

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.322.9

doi: 10.26907/2542-064X.2021.1.5-19

## **АФФИННОСТЬ ЛИГАНДОВ К РЕГУЛЯТОРНЫМ УЧАСТКАМ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

*А.Р. Мухаметгалиева, А.С. Козлова, Н.И. Акберова, А.Н. Фаттахова  
Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

### **Аннотация**

Ингибиторы холинэстераз являются объектом множества исследований, нацеленных на разработку эффективного лечения различных когнитивных расстройств, поэтому изучение холинэстераз и выяснение механизма их взаимодействия с лигандами являются основой для таргетно направленного синтеза и селекции высокоспецифичных обратимых ингибиторов. В работе проанализировано сродство субстратов и ингибиторов холинэстераз для определения различий в связывании лигандов с активным центром ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы посредством молекулярного докинга. Лиганды, имеющие бензольное кольцо, обладали лучшей аффинностью к регуляторным участкам ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы. Минимальное сродство к ферментам было установлено у холина, продукта гидролиза природного ацетилхолина, и тетраметиламмония, производного холина. Кроме того, были показаны различия в связывании молекул ацетилхолина и холина в ацильном кармане активного сайта холинэстераз.

**Ключевые слова:** ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, молекулярный докинг, энергия сродства, ацетилхолин, холин

### **Введение**

Ацетилхолинэстераза АХЭ (3.1.1.7) и бутирилхолинэстераза БХЭ (3.1.1.8) – ферменты семейства холинэстераз (ХЭ), выполняющие физиологическую, фармакологическую и токсикологическую роли [1, 2]. Аминокислотные последовательности АХЭ и БХЭ совпадают на 65% [3], кроме того, ферменты имеют похожие механизмы связывания субстратов, но различаются сродством к ингибиторам [4].

Если АХЭ находится в большом количестве в нервной ткани, участвуя в холинэргической передаче, то БХЭ локализована в основном в плазме крови, с глобулиновой фракцией, но также встречается во всех тканях организма, и может в некоторых случаях заменять АХЭ для гидролиза ацетилхолина (АХ) [2]. В исследованиях было показано, что в группе пациентов, у которых не было выявлено активности гена БХЭ, пациенты были склонны к отравлениям биологическими активными эфирами, используемыми в медицине [5]. Возможно, физиологическая роль БХЭ сводится к тому, что, кроме нейтрализации токсинов в кровотоке, БХЭ может использоваться в качестве дополнительной ферментативной активности к АХЭ при отравлениях [6].

Оба фермента имеют схожее строение активного центра. Активный сайт находится на дне глубокого и узкого ущелья, которое пронизывает фермент [7]; у АХЭ глубина ущелья равняется 17.9 Å, ширина – 9.1 Å, у БХЭ – 18.1 Å и 15.1 Å соответственно [8, 9]. Разница в специфичности ферментов к лигандам обусловлена различием в размерах их активных сайтов. Кроме того, из-за наличия ароматических аминокислот в молекуле фермента срединная часть «ущелья» АХЭ уже, чем у БХЭ. Таким образом, активный сайт БХЭ более доступен для связывания с лигандами, что делает его менее специфичным по сравнению с АХЭ [9]. На входе в канал активного сайта располагается периферийный анионный сайт (ПАС), который ответственен за ориентацию лиганда в активном сайте [3]. АХЭ из-за наличия в ПАС ароматических остатков аминокислот имеет высокое связывание с лигандами [10, 11]. Роль оксианионного и анионного центров сводится к фиксации лиганда в каталитическом центре, который представлен триадой аминокислот Ser–His–Glu [12].

Некоторые ингибиторы ХЭ рассматриваются как лекарственные средства при лечении болезни Альцгеймера (БА) и миастении Гравис. При БА происходит гибель холинэргических нейронов, что приводит к когнитивным расстройствам, поэтому для лечения симптомов болезни используют ингибиторы АХЭ [13, 14]. Самые распространённые ингибиторы ХЭ, используемые для лечения, – это ривастигмин, физостигмин, прозерин, калемин и др. Недавнее исследование по поиску новых ингибиторов показало, что докинг производных пиридоксина к ХЭ показывает лучшее сродство, чем применяемые в медицине калемин и прозерин [15]. Некоторые ингибиторы ХЭ (такие как зоман, табун) также являются токсическими агентами (фосфорорганическими соединениями, сокращенно ФОС) с нервнопаралитическими свойствами, которые могут приводить к смерти. Хотя производство ФОС как химического оружия запрещено с 1993 г., использование пестицидов на основе ФОС распространено по всему миру, также ФОС использовались в террористических нападениях. Поэтому много исследований направлено на создание как мутантных форм фермента непосредственно для защиты АХЭ дикого типа [16], так и каталитических биологических на основе ХЭ с реактиваторами [17].

Выбор лигандов основан на свойствах ХЭ гидролизовать сложные эфиры холина и тиоаналогов, ацетанилиды, последние, в свою очередь, являются прекурсорами лекарств. Холин является предшественником и метаболитом ацетилхолина и обычно используется в качестве маркера для определения холинэргической активности [18]. Холин и его производные играют важную роль в медицине и биологии. Холин, ТМА и пропилий относят к обратимым ингибиторам. Пропилий – хороший ингибитор ПАС, используется в качестве флуоресцентного красителя из-за его свойств связываться с нуклеиновыми кислотами, является мутагеном.

Ингибиторы ХЭ являются объектом множества исследований, нацеленных на поиск лечения различных расстройств, поэтому изучение ферментов и механизмов взаимодействия их с лигандами является основой для таргетного направленного синтеза и селекции высокоспецифичных обратимых ингибиторов. В настоящей работе было проанализировано сродство некоторых субстратов и ингибиторов ХЭ для определения различий связывания лигандов с активным центром АХЭ и БХЭ посредством молекулярного докинга.

## 1. Материалы и методы

**1.1. Материалы.** Структуры лигандов были получены из базы данных PubChem и ChemSpider (для АТМА) (рис. 1). Из 12 анализируемых лигандов 9 соединений являются субстратами, а 3 – ингибиторами (это холин, ТМА, пропилий). Все лиганды, кроме ФА и *o*-НФА, положительно заряжены.

