesach komórkowych, a w mózgu także potrzebne są do mielinizacji i syntezy neuroprzekazników. Brak równowagi w homeostazie żelaza leży u podstaw wielu chorób neurodegeneracyjnych. Badania naukowe wskazują, że wysokie stężenie jonów żelaza wywołuje kaskadę zdarzeń, które przyspieszają postęp choroby Alzheimera

i pogorszenie funkcji poznawczych. Pacjenci ze zwiększoną ilością złogów amyloidowych i żelaza są bardziej narażeni na rozwój demencji [84–86]. Kolejną ważną obserwacją wynikającą z wcześniejszych badań jest to, że poziom aktywności BChE jest wprost proporcjonalny do ilości erytrocytów we krwi a przez to może być pośrednio zależny od poziomu stężenia jonów żelaza w komórkach. Potencjalną rolę jonów żelaza w regulacji ekspresji BChE opisano w poniższej pracy przeglądowej [87].

Jasiecki, J.; Targońska, M.; Wasąg, B. **The Role of Butyrylcholinesterase and Iron in the Regulation of Cholinergic Network and Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease Pathogenesis.** *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2033.

Z kolei badania z innych ośrodków naukowych pokazują, że gen *BCHE* ulega ekspresji w reaktywnych astrocytach (A1) co może pogarszać funkcje poznawcze, przyspieszając rozpad acetylocholino w starzejącym się mózgu [88,89]. Na podstawie naszych jeszcze niepublikowanych wyników przypuszczam, że ekspresja *BCHE* w komórkach astrocytów zostaje włączona w obecności wyższego stężenia jonów żelaza w komórkach, która pojawia się w odpowiedzi na stan zapalny. Nieznany jest jeszcze mechanizm regulujący ekspresję genu *BCHE* przez co jest niezmiernie interesujący temat badawczy nad którym będę prowadził dalsze badania. Gen *BCHE* nie ulega ekspresji w powszechnie wykorzystywanych w laboratoriach liniach komórkowych, za wyjątkiem niektórych linii komórek macierzystych [90].

Wnioski

Przeprowadzone biochemiczne i genetyczne badania populacyjne na grupie 1200 osób polegające na określeniu fenotypu i genotypu pacjentów pozwoliły na znalezienie nowych zależności między aktywnością enzymatyczną butyrylocholinoesterazy a sekwencją genu kodującego ten enzym. Pokazano, że najczęściej występująca substytucja - wariant K (rs1803274) genu *BCHE* nie wpływa na aktywność enzymatyczną białka. Za obserwowane obniżenie aktywności enzymatycznej wariantu K odpowiadają inne współwystępujące substytucje w 5'UTR (rs1126680) i/lub intronie 2 (rs55781031) w tym genie. Przypuszczalnie odkrycie to może mieć to duże znaczenie w terapii ludzi chorych na chorobę Alzheimera bo szczególnie homozygotyczni pacjenci z substytucją w 5'UTR (rs1126680) i/lub intronie 2 (rs55781031), będą prawdopodobnie mieli niski poziom aktywności BChE w mózgu i powinni mieć wdrożone leczenie mniejszymi dawkami inhibitorów cholinoesteraz w przypadku leczenia otępienia związanego z

chorobą Alzheimerera. Ponadto wykazano doświadczalnie, że przewidziane za pomocą narzędzi bioinformatycznych alternatywne miejsce startu translacji białka BChE może być wykorzystywane w procesie translacji do produkcji tego enzymu u ludzi. Analiza częstości występowania substytucji (rs1126680) i (rs55781031) u badanej grupy pacjentów z chorobą Alzheimerera i zdrowej grupie kontrolnej wskazuje, że mogą one być markerem wystąpienia tej choroby. Aby jednak potwierdzić te obserwacje dalsze badania obejmujące większe grupy pacjentów powinny zostać wykonane. Pokazano również, że w celu określenia poziomu aktywności enzymatycznej BChE w osoczu pacjentów należy brać pod uwagę także stopień rozcieńczenia badanej próbki osocza gdyż obserwowana aktywność enzymu zależy od stopnia rozcieńczenia danej próbki.