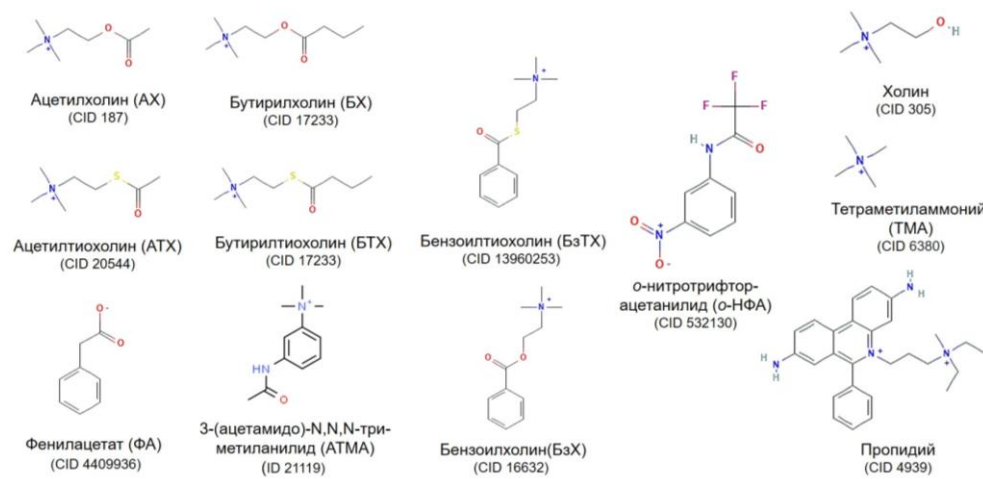


Рис. 1. Соединения, используемые в качестве лигандов

**1.2. Уточнение структуры АХЭ и БХЭ биоинформатическими методами.** Из базы данных PDB получили все структуры АХЭ и БХЭ, провели множественное выравнивание последовательностей структур. Выявили структуры, в которых экспериментально разрешено максимальное количество аминокислот с наименьшей погрешностью разрешения (*4BDT\_A* для АХЭ, *6I2T\_B* для БХЭ). *4BDT\_A* / *6I2T\_B* использовали в качестве шаблона для предсказания структуры белка на веб-сервере Robetta [19]. Качество структуры определяли при помощи QMEAN-оценки [20]. Структуры АХЭ и БХЭ стабилизированы методом равновесной молекулярной динамики в течение 25 нс, предварительно выполнены подготовительные симуляции (минимизация – 0.1 нс, нагрев до 300 К – 0.3 нс и эквипирация – 2 нс). Эксперимент был проведен в программе NAMD [21] с использованием силового поля CHARMM36 [22] и модели воды TIP3P при физиологических условиях (NaCl 0.15 М/л, pH 7.0). Анализ траектории молекулярной динамики проводили, используя программу VMD [23]. Вторичная структура была предсказана на основе третичной с использованием dssp, входящей в пакет bio3d R [24]. Графики были построены при помощи пакета R ggplot2 [25].

**1.3. Выравнивание.** Выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов было проведено при помощи веб-сервера MAFFT [26] на основе последовательностей белков АХЭ и БХЭ из базы данных Uniprot [27].

**1.4. Молекулярный докинг.** Для уточнения расположения активных центров у предсказанных структур были проведены парные выравнивания последовательностей АХЭ и БХЭ из базы данных Uniprot с последовательностями структур АХЭ из [28] и БХЭ из [29].

Молекулярный докинг проводили в программе Autodock [30] без добавления молекул воды. Каждый лиганд последовательно помещали в пять регуляторных участков активного центра АХЭ и БХЭ: периферийный анионный центр, анионный центр, каталитическая триада, оксианионная дыра, ацильный карман. Докинг для каждой пары «лиганд – регуляторный участок фермента» проводили в 10 поверхностях.

Для уточнения поз лигандов в структурах АХЭ и БХЭ позы лигандов были разделены на группы с RMSD внутри групп  $< 4 \text{ \AA}$ , из которых были выбраны группы с максимальным количеством соседей. Аффинность лигандов оценивали на основе энергии сродства лигандов к ферменту. Статистически значимые различия аффинности проверяли при помощи критерия Тьюки.

## 2. Результаты и их обсуждение

**2.1. Предсказание структуры АХЭ и БХЭ.** Для предсказания структуры АХЭ и БХЭ были выбраны структуры модели *4BDT\_A*, *6I2T\_B* соответственно, как наиболее полные. QMEAN-оценки моделей, предсказанные Robetta [19], равнялись 1.48 и 0.72 для АХЭ и БХЭ соответственно. В результате молекулярной динамики получили стабильные структуры АХЭ и БХЭ с количеством аминокислот в запрещенных зонах на карте Рамачандрана в среднем менее 1%, вторичная структура оставалась стабильной в течение всего хода молекулярной динамики. Среднее квадратичное отклонение атомов (RMSD) стабилизируется для АХЭ с 21 нс; для БХЭ с 15 нс, флуктуация атомов модели (RMSF) не превышает  $10 \text{ \AA}$  для АХЭ,  $4 \text{ \AA}$  для БХЭ, что свидетельствует о стабильности данных структур. Для проведения докинга были использованы координаты атомов структур, не содержащих аминокислоты в запрещенных зонах и обладающих минимальной полной энергией.

**2.2. Докинг лигандов БХЭ.** Выравнивание структур АХЭ и БХЭ показало, что активные центры находились в положениях, указанных в табл. 1.

Молекулярный докинг был проведен с 12 выбранными лигандами, среди которых природным является только АХ. Аффинность показывает силу взаимодействия в паре фермент – лиганд. Энергия сродства всех комплексов меньше нуля, что свидетельствует об образовании стабильного комплекса.

На рис. 2 представлены результаты определения аффинности лигандов к активным центрам АХЭ и БХЭ. Лиганды представлены на двух осях: лиганды на оси *X* сравнивают с лигандами на оси *Y*. Отрицательные значения различия в аффинности соответствуют высокому сродству лиганда к данному участку фермента, положительные – низкому сродству. Например, если сравнить аффинность пропидия (на оси *X*) и АХ (на оси *Y*) в ПАС АХЭ, то мы видим, что на пересечении стоит число, равное  $-4.7$ . Значит, пропидий в ПАС АХЭ связывается лучше, чем АХ.

Разница сродства лигандов и участков активного центра сильно не различается у двух ферментов, это подтверждается схожим строением активного центра ХЭ. Однако пропидий имеет большее сродство с АХЭ, чем с БХЭ, из-за различий в строении ПАС [31]. В БХЭ триптофан заменяется аланином, что приводит к уменьшению ингибирования пропидием.

Табл. 1

## Аминокислоты активного центра АХЭ и БХЭ

Участки активного центра	Ацетилхолинэстераза	Бутирилхолинэстераза
Каталитическая триада	Ser234, His478, Glu365	Ser226, His466, Glu353
Анионный сайт	Trp117, Gly479, Ile482, Tyr164, Gly233	Phe357, Trp110, Tyr156
Периферийный анионный сайт	Trp317, Tyr155, Tyr368, Tyr372, Ser156, Asp105	Tyr360, Asp98
Ацильный карман	Trp267, Phe326, Phe328, Phe369	Val316, Leu314
Оксианионная дыра	Gly152, Gly153, Ala235	Gly145, Gly144, Ala227

Наименьшее сродство во всех участках ферментов показывают два лиганда: холин и его производное – ТМА, оба относятся к ингибиторам ХЭ, хотя и к слабым ингибиторам. Шесть лигандов представлены сложными эфирами холина и их тиоаналогами, содержащими тиоловую группу: АХ и АТХ, БХ и БТХ, БзХ и БзТХ. Они не отличаются между собой аффинностью к участкам активного сайта, что позволяет использовать их как взаимозаменяемые субстраты (см. [32]). БХ и БТХ во всех сайтах связывания АХЭ, БХЭ имеют большее сродство к БХЭ, чем АХ и АТС. Молекула БХ для БХЭ преимущественно используется для различения двух холинэстераз, так как скорость гидролиза субстрата намного выше для БХЭ [33]. Молекула БХ (и БТХ) связывается с АХЭ лучше, чем родной субстрат, возможно, потому что БХ является конкурентным ингибитором для АХЭ [34].

БзХ и БзТХ – сложные эфиры бензойной кислоты, холина (и тиола для БзТХ), положительно заряженные, являются хорошими субстратами для ХЭ [35, 36]. Эта пара лигандов имеет лучшее связывание с ферментами, чем АХ, АТХ, БХ, БТХ, ФА (см. рис. 2). Проведенный анализ аффинности лигандов показал, что лиганды, имеющие бензольное кольцо (АТМА, ФА, БзХ, БзТХ, *o*-НФА, пропидий), обладают лучшей аффинностью к регуляторным участкам ХЭ. Ингибиторы, которые не имеют кольца, характеризуются меньшим сродством к ферменту, чем их субстраты.

После выравнивания последовательностей структур АХЭ и БХЭ был проведен анализ взаимодействий аминокислот регуляторных участков активного сайта с лигандами. У обоих ферментов во всех участках с различными лигандами взаимодействовал похожий набор аминокислот (рис. 3).

Для правильной работы фермента необходимо, чтобы лиганды находились в определенной ориентации, которую и обеспечивают эти аминокислоты.

Обнаружено, что взаимодействия лигандов с аминокислотами отличаются в ацильном кармане и ПАС у АХЭ и БХЭ (рис. 3). У двух ХЭ в ацильном кармане меньшее количество взаимодействий имеют ТМА и холин, больше взаимодействий – пропидий. Несмотря на то что эти вещества относят к ингибиторам, они по-разному ингибируют фермент. Ранее было показано: в ПАС АХЭ больше связываний, так как АХЭ имеет ароматические аминокислоты, которые отсутствуют у БХЭ [10].