Literatura

Lista publikacji cytowanych w tekście znajduje się na końcu rozdziału.

Inne osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Kariere naukową zacząłem jako student biotechnologii UG-GUMed w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego na Wydziale Biologii wykonując pracę magisterską pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Wyniki prac badawczych zostały opublikowane w dwóch czasopismach i część z nich stanowiły przedmiot mojej pracy magisterskiej pt.: „Konstrukcja szczepu *Vibrio harveyi* podatnego na manipulacje genetyczne w wykorzystaniu bakteriofaga lambda” [91,92]. Następnie kontynuowałem prace badawcze w tej samej jednostce już jako doktorant Środowiskowego Studium Doktoranckiego Uniwersytetu Gdańskiego. Stopień doktora nauk biologicznych uzyskałem z wyróżnieniem w 2005 roku na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem: „Regulacja ekspresji genów przez poliadenylację RNA w komórkach *Escherichia coli*”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn. Wyniki moich doświadczeń zostały opublikowane w czterech czasopismach naukowych i prezentowane na kilku konferencjach, w tym międzynarodowych [93–96]. We wszystkich tych czterech publikacjach byłem pierwszym autorem badań. Publikacja pt.: „Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*” została wyróżniona nagrodą Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii lub biologii molekularnej wykonaną

całkowicie w pracowni na terenie Polski w 2003 roku. Następnie odbyłem krótki staż podoktorski (18 miesięcy) na Uniwersytecie w Calgary (Kanada), gdzie zajmowałem się badaniem procesu retrotranspozycji intronów grupy II. Wyniki moich prac były prezentowane na dwóch konferencjach naukowych. Po powrocie do Kraju zostałem zatrudniony na stanowisku adiunkta w Katedrze Mikrobiologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie kontynuowałem karierę naukową czego owocem jest kilka publikacji, patent i doniesienia konferencyjne, które przedstawione są niniejszy autoreferacie.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Udział w projektach realizowanych na Uniwersytecie Gdańskim w wyniku realizacji których powstały zgłoszenia patentowe i publikacja.

Piotr Skowron, **Jacek Jasiocki** „Sposób uzyskiwania rekombinantowej, biologicznie aktywnej butyrylocholinoesterazy końskiej i jej pochodnych oraz sposób uzyskiwania biologicznie aktywnych cholinoesteraz oraz ich pochodnych w mikroorganizmie *Leishmania tarentolae*.”Zgłoszenie patentowe **PL423116A1**; data zgłoszenia **2019-04-23**

Piotr Skowron, **Jacek Jasiocki** “Genes encoding butyrylcholinesterase, DNA vectors for obtaining recombinant, biologically active equine butyrylcholinesterase or acetylcholinesterase and its derivatives, and a method for obtaining biologically active butyrylcholinesterases or cholinesterases”. Zgłoszenie patentowe w European Patent Office; Publication of **EP3473709A1**; data zgłoszenia **2019-04-24**

Patenty te powstały w wyniku realizacji projektu w ramach którego opracowaliśmy technologię produkcji i oczyszczania rekombinowanej BChE w mikroorganizmach. Technologia produkcji enzymu w mikroorganizmach z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej jest znacznie tańsza niż pozyskiwanie go z osocza, powtarzalna technologicznie, nie niesie zagrożenia w postaci możliwych infekcji (bakterie, wirusy,

priony), umożliwia łatwiejsze oczyszczanie (w wyniku zastosowania znaczników) produkt (homogenne białko) oraz nie niesie problemów etycznych. Ponadto technologia ta daje praktycznie nieograniczone możliwości produkcji enzymu w porównaniu do dotychczasowych metod bazujących na pozyskiwaniu enzymu z ograniczonego źródła pod względem dostępnej ilości jakim jest ludzkie osocze.

Zylicz-Stachula A, Zolnierkiewicz O, **Jasiecki J**, Skowron PM. 2013. A new genomic tool, ultra-frequently cleaving TaqII/sinefungin endonuclease with a combined 2.9-bp recognition site, applied to the construction of horse DNA libraries. *BMC Genomics* 14: 370.