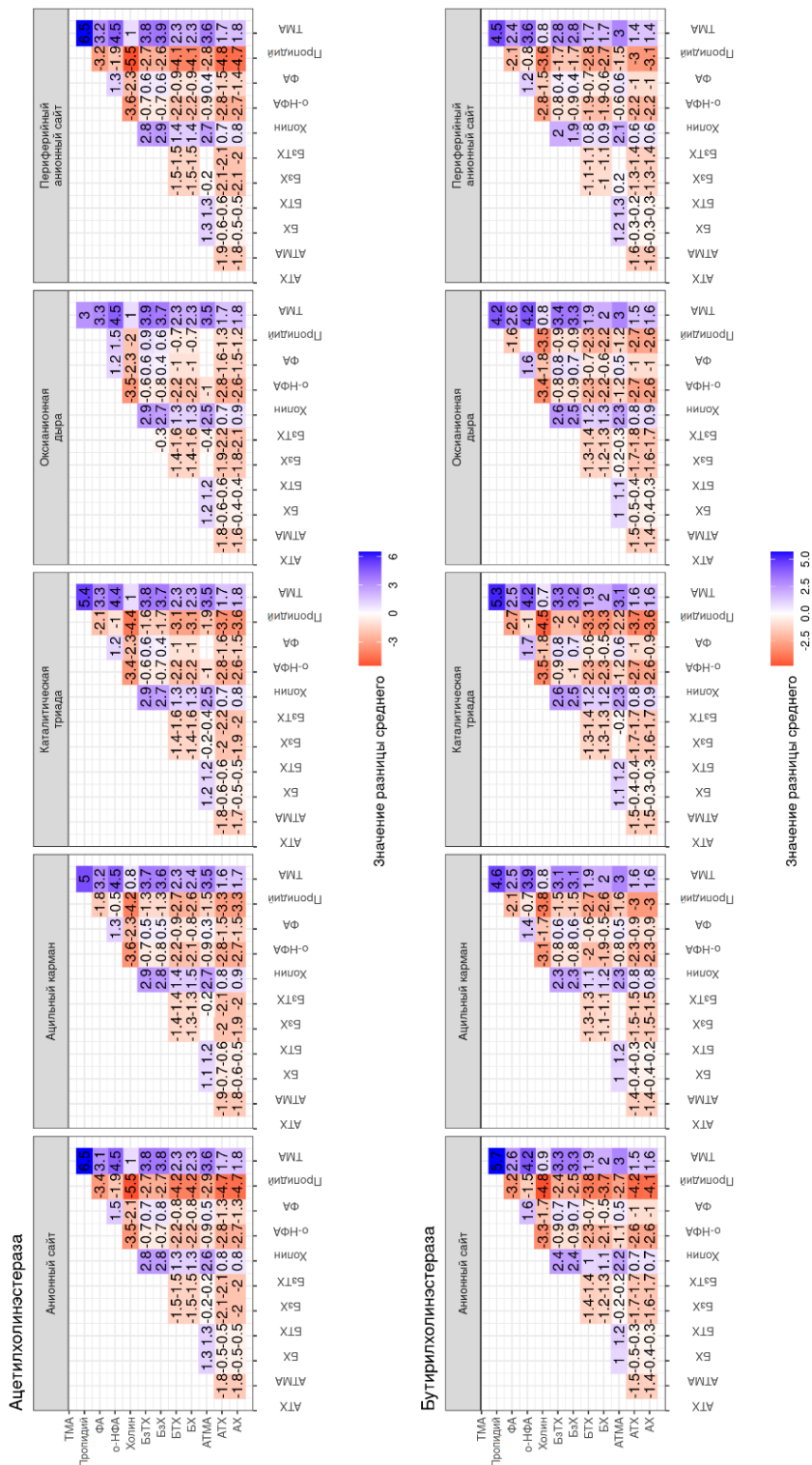


Рис. 2. Статистика аффинности расположения лигандов в регуляторных участках;  $p < 0.05$ . Цветом показана разница между энергиями взаимодействия АХЭ и БХЭ с лигандами. Лиганды, располагающие на оси абсцисс, имеют большее сродство к белку, по сравнению с лигандами на оси ординат в данном участке фермента. Положительные значения разницы средних, выделенные синим цветом, характеризуют меньшую аффинность, отрицательные значения, выделенные красным, свидетельствуют о большей аффинности

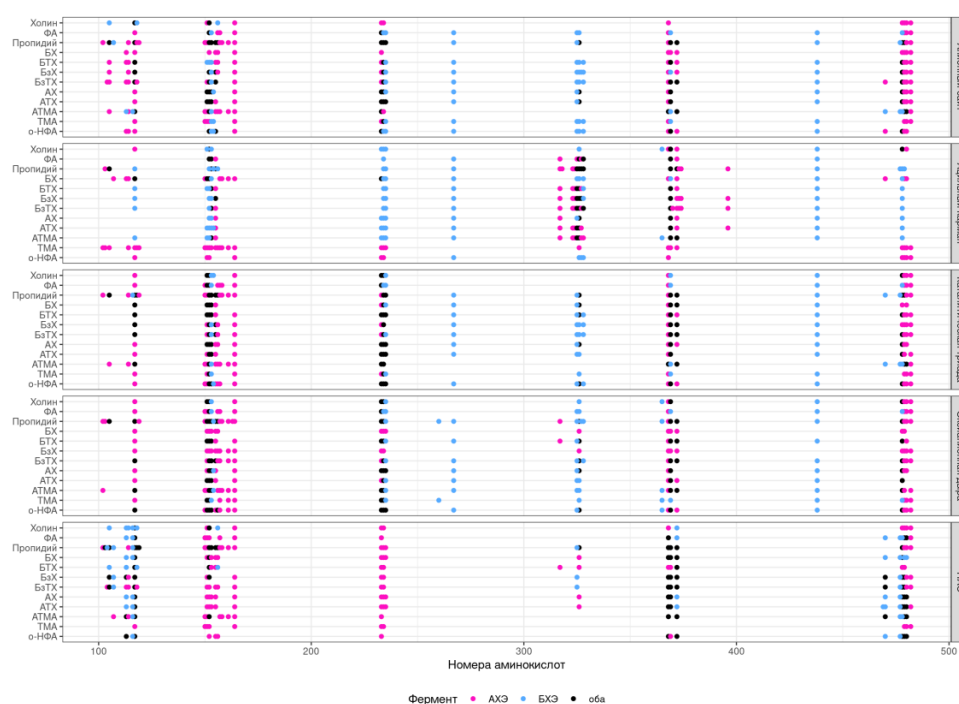


Рис. 3. Взаимодействие аминокислот АХЭ и БХЭ с лигандами. Розовым выделены позиции аминокислот, встречающихся в АХЭ, голубым – в БХЭ, черным – в обоих ферментах;  $p > 0.05$

Кроме того, поведение АХ в ацильном кармане различается у двух ферментов (рис. 3). АХЭ по сравнению с БХЭ имеет узкое ущелье и АХ не находится в ацильном кармане АХЭ [37], поэтому лиганд смещается к ПАС, что мы наблюдаем на рис. 4, а. В БХЭ было обнаружено два сайта связывания для АХ в ацильном кармане. Модели с высокой энергией сродства находились внутри канала активного сайта с более низкой энергией на поверхности фермента (рис. 4, б). Второе взаимодействие, возможно, связано с регуляторным воздействием АХ на молекулы БХЭ, так как АХ влияет на АХЭ и БХЭ по-разному. В случае с АХЭ при избытке субстрата происходит ингибирование фермента из-за связывания АХ с ПАС, и вход в полость активного центра блокируется; в случае с БХЭ такого эффекта не наблюдается, однако происходит активация [12]. На рис. 4 были показаны аминокислоты АХЭ и БХЭ, взаимодействующие с 70% структур лигандов, расстояние между атомами фермента и атомами лигандов составляло не более 5 Å.

Холин – продукт гидролиза, в частности, АХ; ориентация молекулы холина в ацильном кармане такова, что при избытке холин может перекрывать ПАС АХЭ (рис. 4, в). Это ведет к затрудненному входу АХ в активную полость АХЭ, что коррелирует с высоким уровнем ингибирования АХЭ холином. Холин в БХЭ располагается в центре активной полости фермента (рис. 4, г) и взаимодействует со всеми аминокислотами полости, включая каталитическую триаду. Так как размер полости активного центра БХЭ достаточно большой [9, 10], а аффинность холина значительно ниже других лигандов, вероятно, холин может быть вытеснен из полости активного центра другими лигандами.

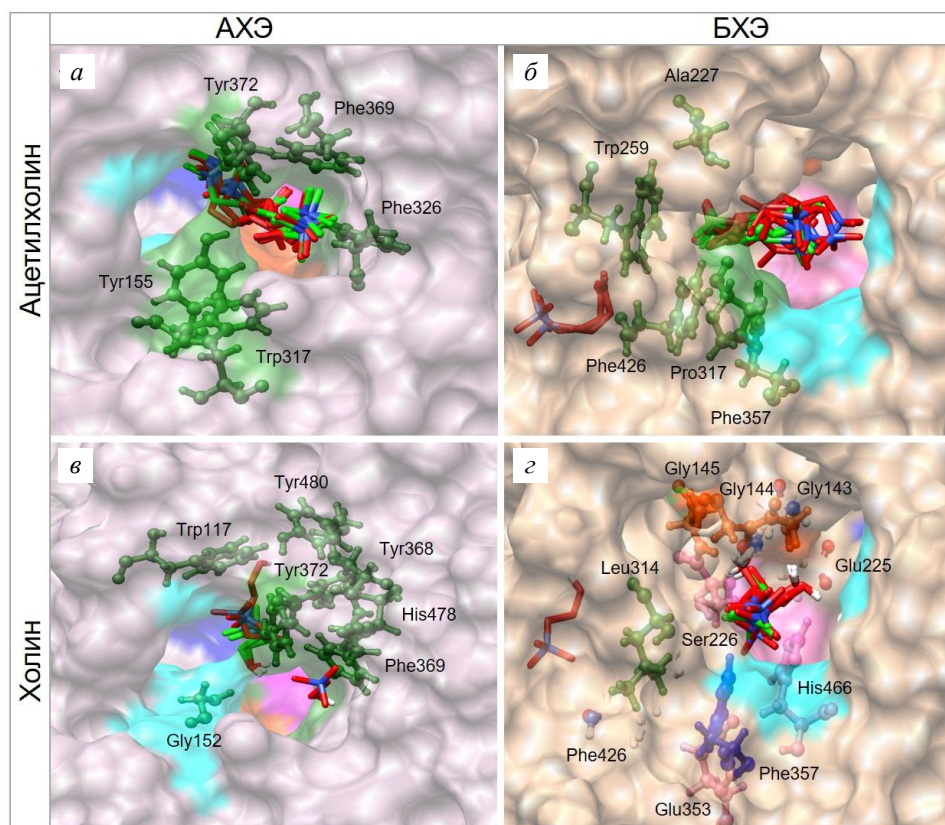


Рис. 4. Расположение АХ и холина в ацильном кармане АХЭ и БХЭ; выделенные области активного сайта обозначались: ацильный карман – зеленым, ПАС – голубым, анионный сайт – синим, каталитическая триада – розовым, оксианионная дыра – оранжевым цветом. Лиганды, обозначенные зеленым цветом, обладают высокой энергией сродства, красным – низкой. Обозначены аминокислоты, взаимодействующие с АХ и холином

### Заключение

Предсказаны полные структуры АХЭ и БХЭ, включающие коннекторные участки для дальнейшего исследования активности ХЭ человека. Это особенно важно для моделирования активности ферментов, так как АХЭ человека представлена в димерной форме, БХЭ человека является тетрамером. Структуры, предсказанные по гомологии и стабилизированные в ходе молекулярной динамики, обладают низкой энергией и оптимальными геометрическими параметрами.

Методом молекулярного докинга было выявлено, что лиганды, представленные сложными эфирами холина и их тиоаналогами (АХ и АТХ, БХ и БТХ, БзХ и БзТХ), не различались между собой по аффинности, что согласуется с их использованием в качестве взаимозаменяемых субстратов. Наши расчеты показали, что лиганды, имеющие бензольное кольцо (АТМА, ФА, БзХ, БзТХ, *o*-НФА, пропидий), отличались высоким сродством ко всем участкам активного центра, что подтверждается ранее полученными экспериментальными данными. Из всех исследуемых лигандов пропидий имел самую высокую аффинность к регуляторным участкам АХЭ и БХЭ, это объясняется его свойствами хорошего ингибитора ХЭ.



Холин и его производное – ТМА – относятся к низкоэффективным ингибиторам, то есть к ингибиторам с низкой аффинностью к регуляторным участкам фермента.

АХЭ обладает большей ингибирующей способностью по сравнению с БХЭ вследствие того, что имеет различия в строении активного центра. Ингибирование холином имеет разный механизм у АХЭ и БХЭ. Было показано, что холин, связываясь с АХЭ в ацильном кармане, может перекрывать ПАС, что приводит к ингибированию фермента, тогда как в БХЭ такого не наблюдается. Обнаруженные различия в связывании молекул АХ и холина в ацильном кармане в АХЭ и БХЭ помогут детально охарактеризовать возможный механизм ингибирования АХЭ холином.

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90120.