Publikacja ta przedstawia zastosowanie modyfikowanej endonukleazy restrykcyjnej do konstrukcji bibliotek genomowych.

Udział w innych projektach badawczych których efektem realizacji były doniesienia konferencyjne:

1. **Jacek Jasiecki**, Steven Zimmerly. 2008. „Transcription dependent mobility of group IIC intron, *B.h.11* from *Bacillus halodurans*” Ribowest conference 2008, Lethbridge, Kanada
2. **Jacek Jasiecki**, Agnieszka Żylicz-Stachula, Joanna Jeżewska-Fraćkowiak, Małgorzata Skowron, Piotr M. Skowron. Cloning and expression of horse butyrylcholinesterase in *Escherichia coli*. The 12th ASEAN FOOD CONFERENCE 2011, 16 -18 June, 2011; BITEC Bangna, Bangkok, Thailand
3. Piotr M. Skowron, Robert Boratyński, Agnieszka Żylicz-Stachula, Joanna Jeżewska-Fraćkowiak, Małgorzata Skowron, **Jacek Jasiecki**. Construction of fully synthetic, intron-less gene encoding horse butyrylcholinesterase and cloning into bacterial expression system. The 12th ASEAN FOOD CONFERENCE 2011, 16 -18 June, 2011; BITEC Bangna, Bangkok, Thailand
4. Joanna Makowska, **Jacek Jasiecki**, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Maciej Kozak, Maria Smużyńska, Borys Wróbel, Katarzyna Ruszczyńska-Bartnik, Stanisław Ołdziej, Cezary Czaplewski, Adam Liwo. „Calorimetric and conformational studies of the folding of two mutants of the B-domain of staphylococcal protein A differing in stability” IX European Symposium of The Protein Society, May 22-26, 2011 in Stockholm, Sweden
5. Salim Ahmed, **Jacek Jasiecki**, Steven Zimmerly. 2014 „In vivo coupling between group IIC intron insertion and transcriptional termination” RNA 2014 - The Nineteenth Annual Meeting of the RNA Society, Quebec City, Canada, June 3-8, 2014

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Opiekun naukowy 12 prac magisterskich w latach 2009-2021:

1. „Klonowanie i nadprodukcja N-terminalnej domeny butyrylocholinoesterazy” 2020 r. mgr Monika Stańczak
2. „Nadprodukcja i oczyszczanie beta-amyloidu” 2019 r. mgr Klaudia Neubauer
3. „Nadprodukcja, oczyszczanie i charakterystyka ludzkiej acetylocholinoesterazy” 2018 r. mgr Partycja Cysewska
4. „Nadprodukcja, oczyszczanie i charakterystyka enzymatyczna naturalnie występującego wariantu butyrylocholinoesterazy - 2017 r. mgr Agnieszka Weryk
5. „Identyfikacja i charakterystyka szczepów bakteryjnych zdolnych do rozkładu pochodnych iperytu” 2016 r. mgr Żaneta Więckowska
6. „Identyfikacja i charakterystyka szczepów bakteryjnych zdolnych do rozkładu związków fosfoorganicznych i pochodnych iperytu” 2015 r. mgr Aleksandra Krzemińska
7. „Charakterystyka genetyczna i biochemiczna bakterii izolowanych z prób osadów Oceanu Atlantyckiego z rejonu Spitsbergenu. 2014 r. mgr. Izabela Śledź
8. „Nadprodukcja i oczyszczanie zmodyfikowanej genetycznie domeny GA ze *Staphylococcus dysgalactiae*”- 2012 r. mgr Patrycja Antczak
9. „Nadprodukcja i oczyszczanie zmodyfikowanej genetycznie domeny GB ze *Staphylococcus dysgalactiae*”- 2012 r. mgr Dagmara Wypych
10. „Nadprodukcja i oczyszczanie zmodyfikowanej genetycznie domeny Z ze *Staphylococcus aureus*”- 2011 r. mgr Weronika Strawa
11. „Nadprodukcja i oczyszczanie białka poli(A) polimeraza z komórek *Escherichia coli*” 2011 r mgr Ewa Siwik.
12. „Nadprodukcja i oczyszczanie fragmentu białka A ze *Staphylococcus aureus*, wiążącego przeciwciała”- 2010 r. mgr Paulina Witort