### Литература

1. *Silman I., Sussman J.L.* Acetylcholinesterase: 'Classical' and 'non-classical' functions and pharmacology // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2005. – V. 5, No 3. – P. 293–302. – doi: 10.1016/j.coph.2005.01.014.
2. *Lockridge O.* Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – V. 148. – P. 34–46. – doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011.
3. *Петров К.А., Харламова А.Д., Никольский Е.Е.* Холинэстеразы: взгляд нейрофизиолога // *Гены и клетки.* – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 160–167.
4. *Radić Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S., Taylor P.* Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32, No 45. – P. 12074–12084. – doi: 10.1021/bi00096a018.
5. *Pope C.N., Brimijoin S.* Cholinesterases and the fine line between poison and remedy // *Biochem. Pharmacol.* – 2018. – V. 153. – P. 205–216. – doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.044.
6. *Boyko K.M., Baymukhametov T.N., Chesnokov Y.M., Hons M., Lushchekina S.V., Konarev P.V., Lipkin A.V., Vasiliev A.L., Masson P., Popov V.O., Kovalchuk M.V.* 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD // *Biochimie.* – 2019. – V. 156. – P. 196–205. – doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.017.
7. *Sussman J.L., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I.* Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein // *Science.* – 1991. – V. 253, No 5022. – P. 872–879. – doi: 10.1126/.1678899.
8. *Dvir H., Silman I., Harel M., Rosenberry T.L., Sussman J.L.* Acetylcholinesterase: from 3D structure to function // *Chem.-Biol. Interact.* – 2010. – V. 187, No 1–3. – P. 10–22. – doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.
9. *Xu Y.-L., Li F.-Y., Ndikuryayo F., Yang W.-C., Wang H.-M.* Cholinesterases and engineered mutants for the detection of organophosphorus pesticide residues // *Sensors (Basel).* – 2018. – V. 18, No 12. – Art. 4281, P. 1–15. – doi: 10.3390/s18124281.
10. *Harel M., Sussman J.L., Krejci E., Bon S., Chanal P., Massoulié J., Silman I.* Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: Modeling and mutagenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1992. – V. 89, No 22. – P. 10827–10831. – doi: 10.1073/pnas.89.22.10827.

11. Махаева Г.Ф., Рудакова Е.В., Ковалева Н.В., Луцкекина С.В., Болтнева Н.П., Прошин А.Н., Щегольков Е.В., Бургарт Я.В., Салоутин В.И. Ингибиторы холинэстераз и карбоксилэстераз как фармакологические агенты // Изв. Акад. наук. Сер. хим. – 2019. – № 5 – С. 967–984.
12. Nicolet Y., Lockridge O., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278, No 42. – P. 41141–41147. – doi: 10.1074/jbc.M210241200.
13. Perry E., Perry R., Blessed G., Tomlinson B. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia // Lancet. – 1977. – V. 309, No 8004. – P. 189. – doi: 10.1016/s0140-6736(77)91780-9.
14. Zueva I., Dias J., Lushchekina S., Semenov V., Mukhamedyarov M., Pashirova T., Babaev V., Nachon F., Petrova N., Nurullin L., Zakharova L., Ilyin V., Masson P., Petrov K. New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer’s disease // Neuropharmacology. – 2019. – V. 155. – P. 131–141. – doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.05.025.
15. Аюнов Р.Х., Акберова Н.И., Тарасов Д.С. Докинг производных пиридоксина в активном центре холинэстераз // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Т. 153, кн. 3. – С. 107–118.
16. Shafferman A., Barak D., Stein D., Kronman C., Velan B., Greig N.H., Ordentlich A. Flexibility versus “rigidity” of the functional architecture of AchE active center // Chem.-Biol. Interact. – 2008. – V. 175, No 1–3. – P. 166–172. – doi: 10.1016/j.cbi.2008.03.013.
17. Masson P., Nachon F. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning // J. Neurochem. – 2017. – V. 142, Suppl. 2. – P. 26–40. – doi: 10.1111/jnc.14026.
18. Xie L., Huang X., Su B. Portable sensor for the detection of choline and its derivatives based on silica isoporous membrane and gellified nanointerfaces // ACS Sens. – 2017. – V. 2, No 6. – P. 803–809. – doi: 10.1021/acssensors.7b00166.
19. Kim D.E., Chivian D., Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32, Suppl. 2. – P. W526–W531. – doi: 10.1093/nar/gkh468.
20. Benkert P., Tosatto S.C., Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment // Proteins. – 2008. – V. 71, No 1. – P. 261–277. – doi: 10.1002/prot.21715.
21. Phillips J.C., Braun R., Wang W. Scalable molecular dynamics with NAMD // J. Comput. Chem. – 2005. – V. 26, No 16. – P. 1781–1802. – doi: 10.1002/jcc.20289.
22. Huang J., MacKerell A.D. Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data // J. Comput. Chem. – 2013. – V. 34, No 25. – P. 2135–2145. – doi: 10.1002/jcc.23354.
23. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // J. Mol. Graphics. – 1996. – V. 14, No 1. – P. 33–38. – doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
24. Grant B.J., Rodrigues A.P., El Sawy K.M., McCammon J.A., Caves L.S. Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures // Bioinformatics. – 2006. – V. 22, No 21. – P. 2695–2696. – doi: 10.1093/bioinformatics/btl461.
25. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. – N. Y.: Springer, 2016. – 221 p. – doi: 10.1007/978-0-387-98141-3.
26. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability // Mol. Biol. Evol. – 2013. – V. 30, No 4. – P. 772–780. – doi: 10.1093/molbev/mst010.

27. *The UniProt Consortium*. UniProt: The universal protein knowledgebase // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45, No D1. – P. D158–D169. – doi: 10.1093/nar/gkw1099.
28. *Аюнов Р.Х., Акберова Н.И., Тарасов Д.С.* Взаимодействие производного пиридоксина с активным центром ацетилхолинэстеразы // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2012. – Т. 154, кн. 2. – С. 234–246.
29. *Bajda M., Więckowska A., Hebda M., Guzior N., Sottriffer C.A., Malawska B.* Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14, No 3. – P. 5608–5632. – doi: 10.3390/ijms14035608.
30. *Morris G.M., Huey R., Lindstrom W.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* – 2009. – V. 30, No 16. – P. 2785–2791. – doi: 10.1002/jcc.21256.
31. *Nachon F., Nicolet Y., Viguié N., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Lockridge O.* Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: Expression, purification, characterization and crystallization // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269, No 2. – P. 630–637. – doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02692.x.
32. *Mukhametgalieva A.R., Zueva I.V., Aglyamova A.R., Lushchekina S.V., Masson P.* A new sensitive spectrofluorimetric method for measurement of activity and kinetic study of cholinesterases // *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.* – 2020. – V. 1868, No 1. – Art. 140270, P. 1–9. – doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140270.
33. *Lockridge O., Quinn D.M.* 4.14 – Esterases // *McQueen Ch.A. (ed.) Comprehensive Toxicology.* V. 4. – Elsevier, 2010. – P. 243–273. – doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00414-0.
34. *Ariens E.J.* *Molecular Pharmacology. The Mode of Action of Biologically Active Compounds.* – N. Y.: Acad. Press, 1964. – V. II. – 292 p.
35. *Lockridge O.* Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine // *Pharmacol. Ther.* – 1990. – V. 47, No 1. – P. 35–60. – doi: 10.1016/0163-7258(90)90044-3.
36. *Masson P., Goldstein B.N., Debouzy J.C., Froment M.T., Lockridge O., Schopfer L.M.* Damped oscillatory hysteretic behaviour of butyrylcholinesterase with benzoylcholine as substrate // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – V. 271, No 1. – P. 220–234. – doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03924.x.
37. *Луцкекина С.В., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д.* Холинэстеразы человека. Суперкомпьютерные вычисления в исследовании механизма действия и роли молекулярного полиморфизма белковой молекулы // *Постгеномные исследования и технологии / Под ред. С.Д. Варфоломеева.* – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2011. – С. 15–102.

Поступила в редакцию  
31.08.2020

---

**Мухаметгалиева Алия Рафиковна**, аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [aliya\\_rafikovna@mail.ru](mailto:aliya_rafikovna@mail.ru)

**Козлова Анастасия Сергеевна**, аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [kozlovanastasiaser@gmail.com](mailto:kozlovanastasiaser@gmail.com)

**Акберова Наталья Ивановна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [nakberova@mail.ru](mailto:nakberova@mail.ru)

**Фаттахова Альфия Нурлимановна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [afattakh57@gmail.com](mailto:afattakh57@gmail.com)

ISSN 2542-064X (Print)  
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI  
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2021, vol. 163, no. 1, pp. 5–19

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2021.1.5-19

**Ligands Affinity for Regulatory Sites of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase: A Comparative Bioinformatic Analysis**

*A.R. Mukhametgalieva<sup>\*</sup>, A.S. Kozlova<sup>\*\*</sup>, N.I. Akberova<sup>\*\*\*</sup>, A.N. Fattakhova<sup>\*\*\*\*</sup>*

*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

E-mail: <sup>\*</sup>[aliya\\_rafikovna@mail.ru](mailto:aliya_rafikovna@mail.ru), <sup>\*\*</sup>[kozlovanastasiaser@gmail.com](mailto:kozlovanastasiaser@gmail.com),  
<sup>\*\*\*</sup>[nakberova@mail.ru](mailto:nakberova@mail.ru), <sup>\*\*\*\*</sup>[afattakh57@gmail.com](mailto:afattakh57@gmail.com)

Received August 31, 2020

**Abstract**

Cholinesterase inhibitors have been the subject of many studies aimed at developing an effective treatment for various cognitive disorders. Therefore, studying cholinesterases and elucidating the mechanism of their interaction with ligands provide a basis for targeted synthesis and selection of highly specific reversible inhibitors. We analyzed the affinity of the cholinesterase substrates and inhibitors to identify the differences in the ligands binding to the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase active sites by molecular docking. Ligands with a benzene ring had better affinity for the regulatory sites of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The lowest affinity for enzymes was found in choline, a hydrolysis product of natural acetylcholine, and in tetramethylammonium, a choline derivative. Differences in the binding of acetylcholine and choline molecules within the acyl pocket of the active site of cholinesterases were shown.

**Keywords:** acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, molecular docking, energy of affinity, acetylcholine, choline

**Acknowledgments.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-34-90120).

**Figure Captions**

Fig. 1. Compounds used as ligands.

Fig. 2. Affinity statistics for the positions of ligands in the regulatory sites;  $p < 0.05$ . Differences between the affinity energy values of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with ligands are shown with color. Ligands on the  $X$ -axis have better affinity for the protein than ligands on the  $Y$ -axis within this enzyme site. Positive values of the difference between the means (dark blue) indicate lower affinity; negative values (red) show better affinity.

Fig. 3. Interaction of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase amino acids with ligands. Positions of the amino acids: pink color – in acetylcholinesterase, blue color – in butyrylcholinesterase, black color – in both enzymes;  $p > 0.05$ .

Fig. 4. Position of acetylcholine and choline in the acyl pocket of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase; colors for the active site regions under study: acyl pocket – green, peripheral anionic site – blue, anionic site – dark blue, catalytic triad – pink, oxyanion hole – orange. Ligands shown in green are characterized by high affinity energy values. Ligands highlighted in red have low affinity energy values. Amino acids interacting with acetylcholine and choline are indicated.

### References

1. Silman I., Sussman J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 293–302. doi: 10.1016/j.coph.2005.01.014.
2. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.*, 2015, vol. 148, pp. 34–46. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011.
3. Petrov K.A., Kharlamova A.D., Nikolsky E.E. Cholinesterases: A neurophysiologist's view. *Geny Kletki*, 2014, vol. 9, nos. 3, pp. 160–167. (In Russian)
4. Radić Z., Pickering N.A., Vellom D.C., Camp S., Taylor P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, no. 45, pp. 12074–12084. doi: 10.1021/bi00096a018.
5. Pope C.N., Brimijoin S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem. Pharmacol.*, 2018, vol. 153, pp. 205–216. doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.044.
6. Boyko K.M., Baymukhametov T.N., Chesnokov Y.M., Hons M., Lushchekina S.V., Konarev P.V., Lipkin A.V., Vasiliev A.L., Masson P., Popov V.O., Kovalchuk M.V. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. *Biochimie*, 2019, vol. 156, pp. 196–205. doi:10.1016/j.biochi.2018.10.017.
7. Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Tokor L., Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, vol. 253, no. 5022, pp. 872–879. doi: 10.1126/1678899.
8. Dvir H., Silman I., Harel M., Rosenberry T.L., Sussman J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem.-Biol. Interact.*, 2010, vol. 187, nos. 1–3, pp. 10–22. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.
9. Xu Y.-L., Li F.-Y., Ndikuryayo F., Yang W.-C., Wang H.-M. Cholinesterases and engineered mutants for the detection of organophosphorus pesticide residues. *Sensors (Basel)*, 2018, vol. 18, no. 12, art. 4281, pp. 1–15. doi: 10.3390/s18124281.
10. Harel M., Sussman J.L., Krejci E., Bon S., Chanal P., Massoulié J., Silman I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: Modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 1992, vol. 89, no. 22, pp. 10827–10831. doi: 10.1073/pnas.89.22.10827.
11. Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Kovaleva N.V., Lushchekina S.V., Boltneva N.P., Proshin A.N., Shchegolov E.V., Burgart Ya.V., Saloutin V.I. Cholinesterase and carboxylesterase inhibitors as pharmacological agents. *Russ. Chem. Bull.*, 2019, vol. 68, no. 5, pp. 967–984. doi: 10.1007/s11172-019-2507-2.
12. Nicolet Y., Lockridge O., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 42, pp. 41141–41147. doi: 10.1074/jbc.M210241200.
13. Perry E., Perry R., Blessed G., Tomlinson B. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*, 1977, vol. 309, no. 8004, p. 189. doi: 10.1016/s0140-6736(77)91780-9.
14. Zueva I., Dias J., Lushchekina S., Semenov V., Mukhamedyarov M., Pashirova T., Babaev V., Nachon F., Petrova N., Nurullin L., Zakharova L., Ilyin V., Masson P., Petrov K. New evidence for dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as improved drugs for treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2019, vol. 155, pp. 131–141. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.05.025.
15. Ayupov R.K., Akberova N.I., Tarasov D.S. Docking of pyridoxine derivatives in the active site of cholinesterases. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2011, vol. 153, no. 3, pp. 107–118. (In Russian)