Od 2009 prowadzę zajęcia laboratoryjne w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z przedmiotu mikrobiologia dla studentów kierunku farmacja. Od 2009 i prowadzę ćwiczenia z przedmiotu biologia molekularna dla studentów kierunku

analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Od 2020 przygotowałem i prowadzę cykl wykładów z przedmiotu biologia molekularna dla studentów kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Dodatkowo od 2011 prowadzę zajęcia fakultatywne w ramach przedmiotu biotechnologia farmaceutyczna dla studentów kierunku farmacja.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia:

2021 - Nagroda specjalna Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za publikację pt.: „The Role of Butyrylcholinesterase and Iron in the Regulation of Cholinergic Network and Cognitive Dysfunction in Alzheimer’s Disease Pathogenesis” *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 2033

2020 - Nagroda Naukowa Zespołowa II stopnia Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za badania nad wpływem polimorfizmu genu *BCHE* na aktywność butyrylocholinoesterazy i patogenezę choroby Alzheimera.

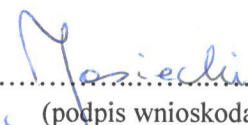
2008 – nagroda „Ribowest 2008 Poster Award” za prezentację na konferencji Ribowest 2008, Lethbridge, Kanada

2004 – Nagroda im. Jakuba Karola Parnasa za współautorstwo w najlepszej pracy doświadczalnej wykonanej w Kraju i opublikowanej w roku 2003 (Jacek Jasiński, Grzegorz Węgrzyn. 2003. Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. *EMBO reports* 4: 172-177).

2001 – Nagroda I stopnia w konkursie Polskiego Towarzystwa Genetycznego na najlepsze prace naukowe wykonane w polskich placówkach badawczych w 2000 roku.

2000 – Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za plakat pt.: „Konstrukcja szczepu *Vibrio harveyi* podatnego na manipulacje genetyczne z wykorzystaniem wektorów pochodzących od bakteriofaga lambda”

2000 – Zespołowa Nagroda Stopnia II Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe i cykl publikacji dotyczących biologii morskiej bakterii *Vibrio harveyi*, oraz możliwości jej wykorzystania jako bioindykatora mutagennych zanieczyszczeń środowiska.


.....
(podpis wnioskodawcy)

Literatura

1. Raveh, L.; Grauer, E.; Grunwald, J.; Cohen, E.; Ashani, Y. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *145*, 43–53.
2. ASHANI, Y. Prospective of human Butyrylcholinesterase as a detoxifying antidote and potential regulator of controlled-release drugs. *Drug Dev. Res.* **2000**.
3. Lockridge, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *148*, 34–46.
4. Masson, P. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 5–13.
5. Saxena, A.; Tipparaju, P.; Luo, C.; Doctor, B.P. Pilot-scale production of human serum butyrylcholinesterase suitable for use as a bioscavenger against nerve agent toxicity. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 1313–1318.
6. Eddleston, M.; Buckley, N.A.; Eyer, P.; Dawson, A.H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet (London, England)* **2008**, *371*, 597–607.
7. Johnson, G.; Moore, S.W. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem. Int.* **2012**, *61*, 783–797.
8. Saxena, A.; Sun, W.; Luo, C.; Myers, T.M.; Koplovitz, I.; Lenz, D.E.; Doctor, B.P. Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J. Mol. Neurosci.* **2006**, *30*, 145–148.
9. Ashani, Y.; Pistinner, S. Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. *Toxicol. Sci.* **2004**, *77*, 358–367.
10. Lockridge, O.; Schopfer, L.M.; Winger, G.; Woods, J.H. Large scale purification of butyrylcholinesterase from human plasma suitable for injection into monkeys; a potential new therapeutic for protection against cocaine and nerve agent toxicity. *J. Med. Chem. Biol. Radiol. Def.*