16. Shafferman A., Barak D., Stein D., Kronman C., Velan B., Greig N.H., Ordentlich A. Flexibility versus “rigidity” of the functional architecture of AchE active center. *Chem.-Biol. Interact.*, 2008, vol. 175, nos. 1–3, pp. 166–172. doi: 10.1016/j.cbi.2008.03.013.
17. Masson P., Nachon F. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *J. Neurochem.*, 2017, vol. 142, suppl. 2, pp. 26–40. doi: 10.1111/jnc.14026.
18. Xie L., Huang X., Su B. Portable sensor for the detection of choline and its derivatives based on silica isoporous membrane and gellified nanointerfaces. *ACS Sens.*, 2017, vol. 2, no. 6, pp. 803–809. doi: 10.1021/acssensors.7b00166.
19. Kim D.E., Chivian D., Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, suppl. 2, pp. W526–W531. doi: 10.1093/nar/gkh468.
20. Benkert P., Tosatto S.C., Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, 2008, vol. 71, no. 1, pp. 261–277. doi: 10.1002/prot.21715.
21. Phillips J.C., Braun R., Wang W. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 2005, vol. 26, no. 16, pp. 1781–1802. doi: 10.1002/jcc.20289.
22. Huang J., MacKerell A.D. Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.*, 2013, vol. 34, no. 25, pp. 2135–2145. doi: 10.1002/jcc.23354.
23. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics*, 1996, vol. 14, no. 1, pp. 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
24. Grant B.J., Rodrigues A.P., El Sawy K.M., McCammon J.A., Caves L.S. Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, no. 21, pp. 2695–2696. doi: 10.1093/bioinformatics/btl461.
25. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, Springer, 2016. 221 p. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3.
26. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 4, pp. 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
27. The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 45, no. D1, pp. D158–D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099.
28. Ayupov R.K., Akberova N.I., Tarasov D.S. The interaction of a pyridoxine derivative with the active site of acetylcholinesterase. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2012, vol. 154, no. 2, pp. 234–246. (In Russian)
29. Bajda M., Więckowska A., Hebda M., Guziar N., Sotriffer C.A., Malawska B. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 5608–5632. doi: 10.3390/ijms14035608.
30. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 2009, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791. doi: 10.1002/jcc.21256.
31. Nachon F., Nicolet Y., Viguié N., Masson P., Fontecilla-Camps J.C., Lockridge O. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: Expression, purification, characterization and crystallization. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 2, pp. 630–637. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02692.x.
32. Mukhametgalieva A.R., Zueva I.V., Aglyamova A.R., Lushchekina S.V., Masson P. A new sensitive spectrofluorimetric method for measurement of activity and kinetic study of cholinesterases. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2020, vol. 1868, no. 1, art. 140270, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140270.
33. Lockridge O., Quinn D.M. 4.14 – Esterases. In: McQueen Ch.A. (Ed.) *Comprehensive Toxicology*. Vol. 4. Elsevier, 2010, pp. 243–273. doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00414-0.
34. Ariens E.J. *Molecular Pharmacology. The Mode of Action of Biologically Active Compounds*. Vol. II. New York, Acad. Press, 1964. 292 p.

35. Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol. Ther.*, 1990, vol. 47, no. 1, pp. 35–60. doi: 10.1016/0163-7258(90)90044-3.
36. Masson P., Goldstein B.N., Debouzy J.C., Froment M.T., Lockridge O., Schopfer L.M. Damped oscillatory hysteretic behaviour of butyrylcholinesterase with benzoylcholine as substrate. *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, no. 1, pp. 220–234. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03924.x.
37. Lushchekina S.V., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Varfolomeev S.D. Human cholinesterases. Supercomputer calculations in studying the action mechanism and role of molecular polymorphism of a protein molecule. In: *Postgenomnye issledovaniya i tekhnologii* [Post-genomic Research and Technologies]. Varfolomeev S.D. (Ed.). Moscow, Izd. Mosk. Univ., 2011, pp. 15–102. (In Russian)

**Для цитирования:** Мухаметгалиева А.Р., Козлова А.С., Акберова Н.И., Фаттахова А.Н. Аффинность лигандов к регуляторным участкам ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы человека: сравнительный биоинформатический анализ // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2021. – Т. 163, кн. 1. – С. 5–19. – doi: 10.26907/2542-064X.2021.1.5-19.

**For citation:** Mukhametgalieva A.R., Kozlova A.S., Akberova N.I., Fattakhova A.N. Ligands affinity for regulatory sites of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: A comparative bioinformatic analysis. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2021, vol. 163, no. 1, pp. 5–19. doi: 10.26907/2542-064X.2021.1.5-19. (In Russian)