- 2005, 3, nihms5095.
11. Wei, W.L.; Qin, J.C.; Sun, M.J. High-level expression of human butyrylcholinesterase gene in *Bombyx mori* and biochemical-pharmacological characteristic study of its product. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 121–126.
 12. Geyer, B.C.; Kannan, L.; Garnaud, P.-E.; Broomfield, C.A.; Cadieux, C.L.; Cherni, I.; Hodgins, S.M.; Kasten, S.A.; Kelley, K.; Kilbourne, J.; et al. Plant-derived human butyrylcholinesterase, but not an organophosphorous-compound hydrolyzing variant thereof, protects rodents against nerve agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 20251–20256.
 13. Blong, R.M.; Bedows, E.; Lockridge, O. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J.* **1997**.
 14. Chilukuri, N.; Parikh, K.; Sun, W.; Naik, R.; Tipparaju, P.; Doctor, B.P.; Saxena, A. Polyethylene glycosylation prolongs the circulatory stability of recombinant human butyrylcholinesterase. In *Proceedings of the Chemico-Biological Interactions*; 2005.
 15. Cerasoli, D.M.; Griffiths, E.M.; Doctor, B.P.; Saxena, A.; Fedorko, J.M.; Greig, N.H.; Yu, Q.S.; Huang, Y.; Wilgus, H.; Karatzas, C.N.; et al. In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157–158*, 363–365.
 16. Huang, Y.-J.; Huang, Y.; Baldassarre, H.; Wang, B.; Lazaris, A.; Leduc, M.; Bilodeau, A.S.; Bellemare, A.; Côté, M.; Herskovits, P.; et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 13603–13608.
 17. Jasiocki, J.; Skowron, P. Genes encoding butyrylcholinesterase, DNA vectors for obtaining recombinant, biologically active equine butyrylcholinesterase or acetylcholinesterase and its derivatives, and a method for obtaining biologically active butyrylcholinesterases or cholinester 2019.
 18. Manoharan, I.; Boopathy, R.; Darvesh, S.; Lockridge, O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta.* **2007**, *378*, 128–135.
 19. 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*, 549–57.
 20. Allderdice, P.W.; Gardner, H.A.R.; Galutira, D.; Lockridge, O.; Ladu, B.N.; McAlpine, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* **1991**, *11*, 452–454.
 21. McGuire, M.C.; Nogueira, C.P.; Bartels, C.F.; Lightstone, H.; Hajra, A.; Van der Spek, A.F.; Lockridge, O.; La Du, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 953–7.
 22. Lockridge, O.; Norgren, R.B.; Johnson, R.C.; Blake, T.A. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. *Chem. Res. Toxicol.* 2016, *29*, 1381–1392.

23. Bartels, C.F.; Jensen, F.S.; Lockridge, O.; van der Spek, A.F.; Rubinstein, H.M.; Lubrano, T.; La Du, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *50*, 1086–103.
24. Darreh-Shori, T.; Forsberg, A.; Modiri, N.; Andreasen, N.; Blennow, K.; Kamil, C.; Ahmed, H.; Almkvist, O.; Långström, B.; Nordberg, A. Differential levels of apolipoprotein E and butyrylcholinesterase show strong association with pathological signs of Alzheimer's disease in the brain in vivo. *Neurobiol. Aging* **2011**.
25. Harris, h.; Whittaker, m. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature* **1961**, *191*, 496–498.
26. Bartels, C.F.; James, K.; La Du, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *50*, 1104–1114.
27. Jensen, F.S.; Bartels, C.F.; La Du, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. *Pharmacogenetics* **1992**, *2*, 234–240.
28. Podoly, E.; Shalev, D.E.; Shenhar-Tsarfaty, S.; Bennett, E.R.; Ben Assayag, E.; Wilgus, H.; Livnah, O.; Soreq, H. The Butyrylcholinesterase K Variant Confers Structurally Derived Risks for Alzheimer Pathology ♦. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17170–17179.
29. Darreh-Shori, T.; Siawesh, M.; Mousavi, M.; Andreasen, N.; Nordberg, A. Apolipoprotein ε4 modulates phenotype of butyrylcholinesterase in CSF of patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **2012**, *28*, 443–458.
30. Dimov, D.; Kanev, K.; Dimova, I. Correlation between butyrylcholinesterase variants and sensitivity to soman toxicity. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 313–316.
31. Kalow, W.; Staron, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1957**, *35*, 1305–20.
32. Krause, A.; Lane, A.B.; Jenkins, T. A new high activity plasma cholinesterase variant. *J. Med. Genet.* **1988**, *25*, 677–681.
33. Schopfer, L.M.; Delacour, H.; Masson, P.; Leroy, J.; Krejci, E.; Lockridge, O. The C5 variant of the butyrylcholinesterase tetramer includes a noncovalently bound 60 kDa lamellipodin fragment. *Molecules* **2017**, *22*.
34. Jasiocki, J.; Jońca, J.; Żuk, M.; Szczoczarz, A.; Janaszak-Jasiocka, A.; Lewandowski, K.; Waleron, K.; Wasąg, B. Activity and polymorphisms of butyrylcholinesterase in a Polish population. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 70–77.
35. Jońca, J.; Zuk, M.; Wasag, B.; Janaszak-Jasiocka, A.; Lewandowski, K.; Wielgomas, B.; Waleron, K.; Jasiocki, J. New insights into butyrylcholinesterase activity assay: Serum dilution factor as a crucial parameter. *PLoS One* **2015**, *10*.
36. Jasiocki, J.; Szczoczarz, A.; Cysewski, D.; Lewandowski, K.; Skowron, P.; Waleron, K.; Wasąg, B. Butyrylcholinesterase–Protein Interactions in Human Serum. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10662.

37. Rubinstein, H.M.; Dietz, A.A.; Lubrano, T. E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.* **1978**, *15*, 27–29.
38. Altamirano, C.V.; Bartels, C.F.; Lockridge, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 869–877.
39. Jasiński, J.; Żuk, M.; Krawczyńska, N.; Jońca, J.; Szczoczarz, A.; Lewandowski, K.; Waleron, K.; Wasąg, B. Haplotypes of butyrylcholinesterase K-variant and their influence on the enzyme activity. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *307*, 154–157.
40. Valle, A.; O'Connor, D.T.; Taylor, P.; Zhu, G.; Montgomery, G.W.; Slagboom, P.E.; Martin, N.G.; Whitfield, J.B. Butyrylcholinesterase: Association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1014–1020.
41. Gómez-Ramos, P.; Bouras, C.; Morán, M.A. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase on neurofibrillary degeneration sites in the brains of aged and Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* **1994**, *640*, 17–24.
42. Lehmann, D.J.; Johnston, C.; Smith, A.D. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6*, 1933–1936.
43. McIlroy, S.P. Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *J. Med. Genet.* **2000**, *37*, 182–185.
44. Lee, D.W.; Liu, H.C.; Liu, T.Y.; Chi, C.W.; Hong, C.J. No association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer disease in Chinese. *Am. J. Med. Genet.* **2000**, *96*, 167–169.
45. Hiltunen, M.; Mannermaa, A.; Helisalmi, S.; Koivisto, A.; Lehtovirta, M.; Ryyänen, M.; Riekkinen Sr, P.; Soininen, H. Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* **1998**, *250*, 69–71.
46. Jasiński, J.; Limon-Sztencel, A.; Żuk, M.; Chmara, M.; Cysewski, D.; Limon, J.; Wasąg, B. Synergy between the alteration in the N-terminal region of butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5223.
47. Kim, J.; Gee, H.Y.; Lee, M.G. Unconventional protein secretion – new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*.
48. Jasiński, J.; Wasąg, B.; Wasąg Butyrylcholinesterase protein ends in the pathogenesis of alzheimer's disease—could BCHE genotyping be helpful in alzheimer's therapy? *Biomolecules* **2019**, *9*, 592.
49. Jones, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 1 | Edited by G. Von Heijne. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 195–202.
50. Buchan, D.W.A.; Jones, D.T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* **2019**.
51. Ceroni, A.; Passerini, A.; Vullo, A.; Frasconi, P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine

- connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W177–W181.
52. Davies, P. Selective loss of central cholinergic neurons in alzheimer's disease. *Lancet* **1976**, *308*, 1403.
 53. Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.P.; Masliah, E.; Hyman, B.T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2011**, *1*, a006189–a006189.
 54. Ball, M.J. Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. *Acta Neuropathol.* **1977**, *37*, 111–118.
 55. West, M.; Coleman, P.; Flood, D.; Troncoso, J.. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* **1994**, *344*, 769–772.
 56. Hyman, B.T.; Trojanowski, J.Q. Editorial on Consensus Recommendations for the Postmortem Diagnosis of Alzheimer Disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1997**, *56*, 1095–1097.
 57. Whitehouse, P.J.; Price, D.L.; Struble, R.G.; Clark, A.W.; Coyle, J.T.; DeLong, M.R. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science (80-)*. **1982**.
 58. Ballatore, C.; Lee, V.M.Y.; Trojanowski, J.Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 663–72.
 59. Heneka, M.T.; Carson, M.J.; Khoury, J. El; Landreth, G.E.; Brosseron, F.; Feinstein, D.L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R.M.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015.
 60. Stockwell, B.R.; Friedmann Angeli, J.P.; Bayir, H.; Bush, A.I.; Conrad, M.; Dixon, S.J.; Fulda, S.; Gascón, S.; Hatzios, S.K.; Kagan, V.E.; et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 2017.
 61. Hebert, L.E. Age-Specific Incidence of Alzheimer's Disease in a Community Population. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1354.
 62. Liu, C.-C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 106–118.
 63. Bekris, L.M.; Yu, C.-E.; Bird, T.D.; Tsuang, D.W. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **2010**, *23*, 213–227.
 64. Mawuenyega, K.G.; Sigurdson, W.; Ovod, V.; Munsell, L.; Kasten, T.; Morris, J.C.; Yarasheski, K.E.; Bateman, R.J. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science (80-)*. **2010**.
 65. Bartus, R.; Dean, R.; Beer, B.; Lippa, A. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (80-)*. **1982**.
 66. Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A.C.; Farlow, M.R.; Giacobini, E.; Grossberg, G.T.; Khachaturian, A.S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P.J.; et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **2018**, *141*, 1917–1933.
 67. Francis, P.T.; Palmer, A.M.; Snape, M.; Wilcock, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's

- disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66*, 137–147.
68. Pirozzolo, F.J.; Baskin, D.S.; Swihart, A.A.; Appel, S.H.; Herrmann, N.; Sadavoy, J.; Steingart, A.; Small, G.W.; Spar, J.E.; Plotkin, D.A.; et al. Oral Tetrahydroaminoacridine in the Treatment of Senile Dementia, Alzheimer's Type. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 1603–1605.
 69. Darvesh, S.; Grantham, D.L.; Hopkins, D.A. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *393*, 374–390.
 70. Darvesh, S.; Hopkins, D.A. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *463*, 25–43.
 71. Mesulam, -Marsel; Geula, C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann. Neurol.* **1994**, *36*, 722–727.
 72. Geula, C.; Mesulam, M.-M. Cholinesterases and the Pathology of Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1995**, *9*, 23–28.
 73. Szeto, J.Y.Y.; Lewis, S.J.G. Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14*, 326–38.
 74. Stanciu, G.D.; Luca, A.; Rusu, R.N.; Bild, V.; Beschea Chiriac, S.I.; Solcan, C.; Bild, W.; Ababei, D.C. Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules* **2020**, *10*.
 75. Han, H.J.; Kwon, J.C.; Kim, J.E.; Kim, S.G.; Park, J.-M.; Park, K.W.; Park, K.C.; Park, K.H.; Moon, S.Y.; Seo, S.W.; et al. Effect of Rivastigmine or Memantine Add-on Therapy Is Affected by Butyrylcholinesterase Genotype in Patients with Probable Alzheimer's Disease. *Eur. Neurol.* **2015**, *73*, 23–28.
 76. Sokolow, S.; Li, X.; Chen, L.; Taylor, K.D.; Rotter, J.I.; Rissman, R.A.; Aisen, P.S.; Apostolova, L.G. Deleterious effect of butyrylcholinesterase K-variant in donepezil treatment of mild cognitive impairment. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**.
 77. Bennett, D.A.; Schneider, J.A.; Arvanitakis, Z.; Kelly, J.F.; Aggarwal, N.T.; Shah, R.C.; Wilson, R.S. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* **2006**.
 78. Aizenstein, H.J.; Nebes, R.D.; Saxton, J.A.; Price, J.C.; Mathis, C.A.; Tsopelas, N.D.; Ziolkowski, S.K.; James, J.A.; Snitz, B.E.; Houck, P.R.; et al. Frequent Amyloid Deposition Without Significant Cognitive Impairment Among the Elderly. *Arch. Neurol.* **2008**, *65*, 1509.
 79. Drachman, D.A. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2014**.
 80. Jansen, W.J.; Ossenkoppele, R.; Knol, D.L.; Tijms, B.M.; Scheltens, P.; Verhey, F.R.J.; Visser, P.J.; Aalten, P.; Aarsland, D.; Alcolea, D.; et al. Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia. *JAMA* **2015**, *313*, 1924.
 81. Connor, J.R.; Snyder, B.S.; Beard, J.L.; Fine, R.E.; Mufson, E.J. Regional distribution of iron and iron-

- regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **1992**.
82. Connor, J.R.; Menzies, S.L.; Martin, S.M. St.; Mufson, E.J. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J. Neurosci. Res.* **1990**, *27*, 595–611.
 83. Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* **2018**.
 84. Ayton, S.; Wang, Y.; Diouf, I.; Schneider, J.A.; Brockman, J.; Morris, M.C.; Bush, A.I. Brain iron is associated with accelerated cognitive decline in people with Alzheimer pathology. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 2932–2941.
 85. Ashraf, A.; Clark, M.; So, P.W. The aging of iron man. *Front. Aging Neurosci.* **2018**.
 86. Gaasch, J.A.; Lockman, P.R.; Geldenhuys, W.J.; Allen, D.D.; Van Der Schyf, C.J. Brain iron toxicity: Differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem. Res.* **2007**.
 87. Jasiocki, J.; Targońska, M.; Wasąg, B. The Role of Butyrylcholinesterase and Iron in the Regulation of Cholinergic Network and Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2033.
 88. Fakhoury, M. Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Curr. Neuropharmacol.* **2017**.
 89. Darreh-Shori, T.; Vijayaraghavan, S.; Aeinehband, S.; Piehl, F.; Lindblom, R.P.F.; Nilsson, B.; Ekdahl, K.N.; Långström, B.; Almkvist, O.; Nordberg, A. Functional variability in butyrylcholinesterase activity regulates intrathecal cytokine and astroglial biomarker profiles in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34*, 2465–2481.
 90. Tiethof, A.K.; Richardson, J.R.; Hart, R.P. Knockdown of butyrylcholinesterase but not inhibition by chlorpyrifos alters early differentiation mechanisms in human neural stem cells. *Toxics* **2018**.
 91. Czyz, A.; Jasiocki, J.; Bogdan, A.; Szpilewska, H.; Węgrzyn, G. Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*.
 92. Jasiocki, J.; Czyz, A.; Gabig, M.; Węgrzyn, G. Construction and use of a broad-host-range plasmid expressing the lamB gene for utilization of bacteriophage λ vectors in the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Mar. Biotechnol.* **2001**, *3*.
 93. Jasiocki, J.; Węgrzyn, G. Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*. *EMBO Rep.* **2003**, *4*.
 94. Jasiocki, J.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, G. Localization of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in cellular membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 598–602.
 95. Jasiocki, J.; Węgrzyn, G. Transcription start sites in the promoter region of the *Escherichia coli* penB (plasmid copy number) gene coding for poly(A) polymerase I. *Plasmid* **2006**, *55*.
 96. Jasiocki, J.; Węgrzyn, G. Phosphorylation of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I and effects of this modification on the enzyme activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *261*.